



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI**

**INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE**

**CICLO XXVII**

**STUDIO DEL MECCANISMO D'AZIONE DI COMPOSTI AD ATTIVITÀ  
ANTIPROLIFERATIVA**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. ANTONINO POLIMENO

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. STEFANO MORO

**Supervisore:** Ch.ma Prof. LISA DALLA VIA

**Dottoranda:** AIDA NELLY GARCIA ARGAEZ



# INDICE

SOMMARIO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 IL CANCRO	5
1.1.1 Epidemiologia	5
1.1.2 Terapia antitumorale	7
1.2. FARMACI ANTITUMORALI	9
1.3 FARMACI ANTITUMORALI AD AZIONE INTERCALANTE	10
1.3.1 Le DNA topoisomerasi	11
1.3.2 Inibitori delle DNA topoisomerasi	13
1.4 FARMACI ANTI-VEGFR NELL'ANGIOGENESI TUMORALE	14
1.4.1 Angiogenesi tumorale	15
1.4.2 VEGF (Fattore di Crescita dell' Endotelio Vascolare)	17
1.4.3 I recettori del VEGF	18
1.4.4 Terapie anti-VEGF e anti-VEGFR	22
1.5 TERAPIA ORMONALE: CARCINOMA MAMMARIO	25
1.5.1 SERMs (Selective Estrogen-Receptor Modulators)	26
1.5.2 SERD (Selective Estrogen-Receptor Down-regulator)	30
1.5.3 Inibitori dell'aromatasi	30
2. SCOPO DELLA TESI	33
Gruppo A: Derivati benzo- e pirido-tiopiranoindolici	33
Gruppo B: Derivati benzotiopiranopirimidinici	35
Gruppo C: Analoghi del tamoxifene	39
3. MATERIALI E METODI	41

3.1	COMPOSTI IN ESAME	41
3.1.1	Preparazione delle soluzioni dei composti	41
3.2	CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA	41
3.3	ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA	42
3.3.1	Soluzioni e materiale	43
3.3.2	Determinazione dell'attività antiproliferativa	44
3.4	DICROISMO LINEARE IN FLUSSO	45
3.5	SAGGI SULLE DNA TOPOISOMERASI	47
	Elettroforesi su Gel di Agarosio	47
3.6	DNA TOPOISOMERASI I	48
3.6.1	Soluzioni e materiali	48
3.6.2	Determinazione dell'attività di rilassamento del DNA superavvolto	49
3.6.3	Determinazione della formazione del " <i>cleavage complex</i> "	49
3.7	DNA TOPOISOMERASI II	50
3.7.1	Soluzioni e materiali	50
3.7.2	Determinazione dell'attività di rilassamento del DNA superavvolto	51
3.7.3	Determinazione della formazione del " <i>cleavage complex</i> "	51
3.8	ANALISI CITOFLUORIMETRICA	52
3.8.1	Determinazione dell'apoptosi	53
3.8.2	Determinazione della modificazione del potenziale elettrico transmembrana mitocondriale in cellule integre	56
3.8.3	Determinazione della caspasi-3 attiva	58
3.9	DETERMINAZIONI FLUORIMETRICHE	60
3.9.1	Spettri di fluorescenza	61
3.9.2	Saggio di fosforilazione del recettore tirosin-chinasico KDR (VEGFR-2)	62
4.	GRUPPO A: DERIVATI BENZO- E PIRIDO-TIOPIRANOINDOLICI	67
	RISULTATI E DISCUSSIONE	67

4.1 CARATTERISTICHE SPETTROSCOPICHE	67
4.2 STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA	70
4.3 INTERAZIONE COMPOSTO-DNA	74
4.4 INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLE DNA TOPOISOMERASI	77
4.4.1 Saggio di inibizione dell'attività di rilassamento della DNA topoisomerasi II	78
4.4.2 Saggio di determinazione della formazione del <i>cleavage complex</i> mediato dalla DNA topoisomerasi II	81
4.4.3 Saggio di inibizione dell'attività di rilassamento della DNA topoisomerasi I	83
4.4.4 Saggio di determinazione della formazione del <i>cleavage complex</i> mediato dalle DNA topoisomerasi I	86
4.5 DETERMINAZIONI CITOFLUORIMETRICHE	87
CONCLUSIONI	89
5. GRUPPO B: DERIVATI BENZOTIOPIRANOPIRIMIDINICI	91
RISULTATI E DISCUSSIONE	91
5.1 STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA	91
5.2 INTERAZIONE COMPOSTO-DNA	95
5.3 STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA SU HUVEC	96
5.4 DETERMINAZIONI FLUORIMETRICHE	98
5.4.1 Spettri di emissione in fluorescenza	98
5.4.2 Saggio di fosforilazione del recettore tirosin-chinasico KDR	99
CONCLUSIONI	102
6. GRUPPO C: ANALOGHI DEL TAMOXIFENE	103
RISULTATI E DISCUSSIONE	103
6.1 STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA	103
6.2 DETERMINAZIONI CITOFLUORIMETRICHE	106
6.2.1 Determinazione dell'apoptosi	106

6.2.2 Determinazione della modificazione del potenziale mitocondriale in cellule integre	108
6.2.3 Determinazione della caspasi-3 attiva	110
6.3 INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLE DNA TOPOISOMERASI	111
6.3.1 Saggio di inibizione dell'attività di rilassamento delle Topoisomerasi I e II	112
6.4 INTERAZIONE COMPOSTO-DNA	114
6.4.1 Dicroismo lineare	114
CONCLUSIONI	115
7. CONCLUSIONI GENERALI	117
8. BIBLIOGRAFIA	119

## SOMMARIO

L'attività di ricerca svolta ha riguardato l'individuazione e lo studio del meccanismo d'azione di composti ad attività antiproliferativa appartenenti a tre gruppi strutturalmente distinti: gruppo **A** formato da dodici derivati benzo- e pirido-tiopiranoindolici; gruppo **B** costituito da ventuno derivati benzotiopiranopirimidinici; e il gruppo **C** al quale appartengono quattordici derivati trifeniletilenici.

Su tutti i composti è stata effettuata una prima determinazione con l'obiettivo di valutare la capacità inibitoria sulla proliferazione cellulare. A questo scopo sono state utilizzate linee cellulari tumorali umane e sono stati determinati i valori di  $GI_{50}$  (concentrazione di composto in grado di provocare il 50% di morte cellulare rispetto ad una coltura di controllo).

Successivamente, dei composti dotati di attività antiproliferativa più significativa, è stato studiato il meccanismo d'azione, allo scopo di individuare i bersagli intracellulari coinvolti nella morte cellulare.

Nell'ambito dell'individuazione dei bersagli molecolari responsabili dell'attività, sono state prese in considerazione sia macromolecole che organelli intracellulari. In particolare è stata valutata la capacità di complessarsi con il DNA, così come di interferire con i processi metabolici della macromolecola stessa mediati dagli enzimi nucleari topoisomerasi I e II. Analogamente si è considerata la possibile interferenza con enzimi recettoriali ad attività tirosinchinasica, quale VEGFR-2 o KDR, strettamente coinvolto nel processo neoangiogenico tumorale. Infine la tipologia di morte cellulare indotta dai composti in esame è stata determinata attraverso una serie di studi di citofluorimetria. La valutazione dell'attivazione del processo apoptotico, così come il contributo della via intrinseca, determinato a livello mitocondriale, hanno consentito di definire in modo completo per ciascun gruppo di composti il meccanismo coinvolto nell'effetto citotossico.





## SUMMARY

The research focused on the identification and the study of the mechanism of action of new compounds endowed with antiproliferative activity and characterized by three different chemical structures: twelve benzo- and pyrido-thiopyranoindol derivatives (Group **A**); twenty one 2-aryl substituted benzothiopyrano-fused pyrimidines (Group **B**); and fourteen triphenylethylenic derivatives (Group **C**).

As preliminary evaluation, the ability of compounds to inhibit cell proliferation on human tumor cell lines was estimated and in particular, the  $GI_{50}$  values (concentration of compound able to induce 50% cell death with respect to a control), were calculated for each compound.

For compounds characterized by the most significant antiproliferative activity, the mechanism of action has been investigated, with the aim to establish the intracellular targets involved in the cytotoxic effect.

In this connection, both macromolecules and intracellular organelles have been taken into consideration as potential molecular targets responsible for the cytotoxicity.

In detail, the ability to form a molecular complex with DNA, along with the capacity to interfere with the catalytic activity of both topoisomerases I and II, were evaluated. Furthermore, the effect on the tyrosin kinase receptor, VEGFR-2 (KDR), involved in the angiogenesis process which participates to the tumor growth, was investigated. Finally, the death pathway induced by the studied compounds was determined by cytofluorimetric analyses. The occurrence of apoptotic process, such as the contribution of the intrinsic pathway, through the mitochondrial depolarization, allowed to draw for each group of compounds the mechanism involved in the cytotoxicity.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 IL CANCRO

Il cancro é un insieme molto eterogeneo di circa 200 malattie che si presenta negli esseri umani e in altre specie animali. D'accordo con Sir Willis "una neoplasia è una massa anomala di tessuto la cui crescita eccessiva è scoordinata rispetto a quella del tessuto normale e persiste nella sua eccessività anche dopo la cessazione degli stimoli che l'hanno provocata"<sup>[1]</sup>. Le neoplasie maligne sono caratterizzate da una crescita cellulare svincolata dai normali meccanismi di controllo dell'organismo, a partire da un'unica cellula progenitrice e da numerose anomalie genetiche, funzionali e morfologiche. Alla fase iniziale del processo carcinogenetico segue una fase di progressione, in cui le cellule anomale sono in grado di moltiplicarsi e di allontanarsi ulteriormente, dal punto di vista della differenziazione e funzione, dalle cellule originarie. Possono così generarsi masse e aggregati cellulari in grado di interferire con l'organo e l'apparato in cui risiedono, eventualmente anche migrando verso organi a distanza (disseminazione, metastasi) fino a minacciare la vita dell'intero organismo<sup>[2]</sup>.

Il cancro si caratterizza per alcuni cambiamenti nei meccanismi di controllo che regolano la proliferazione e la differenziazione delle cellule<sup>[3]</sup>. Questi cambiamenti sono il risultato di anomalie genetiche che possono comparire per mutazione di un gruppo specifico di geni. Molti di questi geni agiscono sopprimendo o stimolando il ciclo cellulare, e la sua perdita o inattività produce una divisione accelerata<sup>[1]</sup>.

### 1.1.1 Epidemiologia

Fino ad oggi, il cancro costituisce una delle principali cause di morte. Ogni anno, nel mondo, a piú di dieci milioni di persone viene diagnosticato il cancro, delle quali 6 milioni muoiono rappresentando il 12 % della morte nell'ambito mondiale, e si stima che per il 2020 il numero di nuovi casi incrementerà fino a 15 milioni<sup>[4]</sup>.

Ogni giorno si scoprono in Italia circa 1000 nuovi casi di cancro, dei quali 56% sono uomini ed 44% donne. Nel corso della vita, un uomo su due e una donna su tre si ammalerà di tumore. Considerando l'intera popolazione, escludendo i carcinomi alla cute, il tumore più diffuso è quello al colon-retto (14%), seguito da quello alla mammella (13%), alla prostata (11%) ed al polmone (11%)<sup>[2]</sup> (Tabella 1.1).

Uomini	Donne
Prostata 20%	Mammella 29%
Polmone 15%	Colon-retto 14%
Colon-retto 14%	Polmone 6%
Vescica 10%	Corpo dell'utero 5%
Stomaco 5%	Tiroide 5%

**Tabella 1.1:** I cinque tumori più frequentemente diagnosticati in Italia, esclusi quelli della cute. Dati AIRTUM 2013.

Dividendo i dati per sesso, tra gli uomini prevale il tumore della prostata che rappresenta il 20% di tutti i tumori diagnosticati; seguono il tumore del polmone (15%, con tendenza alla riduzione nel tempo), il tumore del colon-retto (14%), il tumore della vescica (10%) e il tumore dello stomaco (5%). Tra le donne, il tumore della mammella è il più frequente, rappresentando il 29% di tutti i tumori, seguito dai tumori del colon-retto (14%), del polmone (6%), del corpo dell'utero (5%) e della tiroide (5%)<sup>[2]</sup>.

Sebbene questi dati sembrino scoraggianti, dalla seconda metà degli anni '90 ad oggi, il trend di mortalità è diminuito in modo notevole e questa diminuzione risulta essere del 17% nel sesso maschile e del 10% in quello femminile<sup>[2]</sup> (dati AIRTUM: trend tumorali 1996-2010).

Questa significativa riduzione della mortalità può essere imputata verosimilmente ad un effetto sinergico tra programmi di prevenzione e nuove strategie terapeutiche, con un conseguente miglioramento della sopravvivenza. In Italia, circa il 61% delle donne e il 52% degli uomini sopravvive a cinque anni dalla diagnosi; in particolare è fortemente

aumentata la sopravvivenza dopo un tumore al seno (87%) e alla prostata (88%). Il cancro è ancora la seconda causa di morte (il 30% di tutti i decessi) dopo le malattie cardiovascolari, ma chi sopravvive dopo un lustro dalla diagnosi ha la prospettiva di avere una vita paragonabile a coloro i quali non è stata diagnosticata la neoplasia<sup>[2]</sup>.

Senza dubbio il cancro costituisce un problema a livello mondiale ed occupa un posto di rilievo nell'ambito dei programmi di salute pubblica, assistenza sanitaria, prevenzione e ricerca. Le terapie antineoplastiche correntemente in uso sono molteplici e dipendono essenzialmente dal tipo di tumore, dalla localizzazione e dallo stadio di avanzamento. Esistono approcci di intervento comuni, ma che comunque vanno ragionati prendendo in considerazione caso per caso, dal momento che le situazioni che si presentano possono essere diverse e gli organismi possono rispondere in modo differente anche in presenza dello stesso tipo di tumore.

### **1.1.2 Terapia antitumorale**

Per il trattamento curativo o palliativo è necessaria un'ampia strategia terapeutica e attualmente gli approcci terapeutici fondamentali comprendono:

1.- **la chirurgia:** è spesso il primo passo per curare la malattia. Affinché l'intervento sia efficace lo sviluppo della malattia deve essere ancora ad uno stadio tale da permettere l'asportazione completa della massa senza danneggiare organi vitali. Essa viene integrata con trattamenti chemioterapici e radioterapici per aumentare le possibilità di guarigione o sopravvivenza;

2.- **la radioterapia:** prevede l'uso di radiazioni ionizzanti (quali raggi X e raggi  $\gamma$ ) che vengono concentrate sul tumore con lo scopo di danneggiare il DNA del tessuto bersaglio e poichè le cellule cancerose sono scarsamente capaci di riparare i danni al proprio genoma vanno inevitabilmente incontro a morte cellulare. È il trattamento di elezione per numerose neoplasie perché consente la conservazione dell'organo colpito. Può essere usata da sola o in combinazione con la chemioterapia, nel trattamento di tumori localizzati e nel controllo del tumore primario nella malattia metastatica;

3.- **la terapia immunologica:** sfrutta il sistema immunitario del paziente per eradicare la patologia di tipo neoplastico. Attualmente questo tipo di terapia prevede soprattutto la somministrazione di interferone alfa e interleuchina-2 allo scopo di elevare i livelli di linfociti B e T;

4.- **la chemioterapia:** a differenza della radioterapia o della chirurgia, che agiscono solo sul tumore primario, la chemioterapia è fondamentale sia per intervenire sul tumore primario che sulle metastasi. Consiste nella somministrazione di farmaci citotossici, che entrano nel circolo sanguigno e si diffondono, raggiungendo le cellule neoplastiche in qualsiasi parte del corpo.

Il requisito più importante per un farmaco chemioterapico risulta essere la selettività per il bersaglio costituito dalla cellula neoplastica verso cui è direzionato, preservando per quanto possibile la salute delle cellule sane. In ogni caso si tratta di una caratteristica del tutto ideale in quanto ad oggi non esistono farmaci in grado di agire esclusivamente a livello dei bersagli neoplastici, senza presentare effetti collaterali sugli altri tessuti sani dell'organismo. Purtroppo la sensibilità degli organi sani nei confronti dei vari farmaci chemioterapici determina la comparsa di una moltitudine di effetti collaterali, che variano a seconda del tipo di farmaci impiegati. La tossicità dei chemioterapici 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).

Accanto agli effetti collaterali un altro problema della chemioterapia antitumorale è la comparsa di resistenza. Il fenomeno della resistenza è un fattore che può compromettere in maniera determinante la terapia.

Le cause per le quali una cellula neoplastica può risultare resistente sono molteplici e la resistenza può insorgere naturalmente, cioè indipendentemente dal fatto che la cellula sia

venuta a contatto con il farmaco, oppure può essere acquisita, cioè il risultato di modificazioni a carico della cellula in seguito a trattamenti ripetuti.

Nei primi approcci chemioterapici anticancro veniva utilizzata una monochemioterapia, con rotazione dei farmaci a disposizione, tuttavia essa spesso non permetteva di ottenere la remissione totale. Attualmente è da preferirsi la polichemioterapia, o terapia “multitarget”, che consiste nell’associazione di più farmaci atti ad aggredire le cellule neoplastiche colpendo contemporaneamente diversi meccanismi essenziali per la replicazione. Si ostacola così la loro capacità di evolvere verso forme resistenti alle cure.

Al fine di limitare gli effetti collaterali, tra i quali l’immunodepressione, questi farmaci non vengono somministrati in modo continuo ma seguendo dei cicli di trattamento. L'intervallo tra un ciclo e l'altro consente di attendere che una nuova popolazione di cellule tumorali entri in fase di replicazione e, nel contempo, permette all'organismo di riprendersi dagli effetti collaterali della cura, soprattutto quelli che per l’appunto colpiscono le difese immunitarie.

Inoltre è possibile ricorrere alla chemioterapia adiuvante, la quale viene utilizzata al fine di prevenire il ritorno della patologia e/o la diffusione di possibili metastasi che possono essersi staccate dal tumore, pur non avendo ancora dato origine a tumori secondari rilevabili con gli strumenti diagnostici attualmente a disposizione.

## 1.2. FARMACI ANTITUMORALI

I farmaci chemioterapici antitumorali possono essere classificati a seconda dell’effetto che producono sulla cellula maligna cioè in base al meccanismo d'azione, oppure in base al bersaglio cellulare verso cui sono indirizzati. Il DNA costituisce uno dei bersagli cellulari più comune se si considerano i chemioterapici convenzionali e in questo senso si possono distinguere:

- **alchilanti, complessanti del solco ed intercalanti:** che interagiscono direttamente con il DNA;

- **antimetaboliti ed inibitori del fuso mitotico:** che interferiscono con i processi metabolici e funzionali del DNA.

### 1.3 FARMACI ANTITUMORALI AD AZIONE INTERCALANTE

L'*intercalazione* è un processo di complessazione, avviene quando una molecola si inserisce parallelamente alle coppie di basi del DNA e contrae con esse interazioni sia di tipo idrofobico che di tipo elettrostatico (forze di Van der Waals e legami ionici).

La caratteristica principale delle molecole intercalanti è quella di possedere una struttura policiclica aromatica planare; inoltre si è osservato che l'inserimento di una o più catene laterali basiche protonabili a pH fisiologico può migliorare il processo intercalativo inducendo un aumento dell'affinità di legame e dell'idrosolubilità del composto stesso.

Affinché l'intercalazione sia possibile, la molecola di DNA deve svolgersi, solo così si creerà lo spazio sufficiente per la molecola che si intercala.

Questo processo richiede quindi delle modifiche dell'angolo di torsione creato dalla struttura zucchero-fosfato della doppia elica; il risultato di questa modifica torsionale sarà la creazione di un sito di intercalazione che causerà una separazione tra le coppie di basi azotate con conseguente allungamento della doppia elica e diminuzione del suo superavvolgimento nel sito di intercalazione.

Questo meccanismo, inducendo cambiamenti strutturali locali del DNA, interferisce con i processi di replicazione cellulare e di trascrizione. Gli intercalanti quindi possono anche agire da agenti mutageni.

Un'altra caratteristica fondamentale del processo di intercalazione è l'orientazione del cromoforo, il quale deve collocarsi parallelamente alle basi e allo stesso tempo perciò perpendicolarmente all'asse maggiore dell'elica del DNA. Sperimentalmente, quindi, calcolando il valore dell'angolo formatosi fra un cromoforo e il DNA si può discriminare se quest'ultimo è effettivamente intercalato<sup>[5]</sup>.



Le prime molecole ad essere identificate come intercalanti furono alcuni composti appartenenti alla famiglia delle aminoacridine, ma fu subito chiaro che la proprietà dell'intercalazione era condivisa da un gran numero di molecole che avevano azione sul DNA e tra queste molti erano agenti antitumorali.

Alcuni esempi di molecole intercalanti sono l'**actinomicina D**, le antracicline (**daunorubicina**, **doxorubicina** e analoghi), il **mitoxantrone**, gli **antrachinazoli**, il **bisantrene**, l'**amsacrina**, l'**ellipticina** e la **mitramicina**<sup>[6]</sup>.

Numerosi studi hanno stabilito che la formazione del complesso farmaco-DNA costituisce una condizione necessaria, ma non sufficiente per determinare conseguenze antiproliferative; un esempio è costituito dall'*etidio bromuro*, il quale, pur avendo un'elevata affinità verso il DNA, non presenta attività antitumorale.

In molti casi è stato dimostrato che l'attività antitumorale dei farmaci che si complessano mediante intercalazione con il DNA dipende dalla loro capacità di interferire con l'attività catalitica di particolari enzimi nucleari, tra i quali le *topoisomerasi*, piuttosto che dalla loro abilità di complessare il DNA in senso stretto<sup>[7]</sup>.

### 1.3.1 Le DNA topoisomerasi

Le DNA topoisomerasi sono sorprendenti strumenti molecolari in grado di organizzare lo stato topologico del DNA all'interno della cellula.

Questi enzimi nucleari svolgono un ruolo fondamentale ed importante, correlato all'elevato grado di organizzazione strutturale del DNA: la macromolecola infatti non solo si trova avvolta in forma di doppia elica, nella quale entrambe le catene ruotano attorno ad un asse, ma subisce anche un ulteriore ripiegamento su se stessa che determina quello che viene definito *superavvolgimento*.

Il DNA cellulare dev'essere strettamente compattato per trovare spazio all'interno del nucleo della cellula, e ciò giustifica la complessità della sua organizzazione spaziale.

Tuttavia, l'impacchettamento deve permettere l'accesso all'informazione contenuta nel DNA per lo svolgimento di processi fondamentali per la cellula quali la replicazione e la trascrizione.

Proprio in questo contesto è indispensabile l'azione dell'enzima topoisomerasi che agisce sul numero di legame topologico ("*linking number*", *Lk*). Quest'ultimo è un parametro che quantifica il grado di superavvolgimento di una molecola di DNA; *Lk* aumenta con superavvolgimenti positivi (levogiri) e diminuisce con superavvolgimenti negativi (destrogiri). Due molecole di DNA che differiscono fra loro soltanto per una variazione del numero di legame sono definite *topoisomeri*<sup>[8]</sup>.

Vi sono due classi di topoisomerasi:

•**DNA topoisomerasi di tipo I:** sono proteine monomeriche che agiscono tagliando transitoriamente una delle due catene del DNA, ruotando un'estremità attorno alla catena integra e riunendo le estremità interrotte, e modificando *Lk* con incrementi di 1. Esse vengono ulteriormente suddivise in due sottogruppi a seconda che si leghino al fosfato in posizione 5' (topoisomerasi I A) o al fosfato in posizione 3' (topoisomerasi I B, tra cui l'enzima topoisomerasi I eucariotico).

•**DNA topoisomerasi di tipo II:** sono proteine omodimeriche ATP-dipendenti che permettono il passaggio di una regione intatta della doppia elica di DNA attraverso il taglio temporaneo di entrambi i filamenti di un'altra regione cromosomica; il numero di legame cambia di due unità per volta<sup>[9]</sup>.

#### **Ciclo catalitico delle DNA topoisomerasi**

I due tipi di DNA topoisomerasi, I e II, sono diversi sia per meccanismo d'azione sia per la funzione cellulare. Entrambe però utilizzano l'idrossile di una tirosina per un attacco nucleofilo ad un gruppo fosfato del DNA. In questo modo si rompe il legame fosfodiesterico che viene sostituito da uno fosfotirosinico<sup>[10]</sup>.

Il ciclo catalitico della **DNA topoisomerasi I** non richiede idrolisi di ATP né la presenza di cationi bivalenti.

Possiamo identificare quattro fasi, in cui l'enzima: i) si lega al DNA; ii) provoca un taglio su un filamento del DNA e forma con esso un complesso covalente; iii) attraverso l'energia immagazzinata nel substrato, sotto forma di superavvolgimento, ricuce il filamento interrotto; iv) rilascia infine la molecola di DNA<sup>[11]</sup>.

Il ciclo catalitico della **DNA topoisomerasi II** invece, richiede l'idrolisi di due molecole di ATP e la presenza di cationi bivalenti. Il suo meccanismo d'azione è un processo multistadio che può essere diviso in sei momenti:

1. la topoisomerasi inizia il suo ciclo catalitico complessandosi al DNA;
2. in presenza di cationi bivalenti l'enzima provoca un taglio su entrambi i filamenti del DNA e forma un complesso covalente detto "complesso di taglio" ("*cleavable complex*");
3. grazie al legame di due molecole di ATP la topoisomerasi subisce una modifica conformazionale che permette il passaggio di una seconda doppia elica di DNA attraverso la rottura del filamento creata nel passaggio precedente;
4. l'enzima ricuce il filamento interrotto;
5. l'idrolisi della seconda molecola di ATP permette il rilascio del DNA;
6. ritorno alla conformazione iniziale, disponibile per un successivo ciclo catalitico<sup>[12]</sup>.

### **1.3.2 Inibitori delle DNA topoisomerasi**

Il coinvolgimento di questi enzimi in molti processi cellulari, unita alla capacità degli stessi di formare almeno un intermedio covalente con il DNA, li ha resi un interessante bersaglio anti-tumorale.

I composti che interferiscono con il ciclo catalitico e utilizzati nella terapia anticancro, sono distinguibili in due classi: *inibitori* e *veleni*.

Gli *inibitori* sono composti che inibiscono in senso stretto l'attività catalitica dell'enzima.

I *veleni* stabilizzano il complesso covalente enzima-DNA (*cleavable complex*) impedendo così una fase specifica del ciclo catalitico come la ricucitura dei filamenti, la conseguenza di questa azione è la frammentazione del DNA e la conseguente morte cellulare.

I veleni trasformano quindi l'enzima in un'endonucleasi che taglia il DNA a livello di siti preferenziali lungo il genoma, stimolando in questo modo la cascata del processo apoptotico; così un enzima di vitale importanza per la cellula diventa una "tossina" che avvelena la cellula stessa.

Grazie a tale meccanismo i composti risultano perciò essere degli agenti antitumorali più potenti rispetto agli inibitori catalitici.

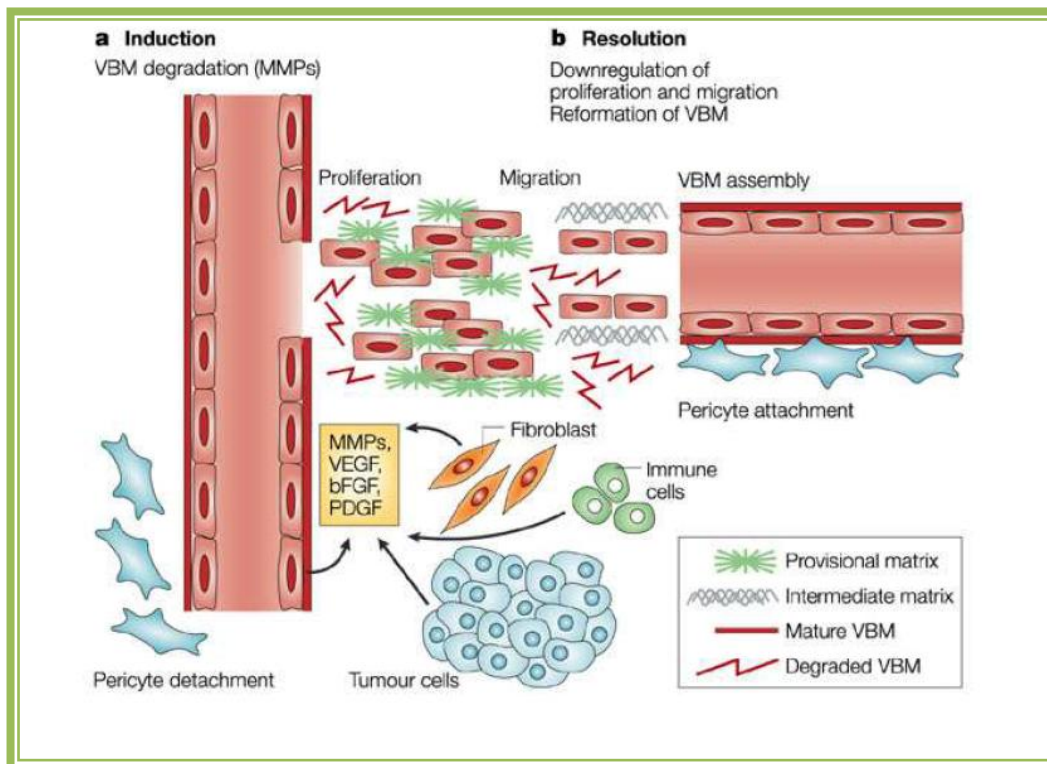
I farmaci che fungono da veleni della topoisomerasi II possono essere intercalanti (*m-amsacrina*) o non intercalanti (*teniposide*)<sup>[13]</sup>.

Per quanto riguarda le topoisomerasi I, il primo veleno ad essere identificato e studiato è stata la **camptotecina (CPT)**, un alcaloide isolato da una pianta comune in Cina (*Camptotheca acuminata*). Il suo sviluppo clinico fu abbandonato per l'elevata tossicità riscontrata e oggi si trovano in terapia due derivati idrosolubili (**topotecan** e **irinotecan**), mentre altri sono ancora in fase di sperimentazione clinica<sup>[11]</sup>.

#### **1.4 FARMACI ANTI-VEGFR NELL'ANGIOGENESI TUMORALE**

Per angiogenesi s'intende "la formazione di nuovi vasi sanguigni attraverso cellule endoteliali a partire da un letto vascolare pre-esistente"<sup>[14]</sup>. L'angiogenesi è un fenomeno complesso, caratterizzato da una cascata di eventi strettamente regolati da fattori pro- ed anti-angiogenici. Importante elemento di molti processi fisiologici e patologici, la neoangiogenesi si realizza in concomitanza alla vasculogenesi durante lo sviluppo

embrionale e fetale (Fig. 1.1). Nell'adulto sano è un fenomeno che avviene tipicamente a livello dell'apparato riproduttivo femminile, nel processo di rigenerazione della mucosa uterina durante il ciclo mestruale, nello sviluppo placentare e nella formazione dell'osso endocondrale, mentre come meccanismo parafisiologico si può osservare durante la riparazione dei tessuti e la guarigione delle ferite<sup>[15]</sup>.



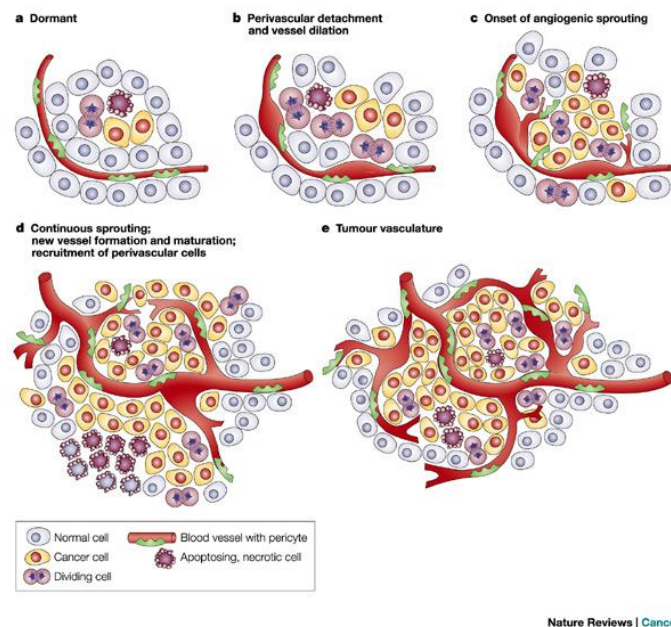
**Figura 1.1:** La cascata angiogenica, fasi e cellule coinvolte nel processo.

#### 1.4.1 Angiogenesi tumorale

L'angiogenesi tumorale è un processo di formazione di una rete vasale all'interno di un tessuto neoplastico ed in partenza dallo stesso. I tumori solidi sono strettamente dipendenti dalla formazione di nuovi vasi: "un tessuto neoplastico senza un letto vascolare non può crescere oltre il diametro di 1-2 mm"<sup>[16]</sup>.

La crescita tumorale procede infatti attraverso varie tappe. La prima fase consiste nella perdita del controllo della proliferazione cellulare, le cellule cominciano a dividersi rapidamente e formano un piccolo carcinoma *in situ* (2-3 mm<sup>2</sup>). In questo stadio le cellule

possono ottenere l'ossigeno ed i nutrienti necessari alla sopravvivenza ed alla crescita, ed eliminare i cataboliti prodotti attraverso un processo di semplice diffusione passiva<sup>[17]</sup>. Successivamente, più la massa tumorale cresce, più le cellule si trovano lontane dai capillari, la crescita tumorale si blocca e raggiunge uno stadio (*steady state*) in cui un uguale numero di cellule si riproduce e muore a causa della mancanza di ossigeno e nutrienti<sup>[18]</sup>. Dopo diversi mesi o anni, il tumore può acquisire il fenotipo angiogenico (*angiogenic switch*) e indurre la formazione di nuovi capillari (Fig. 1.2).



**Figura 1.2:** Lo switch angiogenico.

Lo **switch angiogenico** è un fenomeno causato da un rimaneggiamento dell'espressione genica, responsabile dell'alterazione dell'equilibrio fra i fattori stimolanti ed inibenti l'angiogenesi.

L'acquisizione di tale fenotipo da parte di alcune cellule tumorali consente la formazione di un'adeguata trama vascolare e la crescita esponenziale della neoplasia. I vasi che si formano nei tumori presentano spesso delle anomalie, caratterizzati da un elevato ricambio delle cellule endoteliali, fenestrazioni ed interruzioni della membrana basale, una scarsa presenza di periciti, una disomogenea organizzazione e distribuzione delle cellule.

I nuovi vasi, quindi, presentando una parete sottile con scarso sviluppo della membrana basale, risultano facilmente attraversabili dalle cellule neoplastiche e, perciò, rappresentano una vantaggiosa via d'accesso al circolo. È per questo motivo che oltre ad essere un processo essenziale per la crescita della massa primitiva, l'angiogenesi ha una speciale importanza nel permettere la diffusione metastatica.

#### **1.4.2 VEGF (Fattore di Crescita dell' Endotelio Vascolare)**

Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare, **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)** è uno dei fattori proangiogenici ad oggi più studiato e maggiormente caratterizzato<sup>[19]</sup>. Nonostante la crescente importanza acquisita negli ultimi anni da altre molecole, l'attivazione del VEGF sembra, costituire il punto critico, limitativo del processo angiogenico sia fisiologico che patologico. Anche alla luce delle molteplici variabili che ne influenzano la regolazione, questo fattore presenta attualmente una notevole importanza quale marcatore diagnostico, prognostico e come bersaglio terapeutico in molte patologie<sup>[20, 21]</sup>.

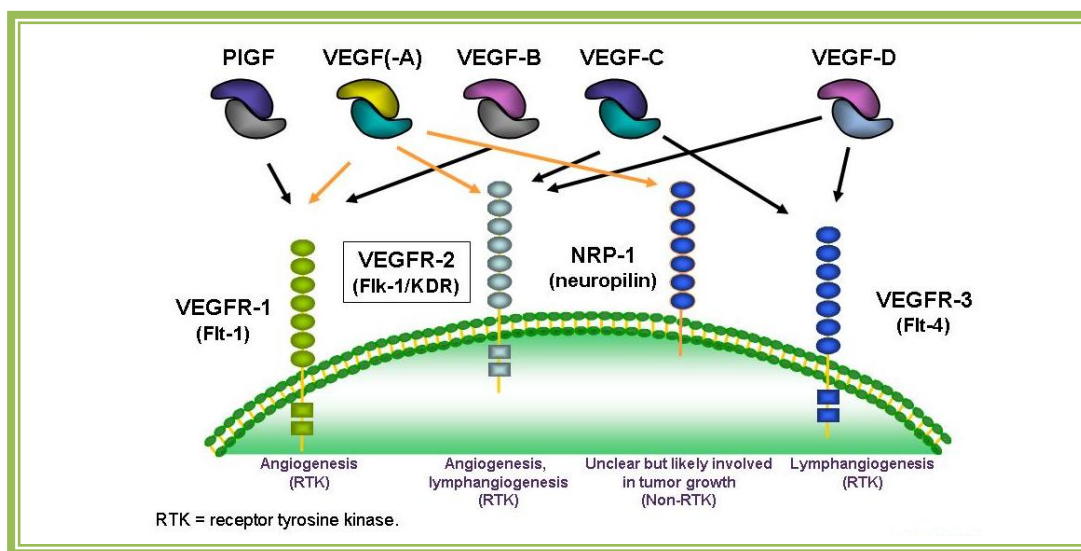
#### **La famiglia dei VEGF**

La famiglia dei geni correlati a VEGF comprende fattori di crescita coinvolti nell'angiogenesi e nella linfoangiogenesi; è costituita da sei glicoproteine secrete note come VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e il fattore di crescita placentare (PlGF)-1 e -2 (Fig. 1.3).

VEGF-A (comunemente chiamato VEGF) è una glicoproteina di 45-kDa omodimerica con diverse attività angiogeniche. Il gene che codifica per VEGF-A è localizzato sul cromosoma 6 e, attraverso il fenomeno dello splicing alternativo, è prodotto in 4 isoforme diverse: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> e VEGF<sub>206</sub>. Inoltre, sono state identificate le varianti VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>183</sub>, comunemente meno espresse.

VEGF<sub>165</sub> esiste in entrambe le forme, sia quella solubile che quella legata alla matrice extracellulare, è la forma predominante ed è comunemente sovraespressa in una grande varietà di tumori solidi.

VEGF-A riveste un ruolo essenziale in alcuni processi angiogenici postnatali, inclusa la rimarginazione delle ferite, l'ovulazione, la mestruazione, il mantenimento della pressione sanguigna e la gravidanza; è stato inoltre correlato a diverse condizioni patologiche associate con l'incremento dell'angiogenesi, comprese artriti, psoriasi, degenerazioni maculari e retinopatie diabetiche.



**Figura 1.3:** Specificità di legame dei vari membri della famiglia VEGF e dei loro recettori.

#### 1.4.3 I recettori del VEGF

I ligandi VEGF mediano i loro effetti angiogenici attraverso alcuni tipi di recettori. Inizialmente furono identificati due recettori sulle cellule endoteliali e furono caratterizzati come i recettori specifici VEGFR-1 e -2.

Oggi è ben noto che VEGFR-1 e VEGFR-2 (detto anche KDR) sono espressi anche in molte linee cellulari emopoietiche nell'adulto. Questi due recettori condividono il 44% di omologia e posseggono una struttura caratteristica consistente di sette domini extracellulari di tipo immunoglobulinico, un singolo dominio transmembrana, e un



dominio intracellulare tirosin-chinasico interrotto dall'inserimento di un dominio chinasico. Più recentemente è stato identificato un ulteriore recettore tirosin-chinasico, VEGFR-3, la cui espressione avviene solo sulla superficie delle cellule endoteliali dei vasi linfatici dell'adulto, ed è quindi implicato primariamente nella linfoangiogenesi.

### **VEGFR-1**

VEGFR-1 presenta la maggior affinità di legame con il VEGF; tuttavia la sua attivazione conduce solo ad una debole autofosforilazione. L'assenza, nelle cellule endoteliali, di segni di proliferazione o migrazione correlabili all'attivazione del VEGFR-1, ha permesso di supporre che questa proteina non sia principalmente implicata nel processo pro-angiogenico, ma, piuttosto, costituisca un recettore "trappola". Il VEGFR-1 sembra modulare in senso negativo l'attività del VEGF sulle cellule endoteliali, prevenendo o limitando il legame di quest'ultimo al VEGFR-2.

### **VEGFR-2 (KDR)**

Il VEGFR-2 possiede un ruolo chiave nello sviluppo angiogenico ed ematopoietico. La mancanza di questa proteina negli embrioni di cavia, non permette loro di sopravvivere oltre l'ottavo o il nono giorno di gestazione. Il VEGFR-2 è ampiamente espresso da numerosi precursori cellulari, sia endoteliali, che ematopoietici, ma non dalle cellule vasali quiescenti, in cui si realizza una down-regulation. L'attivazione di questo recettore (ad opera di VEGF-A, -C, -D) si rende responsabile della proliferazione, migrazione e dell'aumento della permeabilità delle cellule endoteliali. Tale attivazione è inoltre necessaria perché si realizzi l'effetto antiapoptotico del VEGF. La regolazione dell'espressione di questo recettore, così come quella del VEGFR-1, si realizza attraverso diversi meccanismi. L'ipossia rappresenta il principale induttore ma numerosi sono i fattori di crescita implicati nell'attivazione del VEGFR-1, tra cui il VEGF stesso, il TNF- $\alpha$  ed il TGF- $\beta$ , nonché l'interazione fra le cellule endoteliali o fra cellule e matrice extracellulare<sup>[22]</sup>.

### **Effetti biologici del VEGF**

- **Aumento della permeabilità vasale:** conosciuto anche come Vascular Permeability Factor (VPF), il VEGF è in grado di indurre un importante aumento dell'essudazione vasale. VEGF aumenta la permeabilità in una varietà di letti vascolari inclusi quelli della pelle, delle pareti peritoneali, del mesentere e del diaframma e può portare a condizioni patologiche come ascite maligna ed effusioni pleurali maligne.

Uno studio ha dimostrato che le macromolecole attraversano l'endotelio tramite una via cellulare transendoteliale, coinvolgendo organelli vescico-vascolari indotti da VEGF<sup>[23]</sup>. Altri studiosi hanno proposto che VEGF induca fenestrazioni endoteliali che assicurano un'ulteriore via transcellulare per il travaso di soluti o che VEGF porti all'aumento della via interendoteliale, attraverso l'apertura di giunzioni tra cellule endoteliali adiacenti.

- **Inibizione dei fenomeni apoptotici ed aumento dell'emivita:** VEGF ha dimostrato inizialmente di agire come un fattore di sopravvivenza per le cellule endoteliali della retina e successivamente di promuovere la sopravvivenza di varie cellule endoteliali in modelli *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, VEGF inibisce l'apoptosi attivando la via PI3K-Akt (Fig. 1.4) in aggiunta alla sovraregolazione di proteine anti-apoptotiche come bcl-2 e A1; queste, a loro volta, inibiscono l'attivazione delle caspasi a monte e sovraregolano membri della famiglia degli inibitori di apoptosi.
- **Proliferazione:** VEGF è un mitogeno per le cellule endoteliali. La proliferazione delle cellule endoteliali appare coinvolgere l'attivazione mediata da VEGFR-2 della chinasi extracellulare Erk1/2 a sua volta attivata da MEK. L'attività mitogenica di VEGF potrebbe, inoltre, coinvolgere la via della protein chinasi C, forse in parte regolata da NO (Fig. 1.4)<sup>[24]</sup>.
- **Invasione e migrazione:** la degradazione della membrana basale è necessaria per la migrazione delle cellule endoteliali e per l'invasione ed è un'importante prima tappa verso l'attivazione dell'angiogenesi. VEGF stimola una varietà di enzimi e di proteine importanti nel processo di degradazione, incluse le metalloproteinasi degradanti la

matrice, le metalloproteinasi interstiziali, le collagenasi e alcune serinaproteasi come l'attivatore del plasminogeno urochinasi (uPA) e l'attivatore del plasminogeno di tipo tissutale (TTPA). L'attivazione di questi composti porta ad un ambiente favorevole alla degradazione che facilita la migrazione e il diffondersi di cellule endoteliali<sup>[25]</sup>.

### **Struttura e trasduzione del segnale da parte di VEGFR-2 (KDR).**

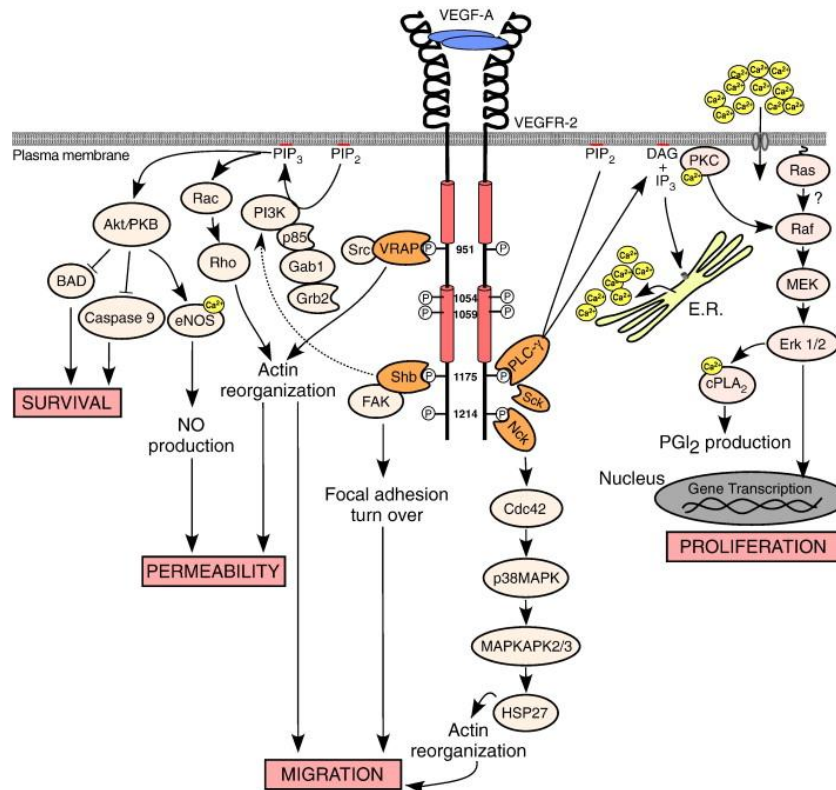
VEGFR-2 è costituito, nell'uomo, da 1356 aminoacidi, rispettivamente organizzati in quattro regioni: un dominio extracellulare responsabile dell'interazione con il ligando, un dominio transmembrana, un dominio tirosin-chinasico, e la regione carbossilica terminale.

La regione extracellulare dei recettori VEGFR è composta da sette domini di tipo immunoglobulinico, ed il sito di legame per VEGF-A è localizzato a livello del secondo/terzo dominio immunoglobulino-simile. La porzione di struttura extracellulare, compresa tra il quarto e il settimo dominio, gioca un ruolo fondamentale nella dimerizzazione e attivazione del recettore.

Il dominio tirosin-chinasico del recettore VEGFR-2 è separato in due porzioni e presenta una sequenza aminoacidica di circa 70 amminoacidi.

VEGFR-2 è il principale trasduttore di segnale positivo sia per l'angiogenesi fisiologica che patologica. Questa trasduzione è fondamentale per la differenziazione dei precursori delle cellule endoteliali in cellule endoteliali vascolari e per la loro proliferazione. Da studi effettuati su topi, si è potuto affermare che una ridotta attivazione dei recettori VEGFR-2 può comunque essere sufficiente a promuovere la vasculogenesi e una parziale angiogenesi, ma non è invece sufficiente a garantire un'adeguata morfogenesi del cuore e dell'aorta. Tramite stimolazione con VEGF-A, VEGFR-2 viene autofosforilato in prossimità della terminazione carbossilica, nella regione contenente la chinasi. Nel VEGFR-2 umano possono essere fosforilati parecchi residui tirosinici. In particolare il residuo tirosinico 1175 è il sito di legame per il dominio SH2 della fosfolipasi-C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), la quale, una volta fosforilata può attivare la cascata PKC-c-Raf-MEK-ERK. Esperimenti effettuati nei topi

evidenziano che la sostituzione del residuo tirosinico 1175 porta alla morte nella fase embrionale, e questo sottolinea la grande importanza che ha, *in vivo*, la cascata di eventi VEGFR2-1175PY-PLC $\gamma$ -PKC<sup>[25]</sup>.



**Figura 1.4:** L'attivazione di KDR porta a dimerizzazione del recettore e autofosforilazione dei residui tirosinici nel dominio intracellulare. A seconda del residuo tirosinico fosforilato si attivano diverse cascate del segnale.

#### 1.4.4 Terapie anti-VEGF e anti-VEGFR

Le strategie terapeutiche anti-VEGF o anti-VEGFR sono un approccio interessante per il trattamento dei tumori. Infatti, terapie antiangiogeniche risultano meno tossiche della chemioterapia convenzionale, anche se la terapia anti-VEGF da sola non è sufficiente nel trattamento del cancro, e per questo viene spesso affiancata alla chemioterapia classica.

Si è supposto che l'inibizione del VEGF, specialmente nelle prime fasi del trattamento, porti alla normalizzazione del flusso sanguigno, potenziando la distribuzione di agenti

tossici al tumore e portando alla morte delle cellule endoteliali e tumorali proliferanti. Inoltre, con la prosecuzione della terapia anti-angiogenica, viene inibita la crescita dei nuovi vasi tumorali, portando alla privazione nutrizionale e alla morte delle cellule tumorali.

Le cellule endoteliali che costituiscono l'albero vascolare sono geneticamente stabili e non condividono le alterazioni geniche delle cellule tumorali, conseguentemente farmaci che inibiscono l'angiogenesi dovrebbero essere meno inclini ad indurre resistenza<sup>[26]</sup>, in realtà è stato recentemente osservato che alcuni tumori possono diventare farmaco resistenti<sup>[27]</sup>. È possibile, infatti, che durante la progressione tumorale le cellule possano sovraesprimere diversi fattori angiogenici. Inoltre, cloni di cellule tumorali potrebbero sopravvivere meglio in condizioni d'ipossia<sup>[27]</sup>.

Molti agenti che inibiscono la via del VEGF sono attualmente in via di sviluppo, tra questi: ribozimi, anticorpi monoclonali anti-VEGF, VEGFR solubili e molecole inibitrici a basso peso molecolare.

- **Molecole inibitrici a basso peso molecolare:** possono essere di tipo I, se agiscono come inibitori competitivi dell'ATP, riconoscendo la conformazione attiva della chinasi; di tipo II se si legano alla conformazione inattiva della chinasi; di tipo III se sono dei composti che si legano ad un sito allosterico e di tipo IV se formano legami covalenti con il sito attivo della chinasi<sup>[28]</sup>.

**SU5416** (semaxanib), un derivato dell'indolin-2-one 3-sostituito, è uno specifico e potente inibitore del recettore VEGFR-2. Questo composto inattiva il recettore tirosin-chinasico, andando ad impedire il legame tra l'ATP e il suo sito di legame situato nella porzione catalitica intracellulare del recettore VEGFR-2. In particolare il core della molecola costituito dall'indolin-2-one si lega alla porzione normalmente occupata dall'adenina formando legami idrogeno, mentre la catena laterale di SU5416 si estende nella regione della tasca idrofobica.

Saggi *in vitro* di mitogenesi con cellule endoteliali umane di vena ombelicale (HUVEC), hanno messo in evidenza che SU5416 inibisce la risposta mitogenica in seguito a stimolazione con VEGF.

Studi *in vivo* indicano che questo composto riduce la crescita della massa tumorale del 92%, la permeabilità e la densità dei nuovi vasi tumorali. Inoltre semaxanib sembra essere ben tollerato dai pazienti grazie ad una ridotta tossicità.

Il limite di questo composto è la ridotta solubilità ed è per questo che sono stati sintetizzati analoghi più solubili.

Un esempio è SU11248 (sunitinib), inibitore multi-bersaglio somministrato oralmente, che presenta affinità per VEGFR-1, -2 e PDGFR. Sunitinib è stato testato in trattamento clinico in pazienti con cancro metastatico renale, nei tumori gastrointestinali dello stroma e nel cancro al seno. Dal 2006 è stato approvato dalla FDA per il trattamento del cancro metastatico gastrointestinale e renale.

PTK787 (valatanib) è un potente inibitore di VEGFR-1 e -2, ad elevate concentrazioni agisce anche contro PDGFR e c-kit. PTK787 ha un'elevata biodisponibilità orale, diminuisce significativamente la crescita tumorale in vari modelli tumorali sperimentali e sembra avere un'attività promettente nei pazienti con metastasi epatiche. Altri importanti inibitori vengono riportati in Tabella 1.2.

AGENTE	CLASSE	BERSAGLIO	PRODUTTORE
Bevacizumab	MAB	VEGF-A	Genetech
IMC-1121B	MAB	VEGFR-2	ImClone
PTK-787 (Valatanib)	TKI	VEGFR-1, -2	Novartis
AEE788	TKI	VEGFR-2, EGFR	Novartis
ZD6474	TKI	VEGFR-1, -2, -3, EGFR	AstraZeneca
AZD2171	TKI	VEGFR-1, -2	AstraZeneca
SU11248 (Sunitinib)	TKI	VEGFR-1, -2, PDGFR	Pfizer
SU5416 (Semaxanib)	TKI	VEGFR-2	Pfizer
AG13925	TKI	VEGFR-1, -2	Pfizer
AG013736	TKI	VEGFR-1, -2	Pfizer
VEGF-trap	Recettore ibrido solubile	VEGF-A, PIGF	Aventis
GW786024	TKI	VEGFR-1, -2, -3	GlaxoSmithKline
BAY 93-4006	TKI	VEGFR-1, -2, PDGFR	Bayer
BAY 43-9006 (Sorafenib)	TKI	VEGFR-2, -3, RAF, PDGFR,	Bayer
AMG706	TKI	VEGFR-1, -2, -3	Amgen
Abbreviazioni: VEGF fattore di crescita endoteliale vascolare; VEGFR recettore del fattore di crescita endoteliale vascolare; MAB anticorpo monoclonale; TKI inibitore tirosinchinasi; EGFR recettore del fattore di crescita epidermico; PIGF fattore di crescita placentale; PDGFR recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine			

**Tabella 1.2:** *inibitori di VEGF/ VEGFR in corso di studio.*

## 1.5 TERAPIA ORMONALE: CARCINOMA MAMMARIO

Il carcinoma mammario rappresenta un esempio di neoplasia ormono-dipendente, sia duttale sia lobulare, della ghiandola mammaria.

La prima linea d'intervento resta, la rimozione chirurgica del tessuto malato. Sulla massa rimossa dai chirurghi, è eseguita una biopsia per la caratterizzazione del tumore: in caso di malignità, per definire la terapia che seguirà il trattamento chirurgico, deve essere identificata e quantizzata la presenza di recettori ormonali degli estrogeni (ER) e del fattore di crescita HER2<sup>[29]</sup>.

La terapia chirurgica e la radioterapia possono essere seguite dalla terapia ormonale o dalla chemioterapia, quest'ultima di solito somministrata in regime di polichemioterapia, riduce significativamente il rischio di ripresa e morte nelle pazienti con tumore della mammella operabili<sup>[30]</sup>. Gli antitumorali più comunemente utilizzati per la chemioterapia

sono la ciclofosfamide, il metotressato e il fluorouracile così come i tassani e le antracicline<sup>[30]</sup>.

L'ormonoterapia è indicata in tutte le pazienti con tumori in cui è stata dimostrata la presenza di recettori per gli estrogeni o per il progesterone, non ha quindi nessuna indicazione nei tumori privi di recettori ormonali. Essa consiste nella somministrazione di farmaci in grado di interferire con l'attività fisiologica degli estrogeni, responsabili dell'accrescimento e dello sviluppo del carcinoma mammario ormono-responsivo<sup>[30]</sup>.

Gli effetti pleiotropici e tessuto-specifici degli estrogeni sono mediati da due diversi recettori nucleari, ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Questi, attivati dal legame con l'ormone, formano omodimeri ed eterodimeri e agiscono da fattori trascrizionali nella regolazione dell'espressione di geni estrogeno-responsivi, legandosi direttamente al DNA (azione genomica degli estrogeni). Oltre a questo classico meccanismo d'azione è nota una via alternativa di trasduzione del segnale che prevede l'interazione, a livello citoplasmatico, del complesso recettore-ormone con effettori di diverse vie di trasduzione in grado di indurre risposte cellulari rapide e transitorie (azione non genomica degli estrogeni)<sup>[30-32]</sup>.

Per contrastare gli effetti dell'ormone sulle cellule tumorali, i livelli d'intervento sono tre: (1) impedire che la cellula tumorale interagisca con l'ormone bloccando il recettore posto sulla membrana plasmatica della cellula stessa, (2) ridurre la produzione di estrogeni inibendo l'enzima aromatasi che catalizza la conversione di androgeni in estrogeni, e (3) bloccare la produzione di estrogeni prodotti dalle ovaie<sup>[29]</sup>.

### **1.5.1 SERMs (Selective Estrogen-Receptor Modulators)**

Diversamente dagli estrogeni, agonisti puri, e dagli antiestrogeni, antagonisti puri, i SERMs, composti molto usati nella clinica, esercitano un effetto agonista o antagonista a seconda del tessuto in cui sono presenti i recettori dell'estrogeno. I SERMs mancano della struttura steroidea tipica degli ormoni, tuttavia posseggono una struttura terziaria che li rende capaci di complessarsi al recettore estrogenico<sup>[33]</sup>.



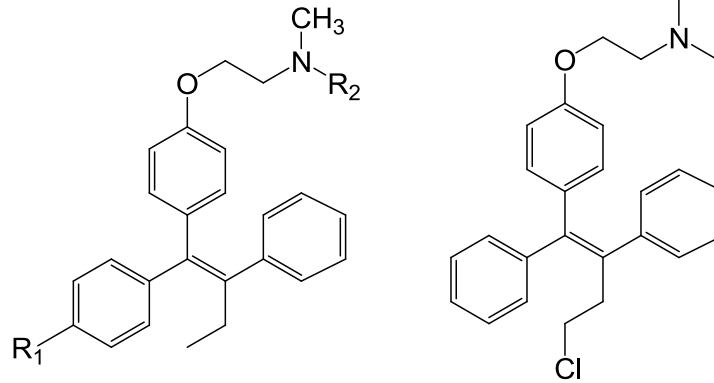
## Tamoxifene

Il tamoxifene (Fig. 1.5) appartiene alla famiglia dei trifeniletileni non steroidei. È la terapia ormonale “storica” del cancro alla mammella ed è stato considerato a lungo come molecola di riferimento. Sintetizzato nel 1966, fu approvato dalla FDA nel 1970 e reso disponibile per il trattamento di prima linea nelle donne in menopausa con cancro metastatico al seno. La sua efficacia (70% di risposta nei tumori estrogeno-responsivi) e l’assenza di gravi effetti tossici tipici dei chemioterapici classici, hanno fatto sì che l’indicazione terapeutica del tamoxifene non sia cambiata e che continui ad essere considerato il trattamento standard per le donne in premenopausa che sviluppano un tumore al seno ormono-responsivo<sup>[6, 34]</sup>.

La via orale è la più indicata per l’assunzione di tamoxifene. È assorbito velocemente dal tratto gastrointestinale con una biodisponibilità del 100% e si lega per il 99% alle proteine plasmatiche in particolar modo all’albumina. La farmacocinetica del tamoxifene appare essere bifasica, con una fase di distribuzione di 7-14 ore e una fase di eliminazione di 7 giorni.

Il tamoxifene di per sè ha un’affinità relativamente bassa per la sua proteina bersaglio, il recettore per gli estrogeni. Viene metabolizzato a livello epatico in metaboliti attivi come il 4-idrossitamoxifene e l’N-desmetil-4-idrossitamoxifene (endoxifen) (Fig. 1.5), che hanno invece un’affinità per il bersaglio molecolare dalle 3 alle 10 volte maggiore rispetto al precursore. Per questo motivo il tamoxifene viene considerato un pro-farmaco.

A livello molecolare il tamoxifene e i suoi metaboliti competono con il  $\beta$ -estradiolo per il legame al recettore estrogenico. Studi strutturali hanno permesso di evidenziare come il complesso tamoxifene-recettore induca una conformazione tale da non permettere il reclutamento di co-attivatori per la trascrizione genica, anzi, in molti tessuti bersaglio, tra cui il tessuto mammario, si evidenzia il reclutamento di co-repressori<sup>[31]</sup>.



(Tamoxifene)  $R_1 = H$ ,  $R_2 = CH_3$   
 (4-idrossitamoxifene)  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = CH_3$   
 (Endoxifen)  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = H$

Toremifene

**Figura 1.5:** Tamoxifene, 4-idrossitamoxifene, endoxifen (*N*-desmetil-4-idrossitamoxifene) e toremifene.

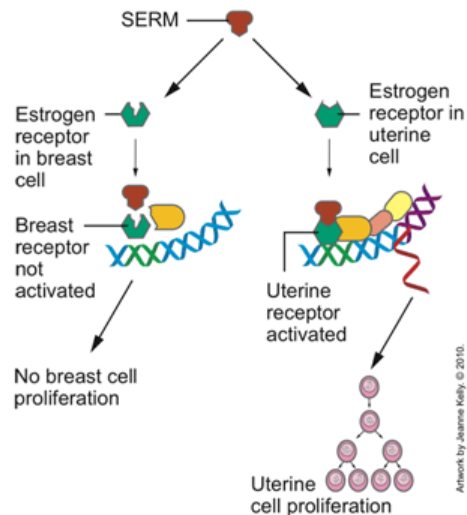
In questo modo è inibita l'espressione di geni estrogeno-indotti, inclusi quelli che sono implicati nel processo di proliferazione cellulare e trasformazione maligna del tumore estrogeno-dipendente<sup>[31]</sup>. La molecola pertanto rallenta la crescita delle cellule tumorali, inibendo la loro progressione nella fase  $G_1$  del ciclo cellulare, esercitando quindi un'azione più citostatica che citotossica.

Il tamoxifene non è un antagonista puro del recettore degli estrogeni ma anzi, in vari distretti corporei esso si comporta come un parziale agonista.

Il parziale agonismo rappresenta un beneficio in alcuni distretti corporei come nel sistema scheletrico: nelle donne in menopausa aiuta a prevenire la demineralizzazione ossea, diminuendo il numero di fratture e combattendo l'osteoporosi. Inoltre in donne che assumono tamoxifene, si può notare come il quadro sierico dei lipidi sia avvantaggiato con la diminuzione dei livelli delle LDL<sup>[33]</sup>.

Tuttavia l'azione agonista del tamoxifene presenta, a lungo termine, effetti collaterali assai gravi come l'aumento del rischio di cancro uterino (per stimolazione della crescita delle cellule endometriali che presentano il recettore per gli estrogeni), l'aumentata predisposizione per eventi tromboembolici ed infarto (Fig. 1.6).

L'esistenza di queste gravi conseguenze ha limitato l'uso del farmaco rivolgendo l'attenzione soprattutto alla durata e al rapporto rischio-beneficio della terapia con SERMs. Gli studi hanno dimostrato che la durata ottimale della cura con tamoxifene è di 5 anni: allungare la durata del trattamento non porta ad aumento del beneficio ma ad aumento degli effetti collaterali a lungo termine<sup>[29]</sup>.



**Figura 1.6:** Meccanismo d'azione del tamoxifene<sup>[35]</sup>.

## Toremifene

Il toremifene (Fig. 1.5) è una molecola correlata strutturalmente e farmacologicamente al tamoxifene. Differisce da esso per la presenza di un cloro sulla catena laterale etilica. Approvato dall'FDA e dall'EMA per il trattamento del cancro metastatico avanzato, era stato sintetizzato per ridurre gli effetti collaterali del tamoxifene, ma dati clinici hanno dimostrato come esso possieda la stessa attività e gli stessi effetti collaterali del precursore<sup>[36]</sup>.

## Raloxifene

SERMs di seconda generazione, era stato introdotto in terapia per il trattamento del cancro al seno ormono-responsivo, ma il suo uso fu abbandonato poiché i dati clinici mostrarono come non possedesse nessuna attività nei confronti dei tumori resistenti al tamoxifene<sup>[35]</sup> e fosse privo di attività estrogenica, sia nel tessuto mammario sia nel tessuto endometriale. Per queste ragioni, la U.S. Food and Drug Administration (FDA), nel 2007, ha approvato il farmaco come trattamento preventivo nelle donne in post menopausa, con e senza osteoporosi, ad alto rischio per il cancro al seno invasivo<sup>[36, 37]</sup>.

Studi recenti hanno dimostrato come il raloxifene non aumenti il rischio di carcinoma endometriale, ma è stato anche evidenziato come la molecola predisponga a tromboembolismi venosi ed eventi avversi a livello del sistema cardiovascolare<sup>[36]</sup>.

### 1.5.2 SERD (Selective Estrogen-Receptor Down-regulator)

Gli antiestrogeni puri sono stati sintetizzati come una valida scelta per le pazienti che non rispondevano più alla terapia con il tamoxifene, e per evitare l'attività estrogenica sul tessuto endometriale che portava ad alto rischio di cancro all'utero.

Gli antiestrogeni puri non hanno alcuna attività estrogena in nessun tessuto; offrono quindi una possibilità di trattamento aggiuntivo una volta che si sia verificata la resistenza al tamoxifene.

### 1.5.3 Inibitori dell'aromatasi

Nelle donne in età fertile la maggior parte degli estrogeni in circolo viene prodotta dalle ovaie. Quando subentra la menopausa, le ovaie cessano questa loro capacità funzionale, tuttavia permangono in circolo livelli minimi di estrogeni che sono prodotti a livello dei tessuti periferici.

L'aromatasi è un enzima che catalizza la reazione di aromatizzazione responsabile della conversione dell'androstenedione e del testosterone in estrone ed estradiolo.

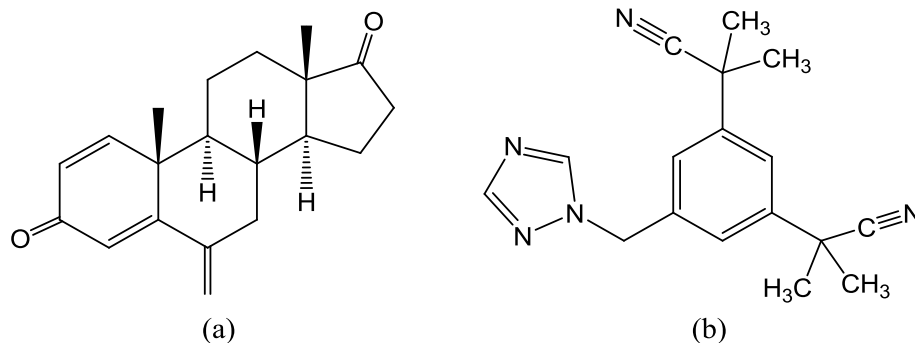
L'aromatasi è presente in alte concentrazioni nella placenta e nelle cellule della granulosa dei follicoli ovarici e in concentrazioni meno rilevanti nel grasso sottocutaneo, nel fegato, nei muscoli e nel cervello<sup>[38]</sup>.

La produzione di estrogeni in donne in menopausa è quasi completamente ascrivibile all'azione delle aromatasi periferiche, soprattutto a quelle presenti nel tessuto grasso sottocutaneo: esiste, infatti, una correlazione diretta tra l'aumento del tessuto adiposo e i livelli ematici di estrogeni in donne in post-menopausa<sup>[38]</sup>.

La maggior parte dei carcinomi mammari esprime attività aromatasi intratumorale. Tale attività condiziona fortemente i livelli intratumorali di estrogeni (giustificando una concentrazione di estradiolo, all'interno del tessuto tumorale, superiore talora di dieci volte rispetto a quella dei valori plasmatici)<sup>[39]</sup>.

Gli inibitori dell'aromatasi impediscono la conversione degli androgeni ad estrogeni, quindi hanno un potenziale terapeutico sul controllo delle funzioni riproduttive e sulla crescita di tumori estrogeno-dipendenti.

I farmaci si dividono in due categorie: gli inibitori con struttura steroidea (tipo I) e quelli con struttura non steroidea (tipo II). Alla prima categoria appartiene l'exemestano (*Aromasin*<sup>®</sup>) (Fig. 1.7), che si lega irreversibilmente all'aromatasi agendo come inibitore suicida e sopprimendo l'attività dell'enzima del 97.7%<sup>[6]</sup>.



**Figura 1.7:** Exemestano(a) e anastrozolo (b)

Gli inibitori di tipo II sono l'anastrozolo (*Arimidex®*) (Fig. 1.7) e il letrozolo (*Femara®*), che inibiscono in modo reversibile l'aromatasi<sup>[6]</sup>. Questi composti non influenzano in modo significativo la produzione di steroidi da parte del surrene, non modificano i livelli basali di cortisolo e di aldosterone, ed hanno il vantaggio di essere somministrati per via orale.

Il tamoxifene rimane ancora oggi la terapia di riferimento soprattutto per la mancanza di informazioni sugli effetti collaterali a lungo termine degli inibitori dell'aromatasi e nelle donne in età fertile. A esse, infatti, è sconsigliato l'uso di questa classe di farmaci: la soppressione dell'aromatasi e la diminuzione degli estrogeni circolanti porta, per feedback negativo all'ipotalamo e all'ipofisi, ad un aumento del rilascio di gonadotropina con aumento di produzione di estrogeni dalle ovaie e un loro aumento di dimensioni e di peso<sup>[38]</sup>.

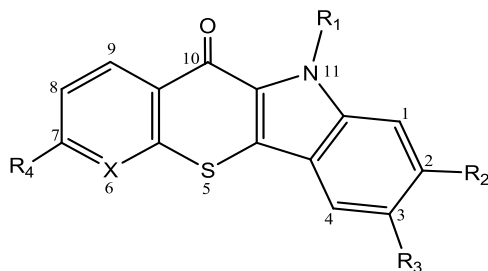
## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo sviluppo di principi attivi caratterizzati da promettente attività antiproliferativa, che agiscono con maggiore specificità e provocano minimi effetti collaterali rappresenta ad oggi un obiettivo importante per la ricerca scientifica contro il cancro.

In questo lavoro di dottorato di ricerca sono stati presi in esame tre gruppi di composti di nuova sintesi caratterizzati da diverse strutture chimiche. Il primo gruppo, denominato **A**, è costituito da dodici derivati benzo- e pirido-tiopiranoindolici, progettati allo scopo di agire mediante meccanismo intercalativo; il secondo gruppo, indicato con **B**, comprende ventisette derivati benzotiopiranopirimidinici, a possibile attività antiangiogenica; il terzo gruppo, **C**, consta di quattordici derivati analoghi del tamoxifene, farmaco di riferimento nella terapia del cancro al seno ormono-responsivo.

### **Gruppo A: Derivati benzo- e pirido-tiopiranoindolici**

Studi precedenti su derivati benzotiopiranoindolici, caratterizzati da catene dialchilaminoalchiliche legate all'azoto indolico e con sostituenti metossi o cloro nelle posizioni 7 o 3 del tetraciclo (Fig. 2.1), hanno dimostrato un significativo effetto antiproliferativo su diverse linee cellulari tumorali umane. Tali risultati avevano suggerito che la catena laterale dialchilaminoalchilica, inserita nella posizione 11 dell'eterociclo, fosse necessaria per la citotossicità. Infatti, derivati privi di questa sostituzione non manifestavano un'attività antiproliferativa significativa. In particolare il maggiore effetto si osservava nel composto caratterizzato dalla catena dimetilamminoetilica e da un gruppo metossilico nella posizione 7 del tetraciclo<sup>[40]</sup>.



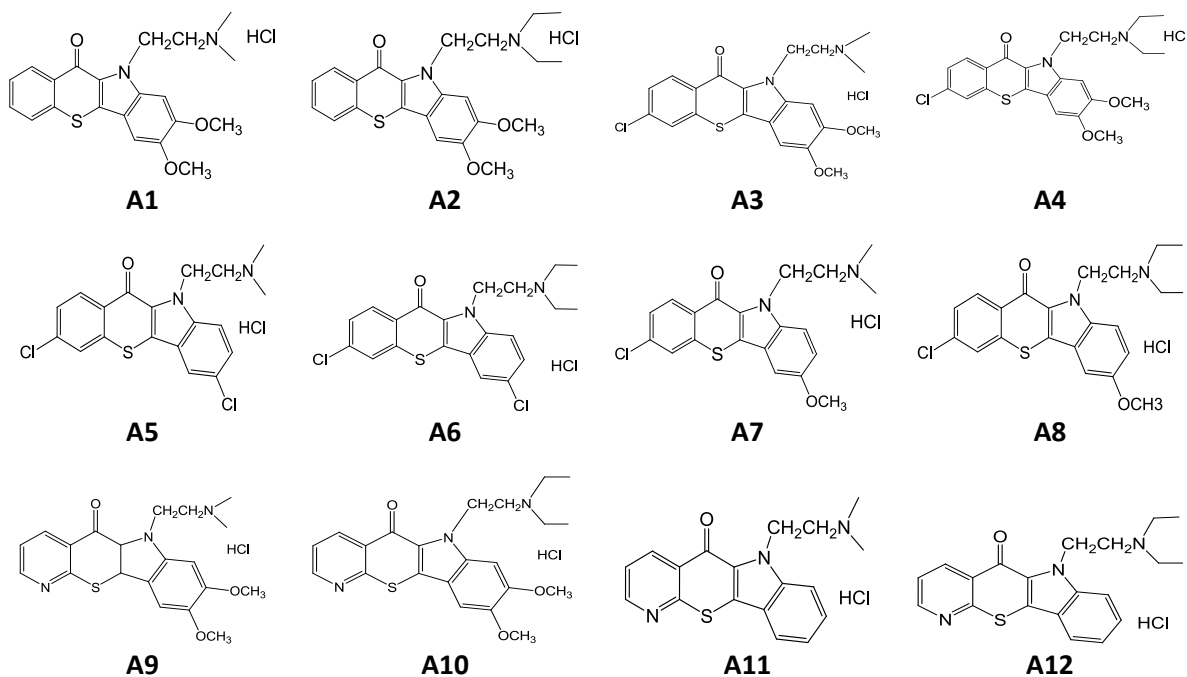
**Figura 2.1:** Struttura generale dei composti del gruppo A.

Un approfondimento sul meccanismo d'azione aveva dimostrato che questi derivati sono in grado di formare un complesso di tipo intercalativo con il DNA con un'alta specificità per le regioni ricche in AT. Si era anche evidenziato che la catena laterale gioca un ruolo cruciale nella formazione del complesso, avvicinando, verosimilmente attraverso interazioni elettrostatiche, il ligando al DNA e favorendo pertanto l'inserzione del tetraciclo tra le coppie di basi. Inoltre, questi derivati avevano mostrato la capacità d'inibire il rilassamento del DNA plasmidico superavvolto mediato dalla topoisomerasi II in maniera dose-dipendente e in accordo con l'attività antiproliferativa.

Tutti questi interessanti risultati hanno suggerito d'ampliare la serie dei composti da studiare. In particolare si sono sintetizzati sia benzo che pirido analoghi (composti **A1-A8** per i benzo derivati e **A9-A12** per i pirido analoghi) aventi quindi una struttura tetraciclica pressochè planare e funzionalizzati con una catena laterale dimetilaminoetilica (derivati indicati con numero dispari) o dietilaminoetilica (derivati indicati con numero pari) (Tabella 2.1).

Dei nuovi derivati è stata valutata l'attività antiproliferativa su tre linee cellulari tumorali umane: **HeLa** (adenocarcinoma della cervice uterina), **A-431** (carcinoma a cellule squamose dell'epidermide) e **MSTO-211H** (mesotelioma bifasico). Il meccanismo d'azione è stato studiato valutando, attraverso misure di dicroismo lineare in flusso, la capacità dei composti di intercalarsi nel DNA. Mediante saggi *in vitro*, si è determinata la capacità di interferire con l'attività enzimatica che le DNA topoisomerasi I e II svolgono sul DNA plasmidico superavvolto. Inoltre, sono stati eseguiti esperimenti di citofluorimetria per evidenziare l'eventuale attivazione del processo apoptotico.





**Tabella 2.1:** Composti benzo- e pirido-tiopyranoindolici studiati (gruppo A).

## Gruppo B: Derivati benzotiopyranopirimidinici

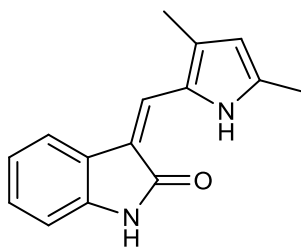
Lo studio di questo gruppo di composti si inserisce come parte di un programma di ricerca indirizzato alla preparazione e alla valutazione di nuovi agenti antiproliferativi antitumorali, nell'ambito del quale sono stati studiati diversi cromofori policiclici<sup>[5, 41-43]</sup> e tra questi si sono evidenziati derivati piridotiopyranopirimidinici caratterizzati da un'interessante attività antiproliferativa su cellule tumorali umane<sup>[43]</sup>. Allo scopo di ottenere nuovi composti più attivi e dotati di maggiore specificità sono state realizzate, su questo policiclo, alcune modifiche strutturali che hanno portato alla preparazione di derivati benzotiopyranopirimidinici variamente sostituiti. Lo studio dell'attività antiproliferativa di una serie di questi derivati aveva dimostrato che solo il derivato contenente una catena laterale aromatica<sup>[44]</sup> presentava un'attività citotossica promettente. Questo risultato e altri precedenti sui cromofori policiclici<sup>[44, 45]</sup> hanno suggerito di ampliare la famiglia di composti benzotiopyranopirimidinici, progettando nuovi derivati che consentissero di completare le relazioni struttura-attività precedentemente tracciate e di stabilire anche un eventuale ruolo dei differenti

sostituenti, con particolare interesse nei confronti del ruolo che gioca il gruppo NH. In particolare, è stato ipotizzato che questi nuovi prodotti possano condividere i requisiti farmacoforici adatti per un ancoraggio al sito di legame dell'ATP in tirosin-chinasi, tra i quali soprattutto il gruppo NH dell'anilina e agli atomi N<sub>1</sub> e N<sub>3</sub> della piridina che potrebbero appunto essere coinvolti in interazioni con residui critici della tasca catalitica<sup>[46, 47]</sup>.

Pertanto, in questo lavoro di dottorato sono stati studiati ventuno nuovi derivati benzotiofuranopirimidinici contenenti diverse catene laterali aromatiche e in particolare è stata determinata l'attività antiproliferativa su tre linee cellulari tumorali umane: HeLa, A-431 e MSTO-211H.

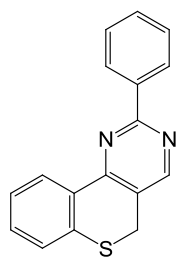
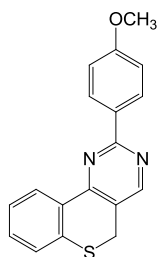
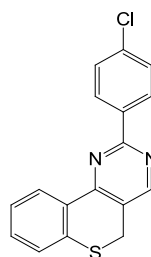
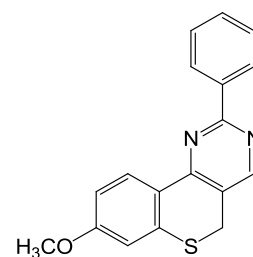
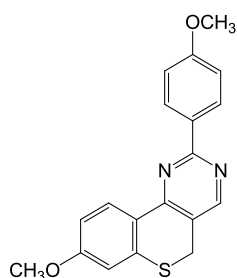
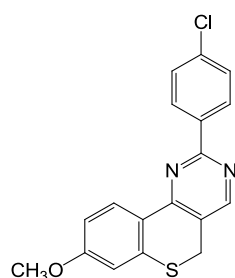
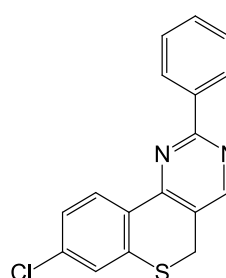
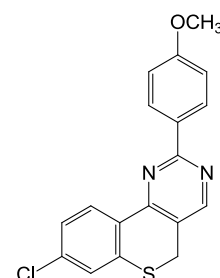
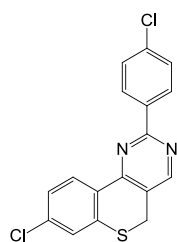
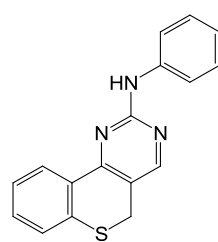
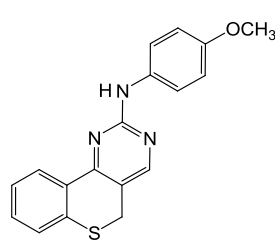
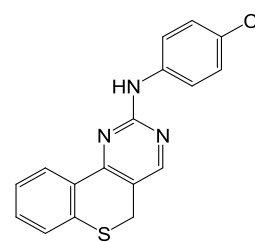
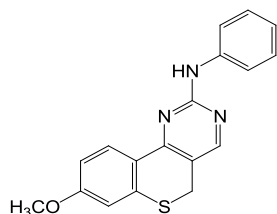
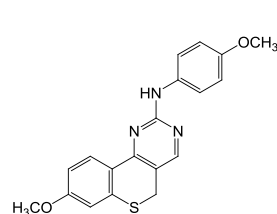
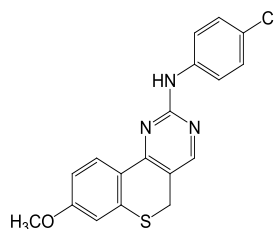
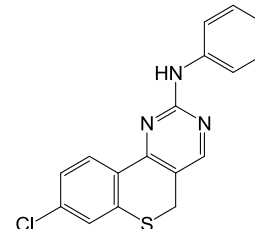
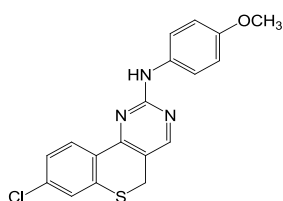
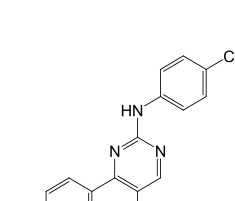
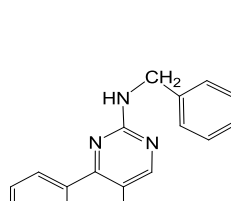
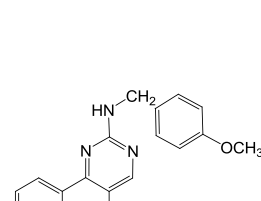
Dato che le cellule HUVEC (cellule dell'endotelio della vena ombelicale umana) sono un modello classico nello studio dell'angiogenesi associata ai tumori, si è provveduto ad ampliare lo studio dell'attività antiproliferativa dei composti esaminati, valutando la loro efficacia anche su tali cellule che, come è noto, esprimono il recettore KDR.

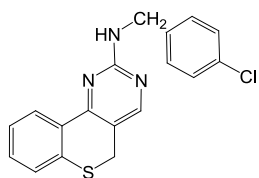
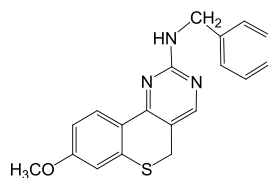
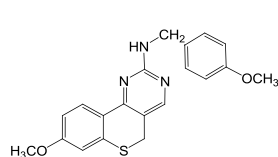
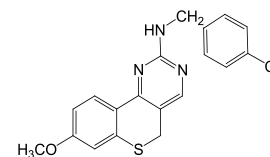
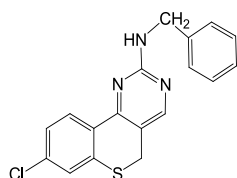
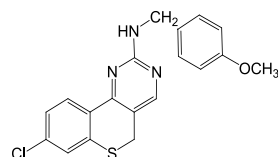
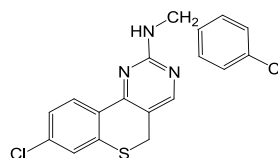
Lo studio del meccanismo d'azione è proseguito valutando dapprima, attraverso microscopia lineare in flusso, un'eventuale capacità del nucleo tricyclico dei composti in esame di interagire con il DNA. Successivamente si è indagato la capacità dei composti in esame di interagire con il recettore tirosin-chinasico KDR. Tale effetto è stato determinato utilizzando un saggio fluorimetrico in presenza di KDR ricombinante umano, un opportuno substrato e utilizzando come composto di riferimento **SU5416** (semaxanib), noto inibitore del recettore (Fig.2.2).



**Figura 2.2:** SU5416 (semaxanib).

Di seguito vengono riportate le formule di struttura dei composti esaminati (Tabella 2.2).

**B1a****B1b****B1c****B1d****B1e****B1f****B1g****B1h****B1i****B2a****B2b****B2c****B2d****B2e****B2f****B2g****B2h****B2i****B3a****B3b**

**B3c****B3d****B3e****B3f****B3g****B3h****B3i**

**Tabella 2.2:** *Composti benzotiofuranopirimidinici studiati (gruppo B).*

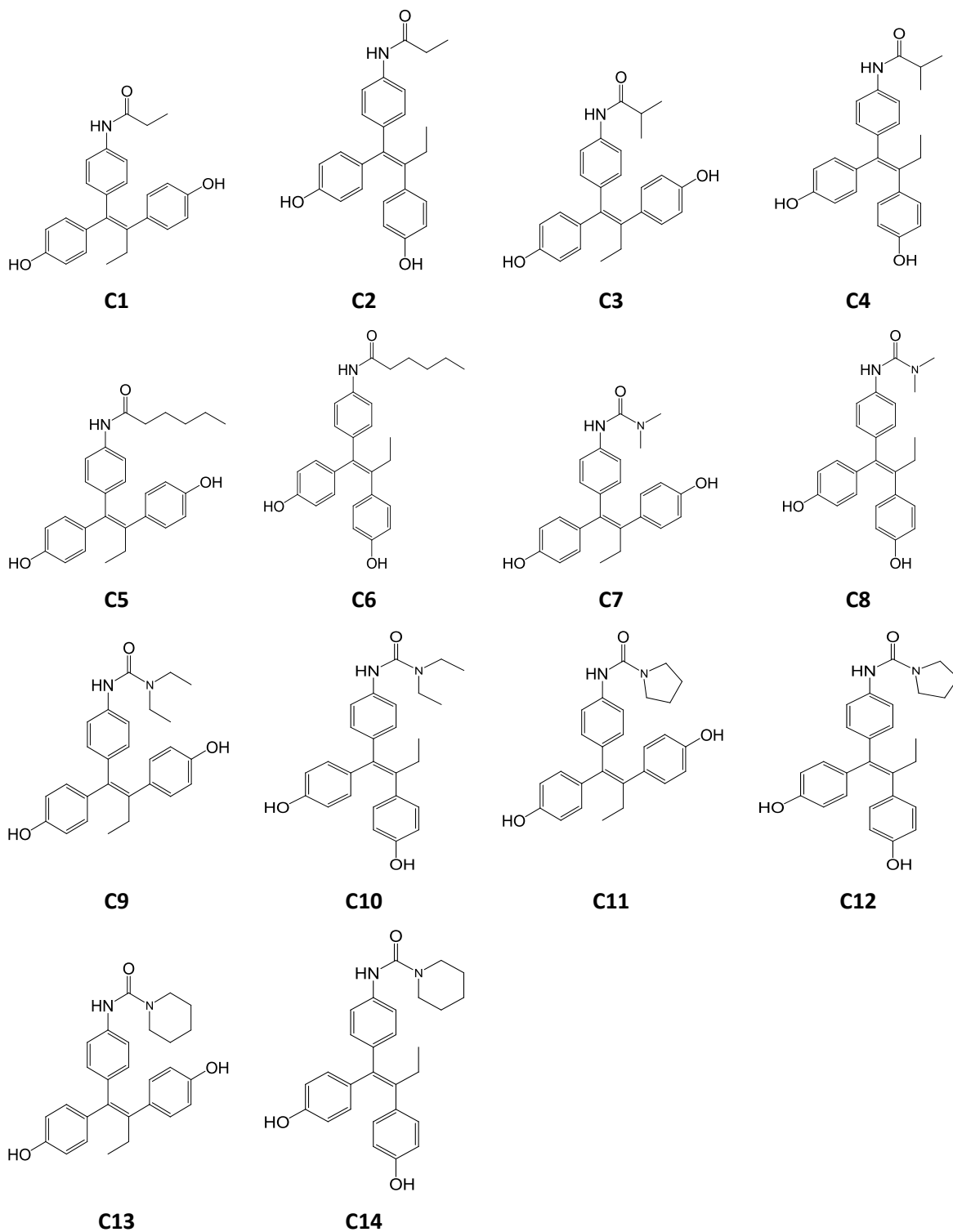
## Gruppo C: Analoghi del tamoxifene

La struttura triariletilenica del tamoxifene e la sua conversione a 4-idrossi-tamoxifene, il metabolita attivo che agisce principalmente attraverso l'inibizione dell'attività trascrizionale del recettore degli estrogeni, hanno suggerito la preparazione di quattordici nuovi analoghi caratterizzati dal mantenimento dello scheletro del tamoxifene, funzionalizzati con gruppi OH nella posizione 4 dei fenili e con diversi sostituenti amidici come catene laterali (Tabella 2.3). L'attività antiproliferativa dei derivati è stata determinata mediante saggi *in vitro* eseguiti in primo luogo sulla linea tumorale umana MCF-7, da adenocarcinoma mammario, poiché tali cellule sovraesprimono il recettore per gli estrogeni (ER). Successivamente l'attività dei composti è stata studiata anche su altre due linee cellulari tumorali umane prive di ER: HeLa, e MSTO-211H.

Lo studio del meccanismo d'azione ha previsto un'indagine sul processo con il quale i composti in esame inducono la morte cellulare. A questo scopo sono stati effettuati saggi di citofluorimetria in flusso che hanno consentito di stabilire:

- se la morte cellulare avvenga in seguito all'induzione di un processo necrotico o apoptotico;
- l'eventuale attivazione della caspasi-3;
- il coinvolgimento della via intrinseca dell'apoptosi e la conseguente partecipazione dei mitocondri.

Infine, sulla base di precedenti dati di letteratura<sup>[32, 48]</sup> è stata saggiata la capacità dei composti di inibire i due enzimi nucleari topoisomerasi I e II, e di complessarsi con il DNA.



**Tabella 2.3:** Analoghi del tamoxifene studiati (gruppo C)

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 COMPOSTI IN ESAME

I composti in esame appartenenti al primo (**A**) e secondo (**B**) gruppo sono stati sintetizzati presso il laboratorio della prof. A. M. Marini del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Pisa, mentre i composti del terzo gruppo (**C**) sono stati sintetizzati presso il laboratorio del prof. Daniele Passarella del Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale dell'Università degli Studi di Milano (Tabelle 2.1- 2.3).

#### 3.1.1 Preparazione delle soluzioni dei composti

Le soluzioni utilizzate sono state preparate sciogliendo una quantità esattamente pesata di sostanza (circa 1 mg) in dimetilsolfossido (DMSO) per quanto concerne i composti **A2**, **A4**, **A6**, **A7** e **A9-A12**; in etanolo per **A8**; mentre i composti **A1** e **A3** sono stati sciolti in una miscela DMSO:acqua 63:37; ed infine in una miscela di dimetilsolfossido, acqua milliQ ed etanolo nel caso del composto **A1** (rispettivamente in parti 15:5:80).

Per tutti i composti del gruppo **B** sono state preparate soluzioni contenenti una quantità esattamente pesata di sostanza, circa 1 mg, sciolta in DMSO, mentre per i composti del terzo gruppo (**C**), sono state preparate soluzioni etanoliche o in DMSO, ottenendo una concentrazione di 20 mM.

### 3.2 CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA

Per ciascun composto è stata preparata, in un matraccio da 50 o da 100 mL, una soluzione etanolica (alcool etilico 99%) contenente una quantità esattamente pesata di sostanza, circa 1 mg.

L'analisi dello spettro UV (200-500 nm) di tale soluzione ha permesso di calcolare il valore dei coefficienti di estinzione molare ( $\epsilon$ ) ai picchi di massimo assorbimento, secondo la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Da cui:

$$\epsilon = \frac{A}{b \cdot c}$$

dove:

**A** = assorbanza

**$\epsilon$**  = assorbanza specifica molare

**b** = lunghezza del cammino ottico in cm

**c** = concentrazione della specie assorbente espressa in moli/litro

Gli spettri di assorbimento UV, eseguiti a temperatura ambiente, sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin Elmer, modello Lambda 40, in cuvette di quarzo con cammino ottico di 1 cm.

### 3.3 ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA

Per gli studi riguardanti l'attività antiproliferativa sono state utilizzate quattro linee cellulari tumorali umane e una linea cellulare non tumorale umana:

- **HeLa** (adenocarcinoma della cervice uterina)<sup>[49]</sup>,
- **A-431** (carcinoma a cellule squamose dell'epidermide)<sup>[50]</sup>,
- **MSTO 211-H** (mesotelioma bifasico)<sup>[51]</sup>,
- **MCF-7** (adenocarcinoma mammario)<sup>[52]</sup>,
- **HUVEC** (cellule dell'endotelio della vena ombelicale umana)<sup>[53]</sup>.

Le cellule **HeLa** crescono in monostrato, in presenza di terreno Nutrient Mixture F-12 (HAM, N6760, Sigma) addizionato del 10% di siero bovino fetale (Invitrogen).

Le cellule **A-431** crescono in monostrato, in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D2902, Sigma) addizionato del 10% di siero fetale bovino (Invitrogen).



Le cellule **MSTO-211H** crescono in monostrato, in presenza di terreno RPMI-1640 (R6504, Sigma), al quale viene aggiunto Hepes (2.383 g/L), Na-piruvato (0.11 g/L), glucosio (2.5 g/L) e 10% siero fetale bovino (Invitrogen).

Le cellule **MCF-7** crescono in monostrato, in presenza del terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D2902, Sigma) al quale è aggiunto glucosio 3.5 g/L (Sigma) e 10% di siero bovino fetale (Invitrogen).

A tutti i terreni, prima del loro utilizzo, è stata aggiunta una miscela composta da due antibiotici (100 U/mL di penicillina sale sodico, 100 µg/mL di streptomicina solfato) ed un antifungino (0.25 µg/mL di amfotericina B) (A5955, Sigma).

Le cellule **HUVEC** (Lonza, CC-2519) crescono in monostrato, in presenza di terreno EBM-2 (Lonza, CC-3156), completato prima dell'uso con 2% siero bovino fetale (Lonza, CC-4101A), 0.04% idrocortisone (Lonza, CC-4112A), 0.4% fattore-β di crescita dei fibroblasti ricombinante umano (Lonza, CC-4113A), 0.1% fattore di crescita dell' endotelio vascolare (VEGF) (Lonza, CC-4114A), 0.1% fattore di crescita simil-insulinico (R3-IGF1) (Lonza, CC-4115A), 0.1% acido ascorbico (Lonza, CC-4116A), 0.1% eparina (Lonza, CC-4936A), 0.1% fattore di crescita dell'epidermide ricombinante umano in una soluzione salina di albumina di siero fetale tamponata (Lonza, CC-4317A), 0.1% gentamicina solfato e amfotericina B testate su culture cellulari (Lonza, CC-4381A).

Per il mantenimento e la manipolazione delle linee cellulari sono stati utilizzati rispettivamente un incubatore (Forma Scientific modello 3111; 37°C, atmosfera umidificata in presenza di H<sub>2</sub>O al 99% e di CO<sub>2</sub> al 5%) ed una cappa a flusso laminare (ICN Faster, modello Ultrasafe 48).

### 3.3.1 Soluzioni e materiale

PBS (Phosphate Buffer Saline): NaCl (Merck) 0.1 M, KCl (Sigma) 0.002 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Sigma) 0.008 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Carlo Erba) 0.0015 M, pH 7.0. Tutti i reagenti sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

Trypan Blue: 1% p/v in tampone PBS.

Tripsina-EDTA: tripsina 10 mM (T-4799, Sigma), EDTA 0.3 mM (Sigma).

### 3.3.2 Determinazione dell'attività antiproliferativa

Per determinare l'attività antiproliferativa sono state seminate  $3-4 \times 10^4$  cellule per pozzetto, utilizzando piastre sterili da 24 pozzetti.

Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, sono state aggiunte al mezzo di coltura le sostanze in esame a diverse concentrazioni. Per ogni composto sono state eseguite almeno 3 prove in doppio di ciascun trattamento.

Il volume massimo di solvente utilizzato è stato sempre inferiore allo 0.5%. Tuttavia, per escludere ogni eventuale effetto attribuibile al solvente, ad uno dei pozzetti di riferimento (cellule non trattate), è stato aggiunto il solo solvente al volume massimo utilizzato nell'esperimento.

Dopo 72 ore di trattamento, è stata effettuata la conta cellulare al microscopio ottico utilizzando una camera di Burker e il colorante vitale Trypan Blue. Questo colorante è in grado di attraversare solo le membrane biologiche la cui permeabilità sia compromessa, permettendo la discriminazione tra cellule vive (non colorate) e cellule morte (colorate).

Il procedimento adottato per eseguire la conta vitale è differente a seconda della linea cellulare presa in considerazione:

**HeLa, A-431, MCF-7 e HUVEC:** una volta eliminato il terreno di coltura, le cellule sono state lavate con 1 mL di tampone PBS e staccate con l'aggiunta di 200  $\mu$ L di una soluzione di Tripsina-EDTA. Dopo un opportuno tempo di incubazione è stato aggiunto il colorante Trypan Blue e le cellule sono state contate al microscopio ottico, utilizzando una camera di Burker.

**MSTO-211H:** una volta eliminato il terreno di coltura esausto le cellule sono state staccate con l'aggiunta di 200  $\mu\text{L}$  di una soluzione di Tripsina- EDTA e contate al microscopio ottico dopo colorazione con Trypan Blue, utilizzando la camera di Burker.

I dati di citotossicità ottenuti sono stati espressi in termini di  $GI_{50}$  (*growth inhibition concentration*), vale a dire concentrazione ( $\mu\text{M}$ ) di composto in grado di inibire la crescita cellulare del 50% rispetto ad una coltura di controllo.

### 3.4 DICROISMO LINEARE IN FLUSSO

Il *dicroismo lineare* (DL) è una metodica spettroscopica che viene utilizzata per studiare e caratterizzare la conformazione del DNA (inclinazione delle basi), la sua flessibilità (abilità a subire un orientamento) e, non per ultimo, la geometria di legame di complessi composto-DNA.

Il dicroismo lineare può essere osservato solamente quando nella molecola in esame si ha almeno un parziale allineamento rispetto all'asse di riferimento e questo può essere indotto tramite l'applicazione di un campo elettrico (DL in campo elettrico) o idrodinamico (DL in flusso). In quest'ultimo caso l'asse di riferimento è la direzione del flusso (direzione del campo orientante).

Molecole relativamente rigide ed allungate come quella dell'acido desossiribonucleico possono, infatti, venire orientate secondo un campo elettrico o idrodinamico a cui vengono sottoposte e, come effetto delle transizioni elettroniche delle basi puriniche e pirimidiniche, possono assorbire le due componenti di luce piano polarizzata in maniera diversa, originando un segnale dicroico.

Il dicroismo lineare è definito come l'assorbimento differenziale fra la luce polarizzata parallelamente ( $A_{//}$ ) e perpendicolarmente ( $A_{\perp}$ ) rispetto ad un asse di riferimento, ad una certa lunghezza d'onda  $\lambda$ :

$$DL_{(\lambda)} = A_{//(\lambda)} - A_{\perp(\lambda)}$$

Il dicroismo lineare in flusso presenta alcuni vantaggi rispetto a quello generato da un campo elettrico: innanzitutto permette l'uso di concentrazioni ioniche fisiologiche ed inoltre consente di poter registrare l'intero spettro mantenendo un'orientazione costante del campione.

D'altra parte, il dicroismo in campo elettrico, offre la possibilità di monitorare il processo di "rilassamento orientazionale" quando il campo elettrico viene interrotto, e di produrre un più elevato grado di allineamento delle molecole<sup>[54]</sup>.

Le misure riportate in questa tesi sono state effettuate mediante dicroismo lineare in flusso. L'orientazione del campione è ottenuta utilizzando un dispositivo elaborato da Wada e Kozawa<sup>[55]</sup>. Questo prevede l'uso di un compartimento, dove viene iniettato il campione, composto da due celle di quarzo cilindriche concentriche tra le quali esiste un'intercapedine di 0.7 mm. Il cilindro può essere fatto ruotare da un motore esterno ad una velocità controllata.

Lo strumento utilizzato per le misure dicroiche è uno spettropolarimetro JASCO J500A per dicroismo circolare, adattato anche per determinazioni di dicroismo lineare in flusso ed interfacciato con un PC IBM, che utilizza un programma di elaborazione fornito dalla ditta di produzione (J500).

Per la preparazione dei campioni da utilizzare nei saggi di dicroismo lineare è stato utilizzato DNA da sperma di salmone (D-1626, Sigma), che presenta un coefficiente di estinzione molare di  $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 260 nm.

La soluzione viene preparata idratando una quantità pesata di DNA liofilizzato in tampone ETN 0.01 M (TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM) per una notte a 4°C.

La soluzione di DNA in tampone ETN viene quindi messa ad agitare a temperatura ambiente per 30 minuti e filtrata con filtri aventi porosità 5  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim). L'esatta concentrazione della soluzione di DNA viene determinata per via spettrofotometrica in cuvette di quarzo con cammino ottico di 0.1 cm.

Gli spettri sono stati registrati utilizzando una soluzione di DNA e complessi DNA-sostanza nei quali il composto in esame è stato aggiunto in modo da ottenere rapporti molari [DNA]/[composto] pari a 12.5, 25 o 50. Per ogni determinazione sono state effettuate due scansioni nell'intervallo di lunghezze d'onda 230-500 nm ad una velocità di 20 nm/min.

### **3.5 SAGGI SULLE DNA TOPOISOMERASI**

#### **Elettroforesi su Gel di Agarosio**

L'elettroforesi su gel di agarosio è una metodica standard usata per separare, identificare e purificare frammenti di DNA. La localizzazione del DNA all'interno del gel può essere determinata direttamente mediante la colorazione con basse concentrazioni di un intercalante quale il bromuro di etidio, molecola organica planare, in grado di intercalarsi tra le basi azotate e di emettere luce fluorescente in seguito a illuminazione UV. In seguito alla colorazione, possono essere identificate bande contenenti anche solo 1-10 ng di DNA esaminando direttamente il gel alla luce ultravioletta. Generalmente i gel di agarosio si posizionano orizzontalmente e si sottopongono ad un campo elettrico costante. Quando questo viene applicato attraverso il gel, il DNA, che a pH neutro è caricato negativamente, migra verso l'anodo.

Il grado di questa migrazione dipende da una serie di parametri:

- le dimensioni molecolari del DNA,
- la concentrazione dell'agarosio,
- la conformazione del DNA,
- il voltaggio applicato,
- la temperatura,
- la presenza di molecole che intercalano,
- la composizione del tampone di corsa.

Utilizzando le stesse condizioni sperimentali, il grado di migrazione dipenderà esclusivamente dalle dimensioni e dalla conformazione del DNA: a parità di numero di

coppie di basi, un plasmide completamente svolto migrerà più lentamente lungo le maglie del gel rispetto ad un plasmide superavvolto.

Questa metodica è stata utilizzata per la determinazione del grado di rilassamento del DNA plasmidico circolare superavvolto (pBR322) e di eventuali forme tagliate a singolo o a doppio filamento.

I dati elettroforetici riportati in questa tesi sono stati ottenuti utilizzando un alimentatore CONSORT E443 che permette di ottenere un intervallo di voltaggio da 1 a 400 V.

I gel sono stati fotografati mediante transilluminatore UV dotato di CCD Camera (Bio-Rad, Gel Doc XR).

### **3.6 DNA TOPOISOMERASI I**

#### **3.6.1 Soluzioni e materiali**

Topoisomerasi I umana (4 unità/  $\mu\text{L}$ ) (TopoGEN), è fornita in tampone (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4), 300 mM NaCl, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA, 50% glicerolo e 50 mM imidazolo). L'enzima è conservato ad una temperatura non superiore a  $-20^\circ\text{C}$ .

Topoisomerasi I Dilution Buffer (TopoGEN): (20mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4), 300mM NaCl). Il tampone è conservato ad una temperatura non superiore a  $4^\circ\text{C}$ .

Topoisomerasi I Assay Buffer 10X (TopoGEN): (100 mM Tris-HCl, (pH 7.9), 10 mM EDTA, 1.5 M NaCl, 1% BSA, 1 mM spermidine, 50% glicerolo). Il tampone è conservato ad una temperatura non superiore a  $4^\circ\text{C}$ .

DNA plasmidico pBR322 (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Fermentas Life Sciences), è fornito in tampone di conservazione (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA) e conservato ad una temperatura non superiore a  $-20^\circ\text{C}$ . Quando necessario, la soluzione madre viene diluita in  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ.

Stop buffer 5X (SDS 5%, blu di bromofenolo 0.125%, glicerolo 25%). Il tampone è conservato ad una temperatura non superiore a  $4^\circ\text{C}$ .

Tampone TAE 1X (TRIS 0.04 M (Sigma-Aldrich), ac. acetico glaciale 0.02 M (Riedel-de Haën) ed EDTA 0.001 M (Sigma), pH 8).

Tampone TBE 1X (TRIS 0.09 M (Sigma-Aldrich), acido borico 0.09 M (Sigma) ed EDTA 0.002 M (Sigma), pH 8).

Proteinasi K (2 mg/mL) (Sigma), l'enzima sciolto in acqua è conservato ad una temperatura non superiore a -20°C .

Bromuro di etidio (10 mg/mL) in soluzione acquosa (E-1510 Sigma). Conservato al buio a temperatura ambiente.

### **3.6.2 Determinazione dell'attività di rilassamento del DNA superavvolto**

I campioni sono stati preparati incubando 0.25 µg di DNA plasmidico pBR322 da solo o in presenza del composto in esame alle concentrazioni stabilite. A tutti i campioni, eccetto il controllo superavvolto, sono state aggiunte 2 unità di DNA topoisomerasi I in 20 µL finali di tampone di reazione. L'allestimento dei campioni avviene in ghiaccio.

Una volta preparati, i campioni vengono incubati a 37°C per 60 minuti; quindi la reazione viene arrestata con l'aggiunta di 4 µL di Stop Buffer 5X e 0.6 µL di una soluzione 2 mg/mL di proteinasi K, prolungando l'incubazione a 37°C per altri 30 minuti. Un'aliquota di ciascun campione (16 µL) viene caricata su gel di agarosio 1% in tampone TAE 1X e fatta correre a 30 V per 18 ore.

Infine, dopo colorazione per 20 minuti con bromuro di etidio (1 µg/mL) in tampone TAE 1X, il gel viene fotografato con transilluminatore UV.

### **3.6.3 Determinazione della formazione del "cleavage complex"**

I campioni sono stati preparati incubando 20 ng di DNA plasmidico pBR322 da solo o con i composti in esame alle concentrazioni stabilite. A tutti i campioni, eccetto il controllo superavvolto, sono state aggiunte 5 unità di DNA topoisomerasi I in 20 µL finali di tampone di reazione. L'allestimento dei campioni avviene in ghiaccio.

Una volta preparati, i campioni vengono incubati a 37°C per un'ora; quindi la reazione viene bloccata con l'aggiunta di 4 µL di Stop Buffer 5X e 0.6 µL di una soluzione 2 mg/mL di proteinasi K, proseguendo l'incubazione per altri 30 minuti a 37°C. Al termine un'aliquota di ciascun campione (16 µL) viene caricata su gel di agarosio 1% in tampone TBE 1X contenente bromuro di etidio alla concentrazione di 0.5 µg/mL e fatta correre a 30 V per 18 ore. Il gel viene infine fotografato con transilluminatore UV.

### **3.7 DNA TOPOISOMERASI II**

#### **3.7.1 Soluzioni e materiali**

La topoisomerasi II Alpha (20 unità/ µL) (USB) è fornita in tampone di conservazione (15 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.1, 700 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50% glicerolo) e mantenuta ad una temperatura non superiore a -80°C.

Topoisomerasi II dilution buffer (USB) (10 mM sodium phosphate (pH 7.1), 50 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.5 mg/mL BSA, 10% glicerolo, e conservato ad una temperatura pari a -20°C).

Topoisomerasi II reaction buffer 10X (USB) (100 mM Tris (pH 7.9), 500 mM NaCl, 500 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 150 µg/mL BSA, 10 mM ATP, conservato a -20°C).

DNA plasmidico pBR322 (0.5 µg/µL) (Fermentas Life Sciences), è fornito in tampone di conservazione (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA) e conservato ad una temperatura non superiore a -20°C. La soluzione madre viene diluita con H<sub>2</sub>O milliQ.

Stop Buffer 5X (SDS 5%, Blu di bromofenolo 0.125%, glicerolo 25%. Il tampone è conservato ad una temperatura non superiore a 4°C).

Tampone TAE 1X (TRIS 0.04 M (Sigma-Aldrich), ac. acetico glaciale 0.02 M (Riedel-de Haën) ed EDTA 0.001 M (Sigma), pH 8).

Tampone TBE 1X (TRIS 0.09 M (Sigma-Aldrich), acido borico 0.09 M (Sigma) ed EDTA 0.002 M (Sigma), pH 8).



Proteinasi K (2 mg/mL) (Sigma), l'enzima è conservato ad una temperatura non superiore a -20°C.

Bromuro di etidio (10 mg/mL) in soluzione acquosa (E-1510 Sigma) conservato al buio, a temperatura ambiente.

### **3.7.2 Determinazione dell'attività di rilassamento del DNA superavvolto**

I campioni sono stati preparati incubando 0.25 µg di DNA plasmidico pBR322 da solo o in presenza dei composti in esame alle concentrazioni stabilite. A tutti i campioni, eccetto il controllo superavvolto, è stata aggiunta 1 unità di DNA topoisomerasi II in 20 µL finali di tampone di reazione. L'allestimento dei campioni avviene in ghiaccio.

Una volta preparati, i campioni vengono incubati a 37°C per 60 minuti; quindi la reazione viene arrestata con l'aggiunta di 4 µL di Stop Buffer 5X e 0.6 µL di una soluzione 2 mg/mL di proteinasi K, prolungando l'incubazione a 37°C per altri 30 minuti. Un'aliquota di ciascun campione (16 µL) viene poi caricata su gel di agarosio 1% in tampone TAE 1X e fatta correre a 100 V per 90 minuti.

Infine, dopo colorazione per 20 minuti con bromuro di etidio (1 µg/mL) in tampone TAE 1X, il gel viene fotografato con transilluminatore UV.

### **3.7.3 Determinazione della formazione del "cleavage complex"**

I campioni sono stati preparati incubando 0.25 µg di DNA plasmidico pBR322 da solo o in presenza dei composti in esame alle concentrazioni stabilite. A tutti i campioni, eccetto il controllo superavvolto, sono state aggiunte 10 unità di DNA topoisomerasi II in 20 µL finali di tampone di reazione. L'allestimento dei campioni avviene in ghiaccio.

Una volta preparati, i campioni vengono incubati a 37°C per un'ora; quindi la reazione viene bloccata con l'aggiunta di 4 µL di Stop Buffer 5X e 0.6 µL di una soluzione 2 mg/mL di proteinasi K, proseguendo l'incubazione per altri 30 minuti a 37°C.

Al termine, un'aliquota di ciascun campione (16  $\mu$ L) viene caricata su gel di agarosio 1% in tampone TBE 1X contenente bromuro di etidio alla concentrazione di 0.5  $\mu$ g/mL e fatta correre a 30 V per 18 ore. Il gel viene infine fotografato con transilluminatore.

### **3.8 ANALISI CITOFUORIMETRICA**

Tecnologia evolutasi a partire dagli anni '70, la citofluorimetria a flusso è divenuta una metodologia particolarmente raffinata e precisa al fine di valutare ed esplorare la superficie delle cellule, ed anche eventi citoplasmatici. E' una tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione delle cellule sospese in un mezzo fluido in modo molto rapido e dettagliato sia a livello quantitativo che qualitativo.

Le misure citofluorimetriche riguardano parametri biochimici espressi dalle cellule e qualificati indirettamente per mezzo di marcatori molecolari fluorescenti.

Le cellule, dopo essere state opportunamente marcate con appositi fluorofori, vengono trasportate per mezzo di un fluido laminare nella cella di lettura, e colpite dal raggio di luce monocromatica. Quindi specifici sistemi ottici (come ad esempio fotodiodi o fotomoltiplicatori) rilevano la luce riflessa in diverse angolazioni da ciascuna cellula, ovvero in rifrazione frontale (Forward Scattered Light), in rifrazione laterale (Side Scattered Light) e in fluorescenza (Side Fluorescence).

La rifrazione frontale è misurata mediante un fotodiodo posto frontalmente al percorso ottico della luce laser. Quando il raggio monocromatico colpisce la singola cellula questo viene deviato in diverse angolazioni e direzioni, la quantità finale di luce che riesce a raggiungere il fotodiodo è direttamente proporzionale alle dimensioni della cellula analizzata.

La rifrazione laterale è rilevata da un fotomoltiplicatore posto in posizione ortogonale alla sorgente luminosa. Esso raccoglie in modo selettivo, mediante uno specchio dicroico, la luce difratta da ciascuna cellula ad un angolo di 90° rispetto alla luce incidente. A tale

angolazione la luce rifratta è legata a diversi fattori quali la regolarità della forma del nucleo, la densità della cromatina nucleare e la granulosità del citoplasma.

Infine la coniugazione di specifici fluorocromi, in grado di legare strutture a livello della superficie delle cellule o a livello citoplasmatico consente di differenziare in modo accurato e sensibile le diverse popolazioni cellulari. Il fluorocromo, una volta eccitato ad un'opportuna lunghezza d'onda, è in grado di emettere un raggio luminoso ad una frequenza minore. Un tubo fotomoltiplicatore rileva la quantità di luce fluorescente emessa da ciascuna cellula, trasformandola successivamente in un segnale elettrico.

Una volta che i dati vengono elaborati da un apposito software, si procede alla loro compensazione, con lo scopo di sottrarre da un certo canale una quota fissa di segnale relativo all'emissione di un altro fluorocromo, perché nonostante il complesso sistema di lenti, specchi e filtri, che caratterizza lo strumento, si può verificare che una radiazione di una data intensità di un fluorocromo possa sovrapporsi parzialmente allo spettro del fluorocromo prossimale nello spettro.

L'analisi al citofluorimetro permette di ottenere informazioni relative a diversi parametri, tra i quali:

- il numero di cellule appartenenti ad una determinata popolazione e aventi specifici requisiti rispetto al numero totale;
- la percentuale di cellule positive per un dato antigene;
- l'intensità di espressione di tale antigene.

### **3.8.1 Determinazione dell'apoptosi**

Durante il processo apoptotico le cellule subiscono particolari modificazioni morfologiche che portano alla perdita dell'integrità della membrana plasmatica con conseguente formazione di corpi apoptotici e morte cellulare. Uno dei principali cambiamenti che avviene a livello della membrana, durante le prime fasi dell'apoptosi, è la traslocazione della fosfatidilserina. Nelle cellule infatti la distribuzione dei fosfolipidi fosfatidilcolina e

sfingomielina, costituenti della membrana plasmatica risulta essere asimmetrica, con la fosfatidilcolina esposta esternamente e la fosfatidilserina posizionata nella parte interna; a seguito dell'apoptosi la fosfatidilserina passa dal lato interno a quello esterno della membrana. E' possibile così rilevare questo fosfolipide mediante l'utilizzo di annessina V marcata, una proteina di circa 35-36 kDa, che in presenza di ioni calcio è in grado di legarsi con alta affinità alla fosfatidilserina. Data la sua importanza negli studi dei processi apoptotici, è disponibile in commercio annessina V coniugata con un'ampia gamma di fluorocromi. Negli esperimenti riportati in questa tesi il fluoroforo è rappresentato dall'isotiocianato di fluoresceina (FITC) che, coniugato all'annexina V, andrà a marcare le cellule che espongono il fosfolipide. Per distinguere le cellule apoptotiche da quelle necrotiche la misura è stata condotta in presenza anche di ioduro di propidio (PI), una molecola fluorescente in grado di intercalarsi nel DNA.

Essa non è in grado di permeare la membrana plasmatica delle cellule integre a causa della sua elevata idrofilia ma riesce a penetrare e quindi a marcare solo quelle che hanno perso l'integrità della membrana, cioè quelle necrotiche o in tarda apoptosi.

Dall'analisi effettuata in presenza di entrambi i fluorocromi si possono pertanto discriminare quattro tipi di popolazioni cellulari:

- le cellule sane, non marcate;
- le cellule in apoptosi precoce marcate con annessina V-FITC;
- le cellule in apoptosi tarda o necrosi precoce (presentano una copresenza di segnale di entrambi i fluorofori);
- le cellule necrotiche marcate con PI.

E' tuttavia da tenere in considerazione che la presenza di entrambi i segnali in una popolazione può anche essere dovuta ad una marcatura aspecifica da parte dell'annexina V delle cellule necrotiche, in quanto la perdita dell'integrità della membrana plasmatica può permettere all'annexina V di entrare e legare la fosfatidilserina presente sul lato interno della membrana plasmatica.

Infatti si può avere il caso di cellule in fase avanzata di apoptosi che vanno incontro a necrosi secondaria risultando anch'esse marcate sia con annessina V-FITC che con PI, come conseguenza della tardiva perdita dell'integrità della membrana citoplasmatica.

Per la determinazione sperimentale dell'apoptosi è stato utilizzato il FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmigen) e sono state prese in considerazione le cellule HeLa.

Il protocollo sperimentale prevede la semina di 250000 cellule HeLa in piastre da 10 cm<sup>2</sup>. Dopo 24 ore dalla semina le cellule sono state trattate con il composto in esame. Si è inoltre preparato un campione di controllo costituito da cellule trattate con il solo solvente.

Dopo 18 ore dal trattamento le cellule sono state staccate con 4 mL di soluzione Tripsina-EDTA, la sospensione cellulare è stata raccolta in tubi Falcon (PBI) da 15 mL e centrifugata. Successivamente le cellule sono state lavate due volte con 2 mL di tampone PBS. Al termine le cellule sono state risospese in tampone annessina V Binding Buffer 1X in quantità tale da avere in tutti i campioni una concentrazione pari a 10<sup>6</sup> cellule/mL.

Per la marcatura sono stati aggiunti a 100 µL di ciascun campione, 5 µL di annessina V-FITC e 5 µL di PI, le cellule sono state quindi incubate per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione è stato aggiunto un volume di annessina V Binding Buffer 1X tale da ottenere un volume finale per campione di 510 µL.

Fino al momento della lettura citofluorimetrica i campioni sono stati mantenuti al riparo dalla luce.

L'autofluorescenza delle cellule è stata determinata analizzando un campione di controllo incubato in assenza dei due fluorofori e trattato come sopra.

### **3.8.2 Determinazione della modificazione del potenziale elettrico transmembrana mitocondriale in cellule integre**

I mitocondri sono organelli citoplasmatici che svolgono una funzione essenziale nella vita cellulare: la conversione di energia metabolica in ATP, usata poi dalla cellula per tutti i processi necessari alla sua sopravvivenza.

L'energia rilasciata durante le reazioni di ossido-riduzione della catena respiratoria mitocondriale è immagazzinata come gradiente elettrochimico che consiste in un potenziale elettrico transmembrana ( $\Delta\psi$ ), negativo all'interno, di circa 180-200 mV.

Nel processo apoptotico i mitocondri svolgono un ruolo chiave: come conseguenza di una alterazione della permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna, cui contribuiscono proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2, essi rilasciano molecole associate all'apoptosi stessa, quali il citocromo c, e il fattore di induzione apoptotica (AIF). La caduta del potenziale elettrochimico mitocondriale è associata ad una variazione di permeabilizzazione della membrana esterna, sebbene ci siano prove contrastanti sul fatto che essa sia un prerequisito per il rilascio del citocromo c e l'attivazione delle caspasi.

La determinazione del potenziale elettrico transmembrana mitocondriale in cellule integre può prevedere l'utilizzo del fluorocromo lipofilo JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzoimidazolcarbocianina ioduro), il cui spettro di emissione dipende dalla concentrazione, che a sua volta è determinata dal  $\Delta\psi$ .

Infatti, JC-1 può esistere in due stati: aggregati o monomeri, caratterizzati da un diverso spettro di emissione. JC-1 esiste sotto forma di monomeri a basse concentrazioni, mentre in forma aggregata ad alte concentrazioni.

Quando le cellule vive vengono incubate con JC-1, esso attraversa la membrana plasmatica sotto forma di monomero. L'accumulo all'interno dei mitocondri avviene in funzione del potenziale di membrana: il  $\Delta\psi$  di mitocondri funzionali, negativo internamente, permette che JC-1 venga rapidamente catturato all'interno di questi.

L'accumulo provoca un aumento di concentrazione del fluoroforo che porta alla formazione di aggregati all'interno dei mitocondri, i quali presentano una tipica fluorescenza nel rosso.

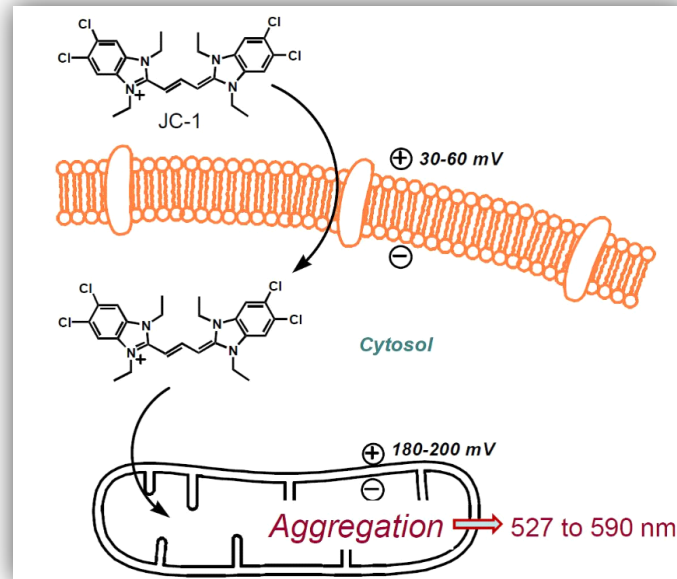
La formazione di aggregati è reversibile; perciò nei mitocondri che vanno incontro a diminuzione del potenziale di membrana (dovuta all'apoptosi o ad altri eventi fisiologici), JC-1 può fuoriuscire nel citoplasma e, in virtù della diminuzione della sua concentrazione, ritornare alla forma monomeric, con conseguente diminuzione della fluorescenza rossa e corrispondente aumento della fluorescenza verde (Fig. 3.1) <sup>[56]</sup>.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il KIT BD MitoScreen che prevede l'uso di JC-1, e sono state prese in considerazione le cellule HeLa.

In particolare sono state seminate 250000 cellule in piastre da 10 cm<sup>2</sup>. Dopo 24 ore dalla semina le cellule sono state trattate con il composto in esame. Dopo 18 ore dal trattamento le cellule sono state staccate con 2 mL di tripsina-EDTA, contate ed infine centrifugate per 5 minuti a 1500 rpm. Il pellet è stato risospeso in 100 µL di una soluzione contenente terreno completo.

Successivamente sono stati aggiunti 0.5 mL di assay buffer (cellule non trattate), o 0.5 mL di JC-1 work solution (cellule trattate), e le cellule sono state incubate al buio a 37° per 30 minuti.

Terminato il periodo di incubazione le cellule sono state lavate due volte con assay buffer, risospese in 0.5 mL dello stesso ed immediatamente analizzate al citofluorimetro.



**Figura 3.1:** Modalità citofluorimetrica per misurare il  $\Delta\psi$  mitocondriale in cellule integre.

Il colorante JC-1 entra nelle cellule e si accumula specificamente all'interno dei mitocondri a causa della sua natura lipofila e cationica in proporzione all'intensità del  $\Delta\psi$  (Fig. 3.1). Nei mitocondri con elevato  $\Delta\psi$  la fluorescenza del JC-1 si sposta da 527 nm (fluorescenza verde) a 590 nm (fluorescenza rossa) in quanto forma aggregati, mentre nei mitocondri con  $\Delta\psi$  collassato nelle cellule in apoptosi il JC-1 permane nel citosol in forma monomeric (fluorescenza verde). Questo rapporto di fluorescenza verde vs fluorescenza rossa con eccitazione a 488 nm è usato per rivelare modificazioni di  $\Delta\psi$ .

### 3.8.3 Determinazione della caspasi-3 attiva

Le caspasi sono cisteina-proteasi intracellulari la cui attività consiste nel tagliare il substrato dopo un residuo di aspartato in una sequenza tetrapeptidica specifica. Esse costituiscono il momento terminale del processo apoptotico, producendo una serie di segnali che terminano con la frammentazione del DNA nucleare e la morte cellulare. Sono localizzate nel citosol della cellula sotto forma di zimogeni, ovvero enzimi inattivi: le procaspasi. La loro attivazione può avvenire o attraverso un recettore posto sulla membrana plasmatica (via estrinseca dell'apoptosi) o attraverso rilascio di citocromo c da parte dei



mitocondri (via intrinseca dell'apoptosi). L'attivazione di questi enzimi prevede una gerarchia ben specifica e in base a ciò si possono distinguere due famiglie di caspasi:

*caspasi iniziatrici* (caspasi-8, -9, -10) caratterizzate da grossi domini di attivazione e contenenti siti specifici per il legame agli adattatori-attivatori e per il reclutamento;

*caspasi effettrici* (caspasi-3, -6, -7) che svolgono compiti esecutivi nell'apoptosi vera e propria, degradando le proteine.

In questa tesi si è determinata quantitativamente l'attivazione della caspasi-3 da parte delle cellule trattate con la sostanza in esame, allo scopo di verificare il coinvolgimento di un evento apoptotico nel processo della morte cellulare. Per la determinazione è stato utilizzato Active Caspase-3 Apoptosis KIT BD Pharmigen™ e le cellule HeLa.

Sono state seminate 270000 cellule in piastre da 10 cm<sup>2</sup>. Dopo 24 ore dalla semina le cellule sono state trattate con il composto in esame. Dopo 18 ore dal trattamento le cellule sono state staccate con una soluzione di tripsina-EDTA, contaminate e centrifugate per 5 minuti a 1600 rpm. Successivamente le cellule sono state lavate due volte con PBS, centrifugate per 5 minuti a 1600 rpm e risospese in 250 µL di FIX (Fixation and permeabilization solution 1X BD Cytofix/Cytoperm), agitate e poste in ghiaccio per 20 minuti. Infine sono state lavate due volte con wash buffer e ricentrifugate 5 minuti a 1600 rpm. Il pellet così ottenuto è stato risospeso nel wash antibody 1X (PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 BD Pharmigen™), incubato 30 minuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce.

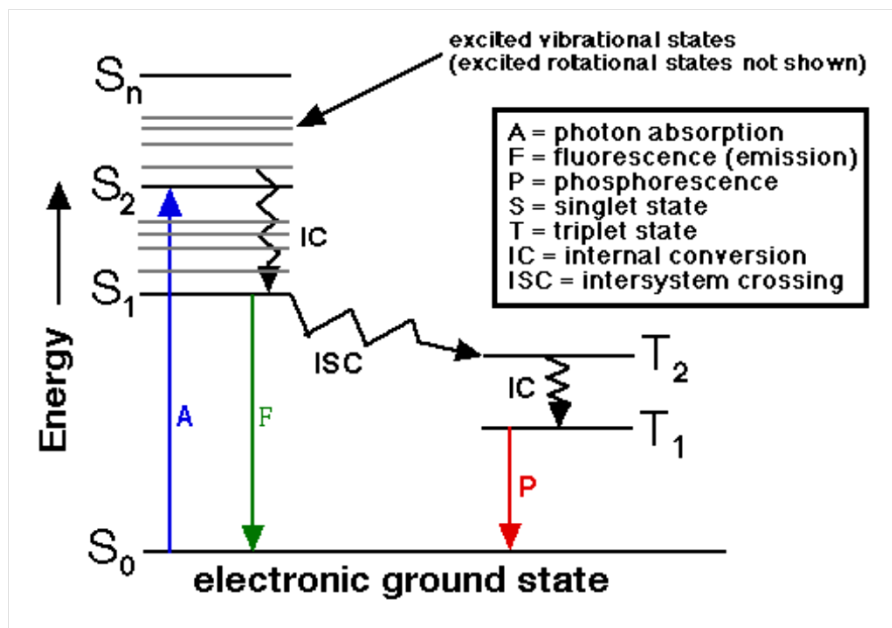
Dopo un ulteriore lavaggio con wash buffer, finalmente le cellule sono state risospese in 0.5 mL di wash buffer; in questo modo l'anticorpo utilizzato (PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 BD Pharmigen™) riconosce specificamente la forma attiva della caspasi-3 presente nelle cellule.

L'analisi al citofluorimetro di questa popolazione di cellule permette di visualizzare direttamente sotto forma di istogramma la presenza della caspasi-3 attiva. La valutazione

della stimolazione della caspasi-3 attiva è stata ottenuta in modo relativo, considerando la percentuale di caspasi-3 attiva endogena pari all'unità e calcolando corrispondentemente la percentuale ottenuta con i composti in esame.

### 3.9 DETERMINAZIONI FLUORIMETRICHE

L'emissione in fluorescenza di un cromoforo ad una certa lunghezza d'onda dipende dall'efficienza con cui assorbe o emette fotoni e dalla sua capacità di subire ripetuti cicli di eccitazione/emissione, come spiegato nel diagramma di Jablonski (Figura 3.2).



**Figura 3.2:** Diagramma di Jablonski.

Nella fluorescenza la radiazione è generata in seguito a transizioni tra stati con la stessa molteplicità di spin ( $S_1-S_0$ ). Un elettrone situato allo stato fondamentale  $S_0$  viene colpito da una radiazione elettromagnetica e ne assorbe l'energia, passando ad un orbitale più esterno, in un livello di vibrazione elevato ( $S_2$ ). Lo stato eccitato permane per un tempo breve (1-10 ns), il fluoroforo subisce modificazioni conformazionali e interazioni con l'intorno chimico che portano alla perdita di energia, fino al raggiungimento dello stato vibrazionale più basso  $S_1$  (processo di conversione interna). In seguito, a causa dell'instabilità dello stato vibrazionale  $S_1$ , l'elettrone ricade nell'orbitale iniziale  $S_0$

portando all'emissione di fluorescenza. La radiazione emessa presenta energia e frequenza minori rispetto alla radiazione incidente, per questo si trova a lunghezze d'onda maggiori. Non tutte le molecole eccitate emettono fluorescenza, alcune possono ricadere nello stato fondamentale senza emettere radiazione, oppure possono sottostare ad un interscambio senza radiazione che richiede il disaccoppiamento di spin e il passaggio allo stato di tripletto T attraverso un processo detto "*intersystem crossing*".

### 3.9.1 Spettri di fluorescenza

Prima di eseguire il saggio di attività chinastica del recettore VEGFR-2 è stato determinato lo spettro di emissione di fluorescenza di ciascun composto in esame di essi nell'intervallo di lunghezza d'onda 360-600 nm, eccitando alla lunghezza d'onda di 355 nm. Lo scopo di queste letture è stato quello di verificare eventuali interferenze dovute all'emissione di fluorescenza da parte dei composti in esame, alle stesse  $\lambda$  di eccitazione e di emissione previste nel saggio di attività del recettore.

Per lo svolgimento di queste letture sono state allestite, per ognuno dei composti, 2 mL di soluzioni 10  $\mu$ M in Reaction Buffer 1X ottenuto per diluizione (1:10) in acqua milliQ del Tyr Reaction Buffer 10X (20 mM Tris, pH 7.5, 10% glicerolo, 0,05% Triton® X-100, 0.1 mg/mL BSA, 0.5 mM Na<sub>5</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM DTT, a pH 7.5) e si è riportato lo spettro di emissione di fluorescenza, nelle seguenti condizioni sperimentali:

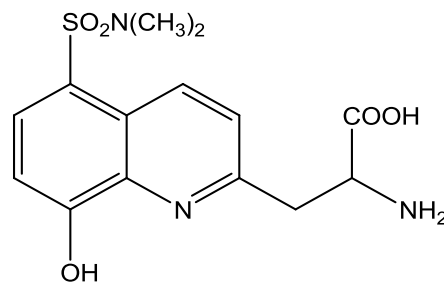
- cuvetta di quarzo, cammino ottico 1 cm
- $\lambda$  di eccitazione: 355 nm
- $\lambda$  di emissione: 357-600 nm
- fenditura di eccitazione: 3 nm
- fenditura di emissione: 3 nm

Gli spettri di emissione di fluorescenza dei composti sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofluorimetro Perkin Elmer, modello LS50B.

### 3.9.2 Saggio di fosforilazione del recettore tirosin-chinasico KDR (VEGFR-2)

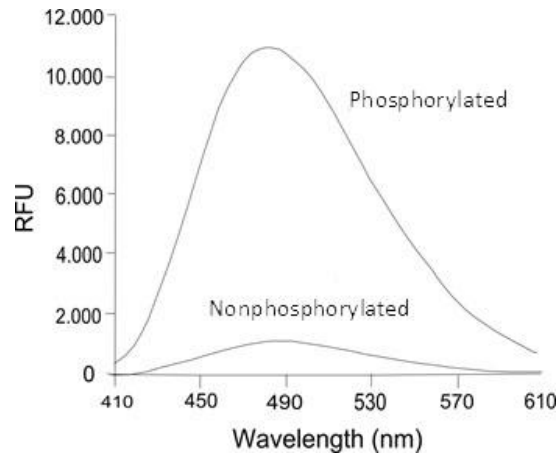
Le protein-chinasi rivestono un ruolo centrale in numerosi aspetti della regolazione cellulare e, pertanto inibitori delle chinasi sono ritenuti validi agenti terapeutici per varie patologie, tra le quali i tumori.

Il saggio di attività del recettore tirosin-chinasico VEGFR-2 eseguito, è basato sull'utilizzo di un fluoroforo "chelation-enhanced" chiamato SOX (Figura 3.3), un aminoacido non naturale legato ad un substrato peptidico chinasi-specifico.



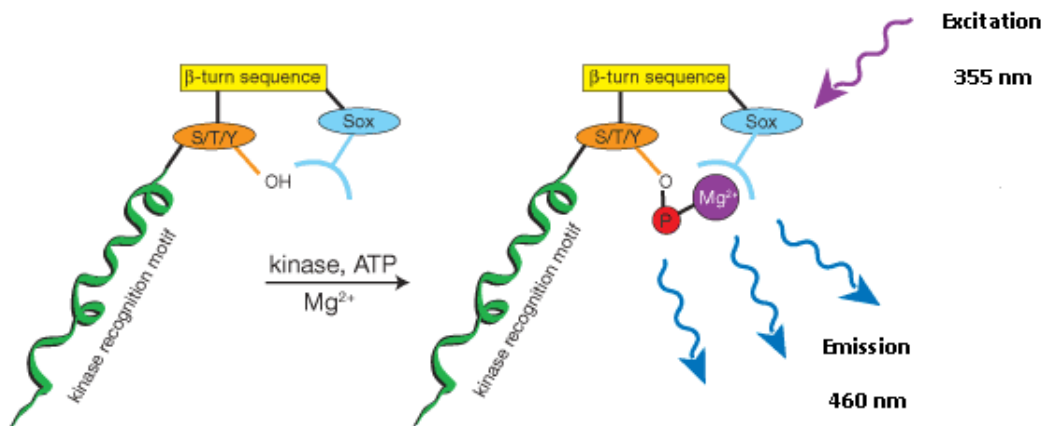
**Figura 3.3:** Struttura del fluoroforo SOX.

L'enzima chinasi, in presenza di ATP, porta alla fosforilazione del residuo tirosinico del peptide substrato e in seguito ad un chelato con  $Mg^{2+}$  che consente la formazione di un ponte tra l'amminoacido SOX e il gruppo tirosin-fosfato. Il chelato formatosi induce un aumento di fluorescenza (Figura 3.4), la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di peptide fosforilato.



**Figura 3.4:** Spettri di emissione in fluorescenza del substrato completamente fosforilato e del substrato non fosforilato.

L'aminoacido SOX è separato dal residuo che subisce fosforilazione da una sequenza formata da due aminoacidi (glicina e prolina), chiamata  $\beta$ -turn sequence, necessaria per creare il sito di binding per il  $Mg^{2+}$  (Figura 3.5). Nel substrato peptidico, il Tyr Peptide-8, è presente anche un'altra catena aminoacidica definita Kinase recognition motif (Figura 3.5) in quanto specifica per il riconoscimento della proteina tirosin chinasi di interesse.



**Figura 3.5:** Dopo la fosforilazione, uno ione  $Mg^{2+}$  viene chelato consentendo la formazione di un ponte tra il fluoroforo SOX ed il gruppo tirosin-fosfato.

La peculiarità che rende questo metodo valido e applicabile consiste nel fatto che l'interazione dello ione  $Mg^{2+}$  con il fluoroforo SOX risulta essere debole prima della fosforilazione ( $K_d=100^{-300}$  mM), mentre dopo la fosforilazione l'affinità risulta

significativamente aumentata ( $K_d=4^{-20}$  mM). Maggiore sarà la differenza nell'affinità tra le due situazioni sopraccitate, e maggiore risulterà l'aumento percentuale dell'intensità di fluorescenza.

Per i saggi di attività dell'enzima tirosin-chinasico KDR sono stati utilizzati i seguenti reagenti (Invitrogen):

- CHINASI RICOMBINANTE UMANA KDR (VEGFR-2).

È costituita dal dominio catalitico dell'enzima ricombinante umano.

Soluzione 0.43 mg/mL di enzima in tampone di conservazione (50 mM Tris a pH 7.5, 50% glicerolo, 0.01% Triton® X-100, 2 mM DTT, 150 mM NaCl, 0.25 mM EDTA).

L'enzima, dopo il primo utilizzo, viene aliquotato e conservato a -80°C.

- TYR PEPTIDE-8.

Substrato peptidico legato al fluoroforo SOX.

Soluzione acquosa 1 mM di Tyr peptide-8 in 40 mM Hepes, pH 8.0.

Il substrato è stato conservato a -20°C e protetto dalla luce.

- ATP.

Soluzione 100 mM di ATP in 20 mM Tris, pH 7.5.

Questa soluzione è stata conservata a -20°C.

- DTT.

Soluzione acquosa 1M DTT.

Questa soluzione è stata conservata a -20°C.

- TAMPONE DI REAZIONE.

Il tampone di reazione tirosinico è un tampone contenente 50 mM  $MgCl_2$  pH 7.5, viene conservato a -20°C.

Per lo svolgimento del saggio sono necessarie le seguenti soluzioni:

- tampone di reazione (10x),
- tampone di reazione (1x). Ottenuto per diluizione (1:10) in acqua milliQ del tampone di reazione (10x),
- Tyr Peptide-8 100 $\mu$ M (10x). Ottenuto per diluizione (1:10) in acqua milliQ del Tyr Peptide-8 1mM (100x),
- soluzione di ATP 10 mM (10x). Ottenuta per diluizione (1:10) in acqua milliQ della soluzione di ATP 100 mM (100x),
- soluzione di DTT 2 mM (10x). Ottenuta per diluizione (1:500) in acqua milliQ della soluzione di DTT 1 M (5000x),
- Chinasi ricombinante (KDR) 4 mU/ $\mu$ L. Ottenuta per diluizione della soluzione 0,43 mg/mL in tampone di reazione (1x),
- soluzioni diluite (in DMSO) dei composti da testare, alle concentrazioni stabilite.

Tutte le soluzioni devono essere conservate in ghiaccio fino al momento del loro utilizzo.

Per il saggio di attività vengono preparati 45  $\mu$ L di Master Mix costituiti da:

- 21  $\mu$ L di acqua milliQ.
- 6  $\mu$ L di Tyr peptide-8 (10x).
- 6  $\mu$ L di tampone di reazione (10x).
- 6  $\mu$ L di soluzione di ATP (10x).
- 6  $\mu$ L di soluzione di DTT (10x).

Per ciascuna reazione d'inibizione vengono aggiunti ai 45  $\mu$ L del Master Mix 0.5  $\mu$ L di composto alla concentrazione stabilita.

Dopo aver agitato bene le soluzioni di Master Mix si distribuiscono i 45.5  $\mu$ L nei corrispondenti pozzetti di reazione della piastra a 96 pozzetti (OPTIPLATE-96F, black, Perkin Elmer), incubando per cinque minuti a 30°C. Terminata l'incubazione si aggiungono 15  $\mu$ L di tampone di reazione nei pozzetti di controllo e 15  $\mu$ L di soluzione dell'enzima 4 mU/ $\mu$ L, pari a 60 mU enzimatiche totali, nei pozzetti delle reazioni.

I dati vengono raccolti ogni minuto per una durata complessiva di 50 minuti, utilizzando un lettore di piastre Victor 1460 multilabel counter (Perkin Elmer).

I parametri strumentali sono:

- energia della lampada = 7000 CW.
- tempo di misurazione = 0.1 sec



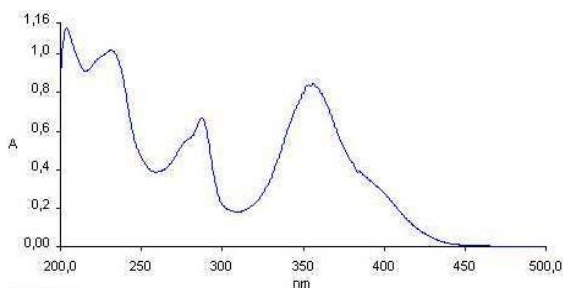
## 4. GRUPPO A: DERIVATI BENZO- E PIRIDO-TIOPIRANOINDOLICI

### RISULTATI E DISCUSSIONE

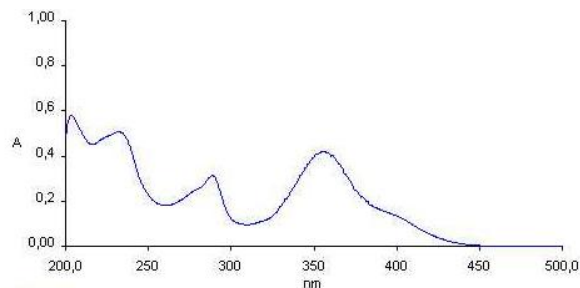
#### 4.1 CARATTERISTICHE SPETTROSCOPICHE

Le caratteristiche spettroscopiche dei composti in esame sono state determinate registrando lo spettro di assorbimento UV-vis (200-600 nm) in soluzione etanolica. Sono stati così evidenziati i principali picchi di assorbimento (Fig. 4.1).

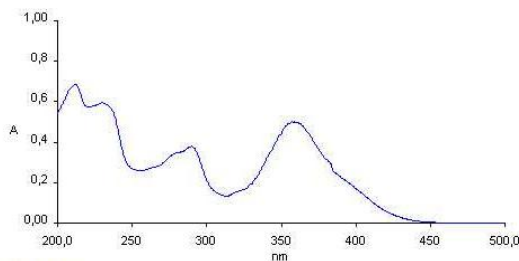
In **Tabella 4.1** sono riportati i coefficienti di estinzione molare ( $\epsilon$ ) dei composti in esame calcolati alle lunghezze d'onda alle quali si sono registrati i massimi di assorbimento.



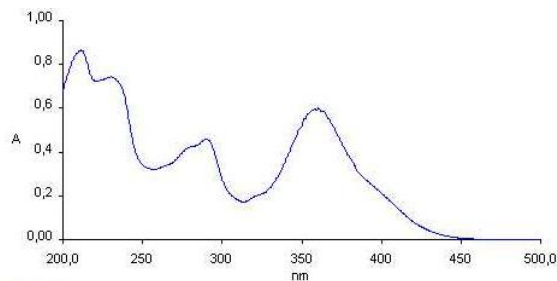
(a)



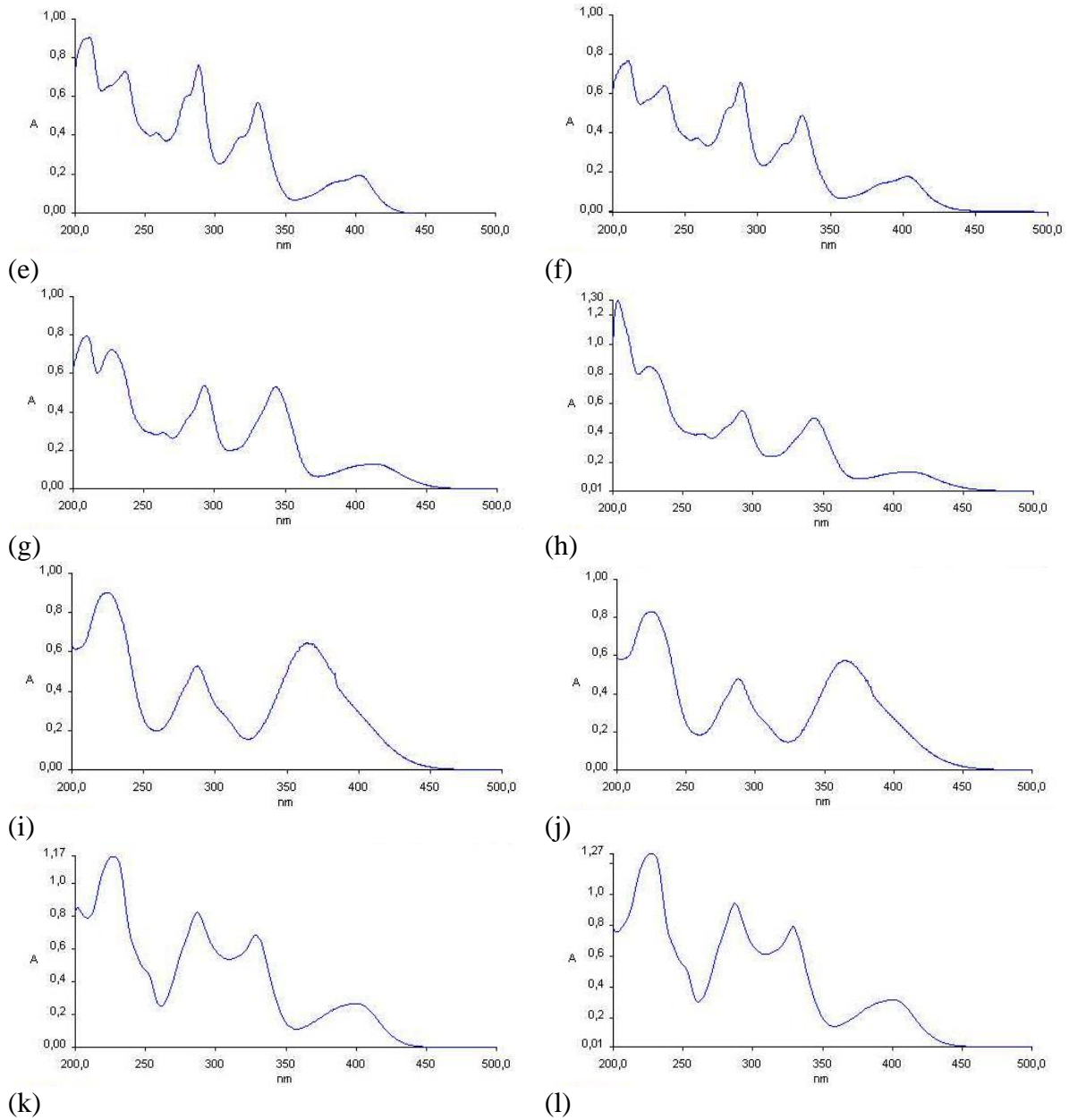
(b)



(c)



(d)



**Figura 4.1:** Spettro di assorbimento UV-vis di una soluzione etanolica del composto **A1** a  $3.33 \times 10^{-5} M$  (a); **A2** a  $2.41 \times 10^{-5} M$  (b); **A3** a  $2.24 \times 10^{-5} M$  (c); **A4** a  $2.26 \times 10^{-5} M$  (d); **A5** a  $2.68 \times 10^{-5} M$  (e); **A6** a  $2.51 \times 10^{-5} M$  (f); **A7** a  $2.09 \times 10^{-5} M$  (g); **A8** a  $2.72 \times 10^{-5} M$  (h); **A9** a  $2.93 \times 10^{-5} M$  (i); **A10** a  $2.58 \times 10^{-5} M$  (j); **A11** a  $4.16 \times 10^{-5} M$  (k); **A12** a  $4.13 \times 10^{-5} M$  (l).

## COMPOSTI DEL GRUPPO A

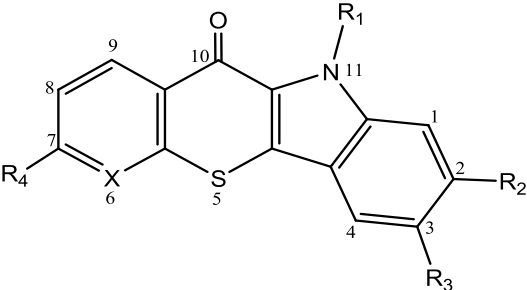
Composto	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\lambda_{\max}}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
A1	203	34290
	231	30840
	287	20240
	356	25580
A2	203	23650
	232	20790
	289	12820
	355	17380
A3	211	30590
	230	25450
	289	16920
	349	22280
A4	212	37970
	230	32740
	290	20500
	360	26400
A5	235	27240
	288	28320
	330	21190
	402	7230
A6	235	25670
	288	26210
	330	19530
	403	7060
A7	227	34730
	292	25810
	343	25470
	413	6120
A8	226	31270
	292	20230
	343	18500
	411	4960
A9	225	30780
	287	18000
	364	22000
A10	225	32200
	288	18550
	365	22360
A11	400	6550
	329	16970
	287	20180
	226	28280
A12	400	7410
	329	18640
	287	22170
	226	31570

**Tabella 4.1:** Coefficienti di estinzione molare ( $\epsilon$ ) in etanolo alle lunghezze d'onda di massimo assorbimento.

## 4.2 STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA

La capacità antiproliferativa dei composti in esame è stata valutata mediante saggi *in vitro* seguendo le metodiche descritte in Materiali e Metodi. Gli esperimenti sono stati condotti su tre linee cellulari tumorali umane: HeLa, A-431 e MSTO 211.

Nei saggi di attività antiproliferativa le cellule sono state incubate per 72 ore con concentrazioni differenti di composto. Nella Tabella 4.2 sono riportati i risultati ottenuti, espressi come  $GI_{50}$ , cioè come concentrazione ( $\mu\text{M}$ ) di composto in grado di provocare la morte del 50% delle cellule trattate rispetto ad un campione non trattato.

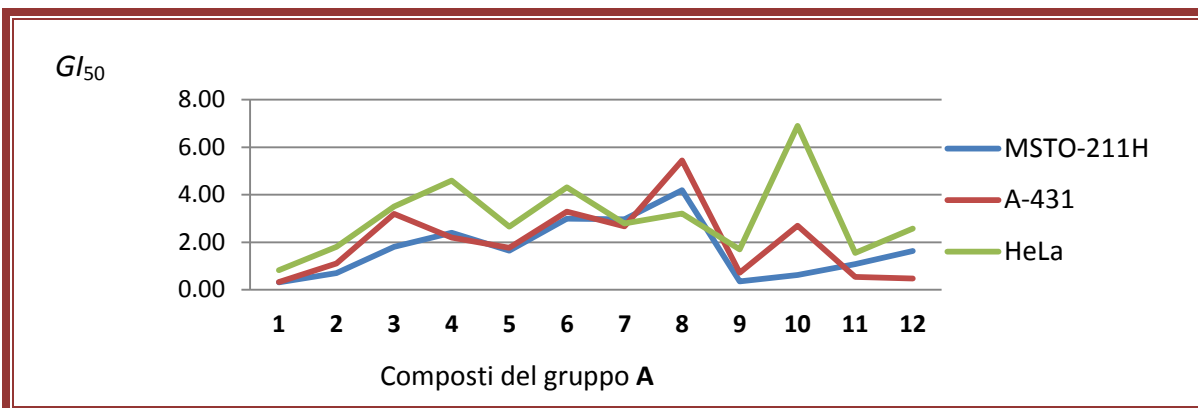


Comp.	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	GI <sub>50</sub> (μM)		
						HeLa	A-431	MSTO-211H
A1	C	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	0.82 ± 0.04	0.33 ± 0.06	0.31 ± 0.03
A2	C	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	1.8 ± 0.3	1.1 ± 0.4	0.70 ± 0.05
A3	C	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	3.5 ± 0.4	3.2 ± 0.6	1.8 ± 0.6
A4	C	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	4.6 ± 0.4	2.2 ± 0.8	2.4 ± 0.5
A5	C	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	H	Cl	Cl	2.66 ± 0.74	1.76 ± 0.68	1.64 ± 0.55
A6	C	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	H	Cl	Cl	4.31 ± 1.15	3.29 ± 1.71	2.99 ± 0.11
A7	C	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	H	OCH <sub>3</sub>	Cl	2.79 ± 0.95	2.67 ± 0.46	2.96 ± 0.05
A8	C	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	H	OCH <sub>3</sub>	Cl	3.21 ± 0.26	5.44 ± 0.48	4.19 ± 0.14
A9	N	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	1.7 ± 0.01	0.71 ± 0.28	0.35 ± 0.03
A10	N	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	6.9 ± 1.2	2.7 ± 1.7	0.62 ± 0.01
A11	N	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	-H	-H	H	1.55 ± 0.05	0.54 ± 0.04	1.08 ± 0.07
A12	N	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •HCl	-H	-H	H	2.57 ± 0.21	0.47 ± 0.02	1.63 ± 0.06
ELLIPTICINA						0.82 ± 1.2	0.87 ± 0.15	0.77 ± 0.44

**Tabella 4.2:** Attività antiproliferativa dei composti. I valori di GI<sub>50</sub> sono stati calcolati come media di almeno tre esperimenti ± deviazione standard.

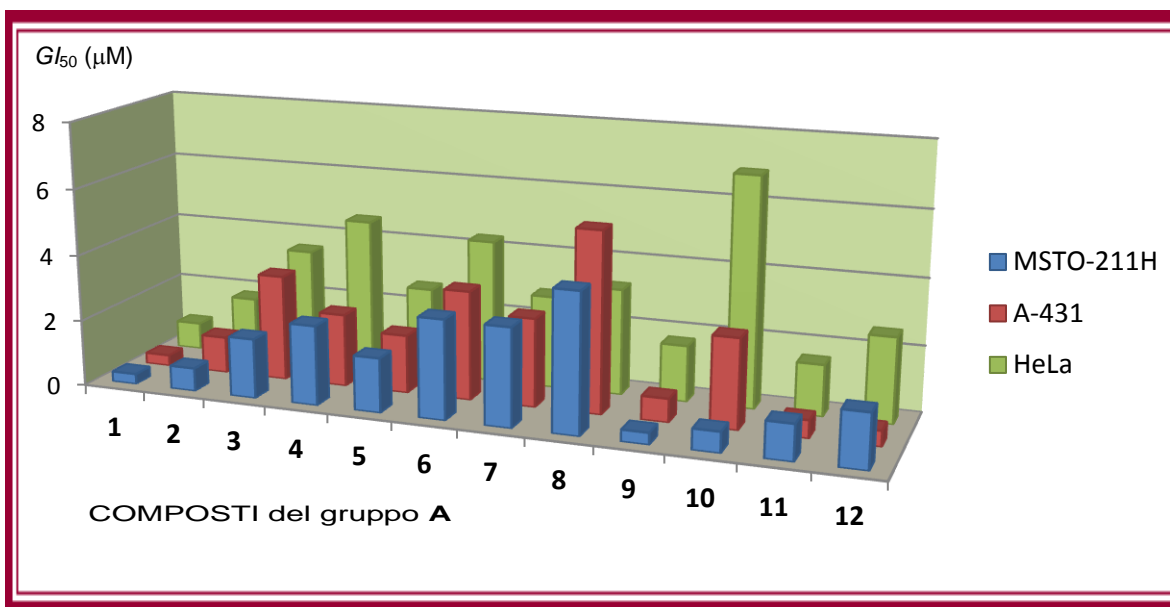
Osservando i valori ottenuti si può notare come tutti i composti presi in esame posseggano una buona attività citotossica.

Per tutti i composti i valori di GI<sub>50</sub> ottenuti variano tra 0.31-6.9 μM, e indicano una certa differenza di sensibilità da parte delle linee cellulari considerate. Infatti, si può evidenziare un andamento nel quale le cellule HeLa manifestano nella pressochè totalità dei casi minore sensibilità, seguite dalle A-431 e infine dalle MSTO-211H (Figura 4.2).



**Figura 4.2:** Sensibilità delle cellule HeLa, A-431 e MSTO-211 H nei confronti dell'attività citotossica dei composti in studio.

Inoltre, i composti **A1**, **A9** e **A11** risultano i più attivi, con valori di  $GI_{50}$  che variano tra 0.31 e 1.7  $\mu\text{M}$ , seguono, in termini di attività i derivati **A2**, **A3**, **A5**, **A7** e **A12** mentre **A4**, **A6**, **A8** e **A10** manifestano la minore capacità antiproliferativa (**Figura 4.3**).



**Figura 4.3:** Attività citotossica dei composti in studio sulle cellule MSTO-211H, A-431 e HeLa.

Questi risultati evidenziano innanzitutto un certo ruolo del sostituito in posizione 7, nella quale la sostituzione dell'atomo di idrogeno con uno di cloro, provoca una significativa diminuzione di attività. Infatti il confronto tra i valori di  $GI_{50}$  di **A3** e **A4**, nei quali  $R_4$  è un cloro, rispetto a **A1** e **A2**, nei quali  $R_4$  è un idrogeno, evidenzia un loro aumento da 2 fino a

9.7 volte. In generale tutti i composti recanti un atomo di cloro (composti da **A3** a **A8**) presentano più alti valori di citotossicità, con  $GI_{50}$  tra 1.8 e 5.44  $\mu$ M. Anche la presenza contemporanea di due metossili come sostituenti nelle posizioni 2 e 3, sembra influire sulla tossicità. Infatti il confronto tra l'attività antiproliferativa manifestata da **A9** e **A10**, aventi due gruppi metossilici in  $R_2$  e  $R_3$ , e i composti **A11** e **A12**, con un idrogeno nelle medesime posizioni, indica un maggior contributo alla citotossicità per gli idrogeni rispetto ai metossili, sia nelle cellule HeLa che nelle A-431. Un andamento opposto si verifica invece nelle cellule MSTO-211H con un aumento dei valori di  $GI_{50}$  di circa tre volte, apparentemente dovuto alla mancanza dei sostituenti metossilici.

Anche l'inserimento di un gruppo benzenico o pirimidinico nel tetraciclo influenza l'attività antiproliferativa. Infatti, il confronto tra i valori di citotossicità dei composti **A1** e **A2**, caratterizzati dall'anello benzenico con gli analoghi **A9** e **A10**, aventi la pirimidina, indica un aumento di citotossicità in presenza del benzene, e questa differenza si osserva su tutte le linee cellulari.

Determinante rimane, come già dimostrato negli studi precedenti svolti con analoghi benzotiopiranoindolici privi di sostituenti in  $R_1$ , il ruolo della catena dialchilamminoalchilica inserita sull'azoto indolico<sup>[40]</sup>. In particolare, l'aumento della lunghezza e dell'ingombro del terminale alchilico causa una sensibile diminuzione di attività. Infatti i composti recanti la catena dimetilamminoetilica (composti dispari) manifestano una capacità antiproliferativa maggiore rispetto ai corrispondenti derivati funzionalizzati con una catena dietilamminoetilica (composti pari). Tale andamento è evidente su tutte le linee cellulari studiate. Si può anche notare che la citotossicità dei composti dispari può essere fino a 4 volte maggiore rispetto a quella ottenuta per i composti pari come si può osservare nel confronto in cellule HeLa tra il composto **A9** vs **A10** e nelle cellule A-431 tra il composto **A1** vs **A2** e **A9** vs **A10**

### 4.3 INTERAZIONE COMPOSTO-DNA

La formazione di un complesso tra i composti in esame ed il DNA è stata studiata mediante misure di dicroismo lineare (DL) in flusso.

Lo spettro dicroico di una soluzione di DNA presenta a 260 nm una banda dicroica negativa, dovuta alle transizioni elettroniche ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) delle basi puriniche e pirimidiniche. Poiché tali transizioni avvengono con un momento di transizione parallelo al piano delle basi stesse, un segnale dicroico negativo a 260 nm implica che le basi sono orientate con un angolo di 90° rispetto all'asse maggiore della macromolecola.

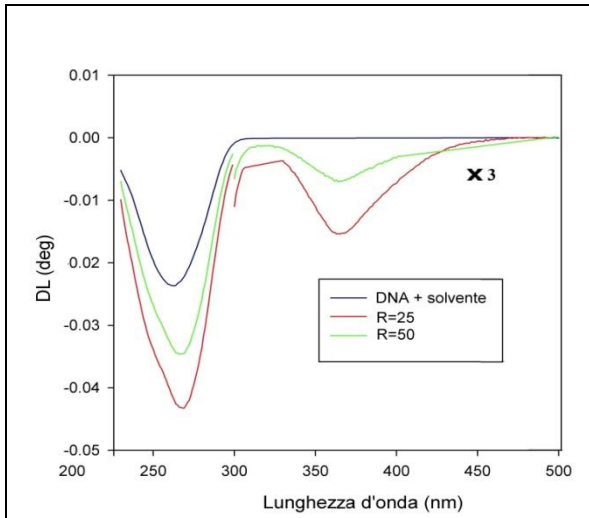
Infatti il dicroismo lineare è definito come  $LD = A_{//} - A_{\perp}$  (riferite all'asse della macromolecola). Di conseguenza l'assorbimento è maggiore quando il fascio di luce polarizzata è parallelo al piano delle basi ( $A_{\perp}$ ), minore quando la luce è polarizzata perpendicolarmente ad esso ( $A_{//}$ ). Ne risulta quindi un segnale negativo.

L'aggiunta di un cromoforo planare ad una soluzione di DNA, e quindi la formazione di un complesso di tipo intercalativo con l'acido nucleico, induce un aumento dell'intensità del segnale dicroico a 260 nm caratteristico della macromolecola, ed un'orientazione della molecola addizionata, che produce un segnale dicroico anch'esso negativo nella zona di assorbimento della stessa.

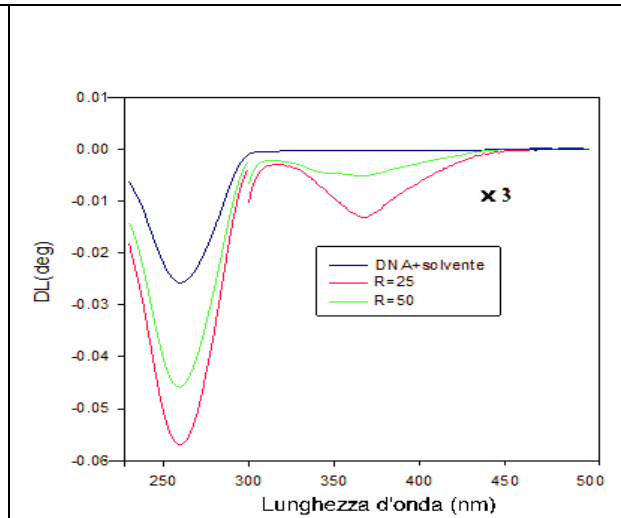
L'intensità del segnale è generalmente proporzionale alla quantità di ligando aggiunto e complessato con la macromolecola. Il segno indica invece la geometria di legame (orientazione del ligando).

Nelle figure che seguono (Fig. 4.2) sono riportati gli spettri di dicroismo lineare relativi agli esperimenti eseguiti con una soluzione di DNA a cui sono state aggiunte aliquote crescenti della sostanza, in modo da ottenere un rapporto DNA/ligando pari a 12.5, 25 o 50.

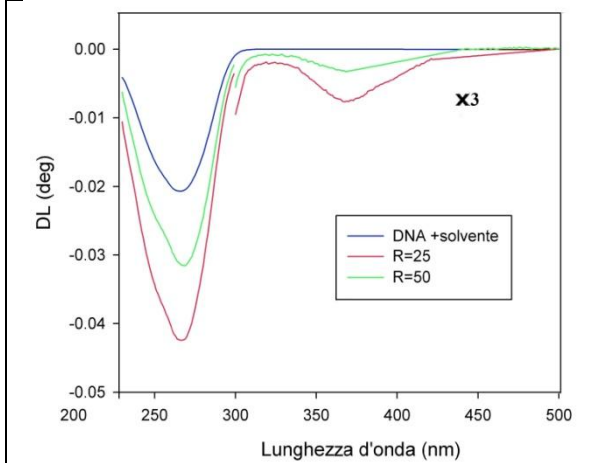




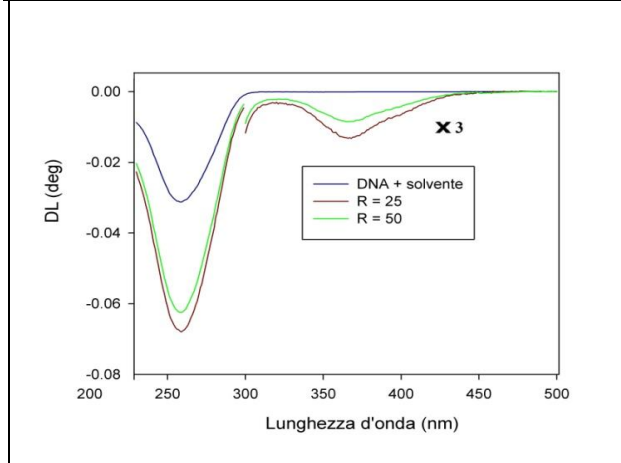
(a) A1



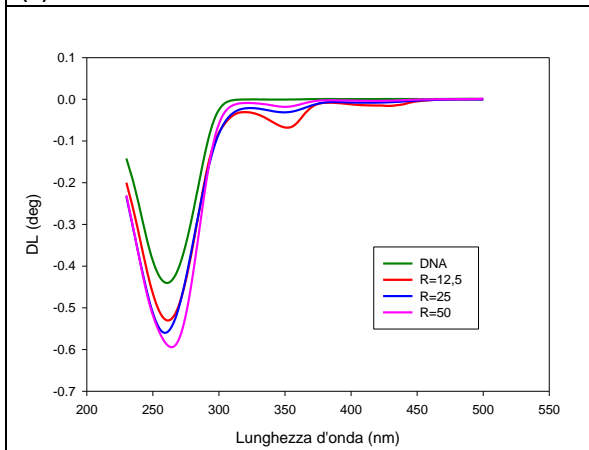
(b) A2



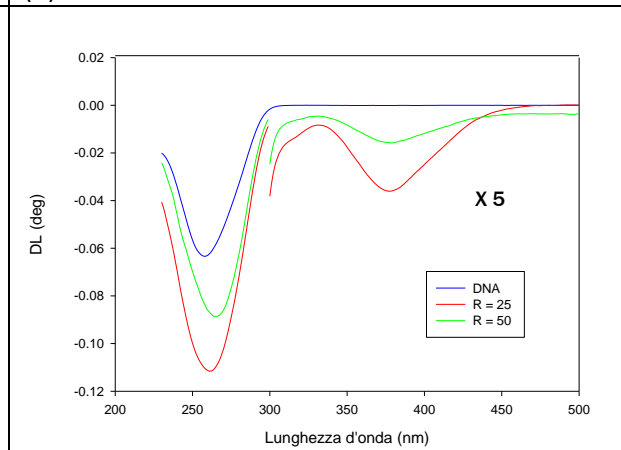
(c) A3



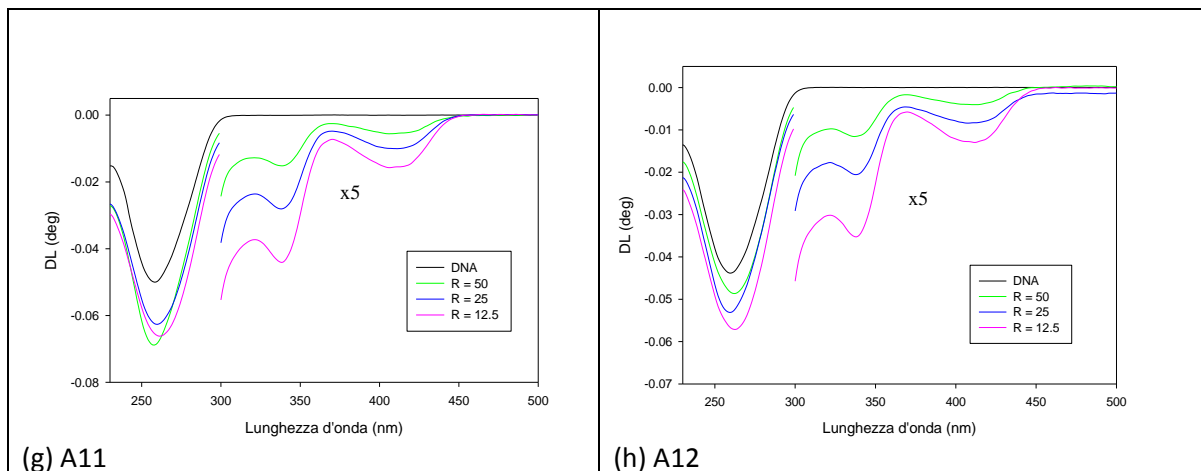
(d) A4



(e) A7



(f) A9



**Figura 4.2:** Spettri DL di soluzioni di  $[DNA] = 1.9 \times 10^{-3}$  e di  $[DNA]/[composto] = 50, 25$  o  $12.5$  in ETN  $0.01$  M,  $pH=7.0$  di alcuni composti selezionati.

Dagli spettri ottenuti si può notare, prima di tutto, che in presenza dei composti in esame le soluzioni di DNA presentano un incremento del segnale negativo a 260 nm. Questo comportamento suggerisce che la macromolecola, interagendo con le sostanze, assuma una conformazione più rigida ed allungata che le permette di orientarsi in modo migliore.

Una seconda ed importante informazione sull'esistenza di un processo di complessazione deriva dall'osservazione della zona di assorbimento dei cromofori benzo- e piridotiopiranoindolici. In questa regione infatti (300-450 nm) compare un segnale dicroico indotto di segno negativo la cui intensità aumenta all'aumentare della concentrazione del ligando aggiunto. Tale segnale indica che la sostanza in esame assuma anch'essa un'orientazione, confermando l'avvenuta interazione con la macromolecola. Inoltre il segno negativo, lo stesso del segnale dicroico del DNA a 260 nm, indica che le transizioni elettroniche che avvengono nel piano del cromoforo sono orientate parallelamente a quelle delle basi puriniche e pirimidiniche, ossia perpendicolarmente all'asse della molecola<sup>[42]</sup>.

In base ai risultati ottenuti possiamo pertanto concludere che i nuovi derivati pirido e benzotiopiranoindolici si complessano con il DNA secondo una geometria di tipo intercalativo.

#### 4.4 INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLE DNA TOPOISOMERASI

E' noto che alcuni importanti farmaci antitumorali ad attività intercalante esplicano il proprio effetto antiproliferativo interferendo con il ciclo catalitico delle DNA topoisomerasi<sup>[9,11]</sup>. Sulla base di queste considerazioni e considerando la capacità dei composti in esame di complessarsi con il DNA, attraverso un processo di tipo intercalativo, si è ritenuto di proseguire attraverso un approfondimento del meccanismo d'azione rivolto ad evidenziare un'eventuale capacità di interferire con l'attività catalitica dei suddetti enzimi.

In opportune condizioni sperimentali, entrambe le DNA topoisomerasi, I e II, sono in grado di rilassare il DNA plasmidico superavvolto attraverso il taglio di uno (Topo I) o entrambi (Topo II) i filamenti di DNA. Da un punto di vista sperimentale, la capacità dei composti di inibire le DNA topoisomerasi può essere dimostrata attraverso due approcci distinti, i quali consentono di discriminare tra un effetto veleno o un effetto di inibitore catalitico.

Per il saggio di inibizione dell'attività catalitica, si valuta la popolazione di topoisomeri a diverso grado di rilassamento che si forma quando il DNA plasmidico superavvolto viene trattato con gli enzimi. Queste diverse forme di DNA possono essere facilmente separate mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Più superavvolte sono le specie, più veloce sarà la loro corsa nel gel. Per visualizzare i diversi topoisomeri, il gel può essere colorato con bromuro di etidio, molecola organica planare, in grado di emettere luce fluorescente in seguito ad illuminazione ultravioletta, dopo l'avvenuta intercalazione tra le basi azotate.

Se lo stesso esperimento viene eseguito utilizzando un gel di agarosio contenente bromuro di etidio, il risultato sarà diverso. Infatti le diverse forme di DNA, muovendosi verso l'anodo durante l'elettroforesi, si saturano progressivamente con le molecole di etidio presenti nel gel. Ciò provoca lo svolgimento della doppia elica e quindi un rallentamento della corsa del DNA superavvolto. La mobilità del DNA tagliato, che si forma

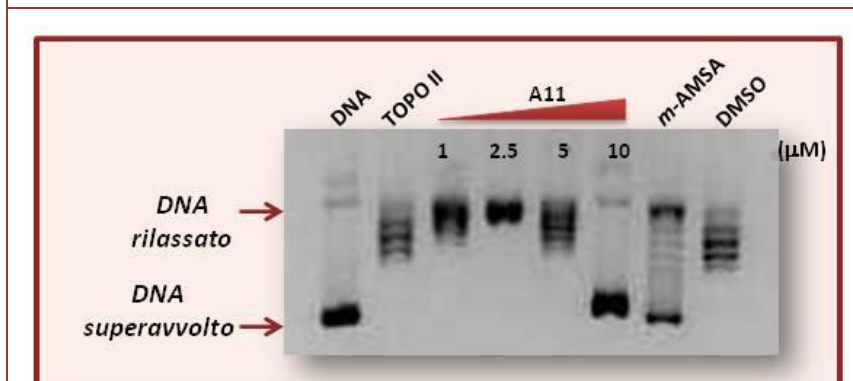
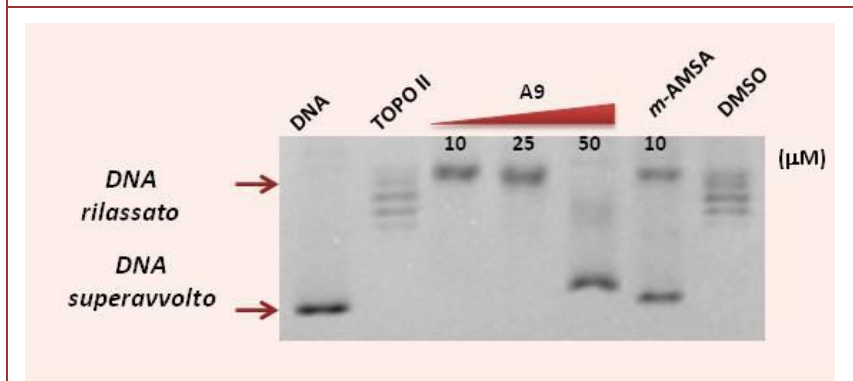
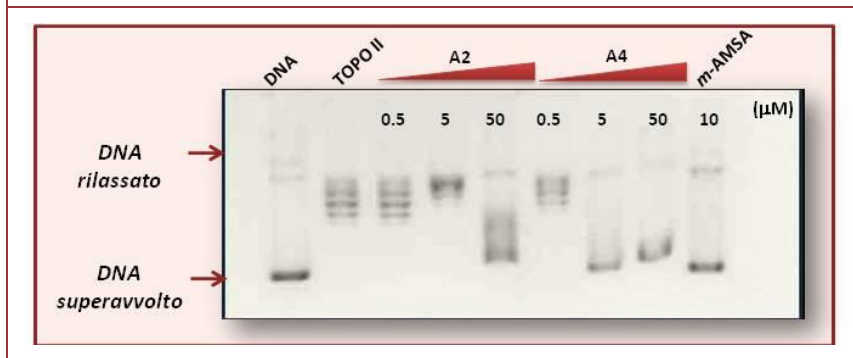
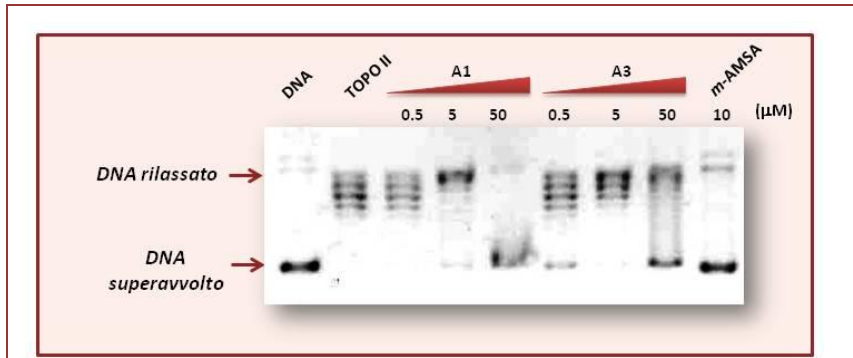
in seguito ad un effetto di avvelenamento, rimane, praticamente invariata perché l'intercalazione dell'etidio non ne modifica il grado di avvolgimento.

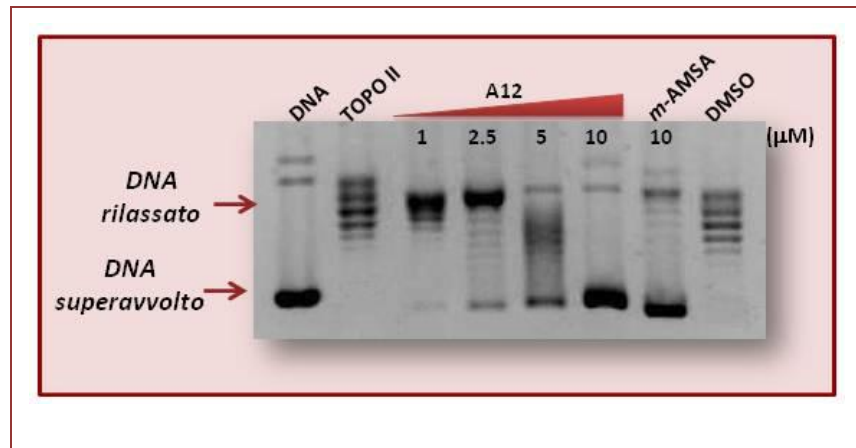
Questo secondo metodo viene utilizzato per la valutazione della formazione del “*cleavage complex*”, che prevede infatti la determinazione di eventuale DNA circolare tagliato (topoisomerasi I) o lineare (topoisomerasi II)<sup>[57]</sup>.

Come composti di riferimento per i diversi esperimenti sono stati utilizzati la camptotecina (CPT) e la *m*-amsacrina (*m*-AMSA), noti veleni delle Topo I e Topo II rispettivamente<sup>[13]</sup>. Infatti la CPT si pone all'interfaccia enzima-DNA e blocca in modo specifico la ricucitura della macromolecola<sup>[58]</sup>, mentre la *m*-AMSA è un farmaco antitumorale inibitore selettivo della Topo II, che esercita la sua attività citotossica mediante intercalazione tra le coppie di basi, cui consegue la capacità di stabilizzare il complesso covalente DNA-enzima<sup>[13]</sup> trasformando così l'enzima in una endonucleasi che “avvelena” la cellula.

#### **4.4.1 Saggio di inibizione dell'attività di rilassamento della DNA topoisomerasi II**

Per ognuno degli esperimenti sono stati allestiti, come descritto nella sezione Materiali e Metodi, un campione con il solo DNA plasmidico superavvolto pBR322 (0.25 µg/µL) (DNA), un secondo campione al quale è stato aggiunto al DNA l'enzima (1 unità) (Topo II), ed infine i campioni contenenti DNA, enzima e i composti in esame alle concentrazioni stabilite. Come composto di riferimento è stata utilizzata la *m*-AMSA alla concentrazione 10 µM.





**Figura 4.3:** Elettroforesi su gel d'agarosio del saggio di inibizione dell'attività di rilassamento sulla topoisomerasi II in presenza dei composti selezionati.

Gli esperimenti relativi al saggio di inibizione dell'attività di rilassamento dell'enzima sono stati condotti in presenza di concentrazioni crescenti di ogni composto con lo scopo di evidenziare la minima concentrazione capace di provocare un'inibizione totale dell'enzima.

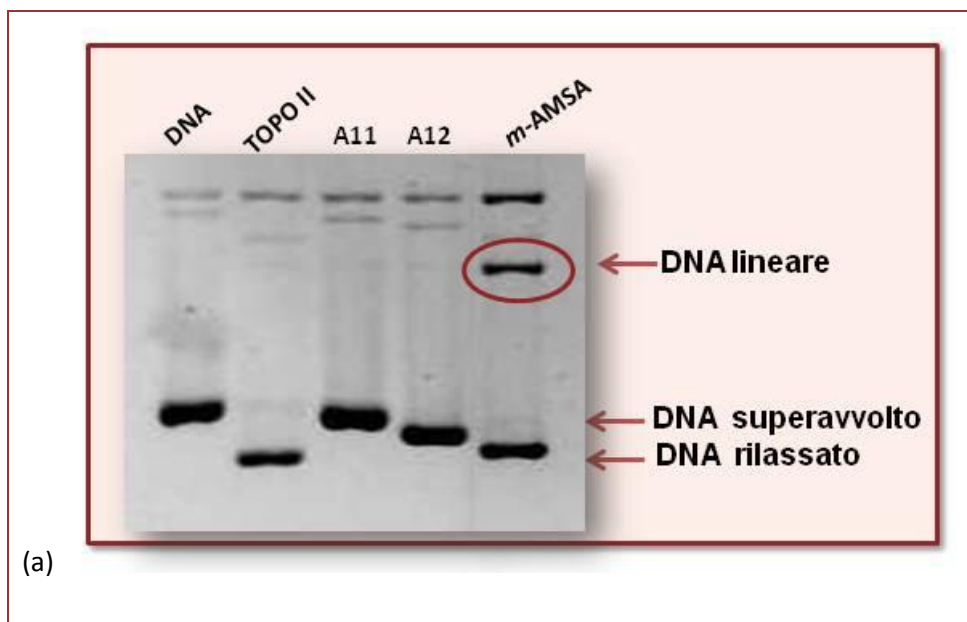
In Figura 4.3 sono riportati i risultati della corsa elettroforetica relativa al saggio di inibizione dell'attività di rilassamento della DNA topoisomerasi II in presenza di concentrazioni crescenti dei composti **A1 - A4**, **A9**, **A11** e **A12**. Si può osservare che il DNA superavvolto migra velocemente (**DNA**), mentre in seguito a trattamento con l'enzima, i topoisomeri che si vengono a formare corrono più o meno lentamente a seconda del diverso numero di legame (**TOPO II**). Tutti i composti presi in considerazione mostrano la capacità di inibire l'attività enzimatica. Un effetto d'inibizione totale si osserva con i composti **A1**, **A3**, **A2**, **A4** e **A9** alla concentrazione di 50  $\mu\text{M}$ , mentre in presenza dei composti **A11** e **A12** lo stesso effetto lo si ottiene alla concentrazione 10  $\mu\text{M}$ . È interessante sottolineare che questi ultimi composti (**A11** e **A12**) presentano come caratteristica strutturale comune la presenza del gruppo pirido nel tetraciclo e nessun sostituente nelle posizioni 2, 3, e 7.

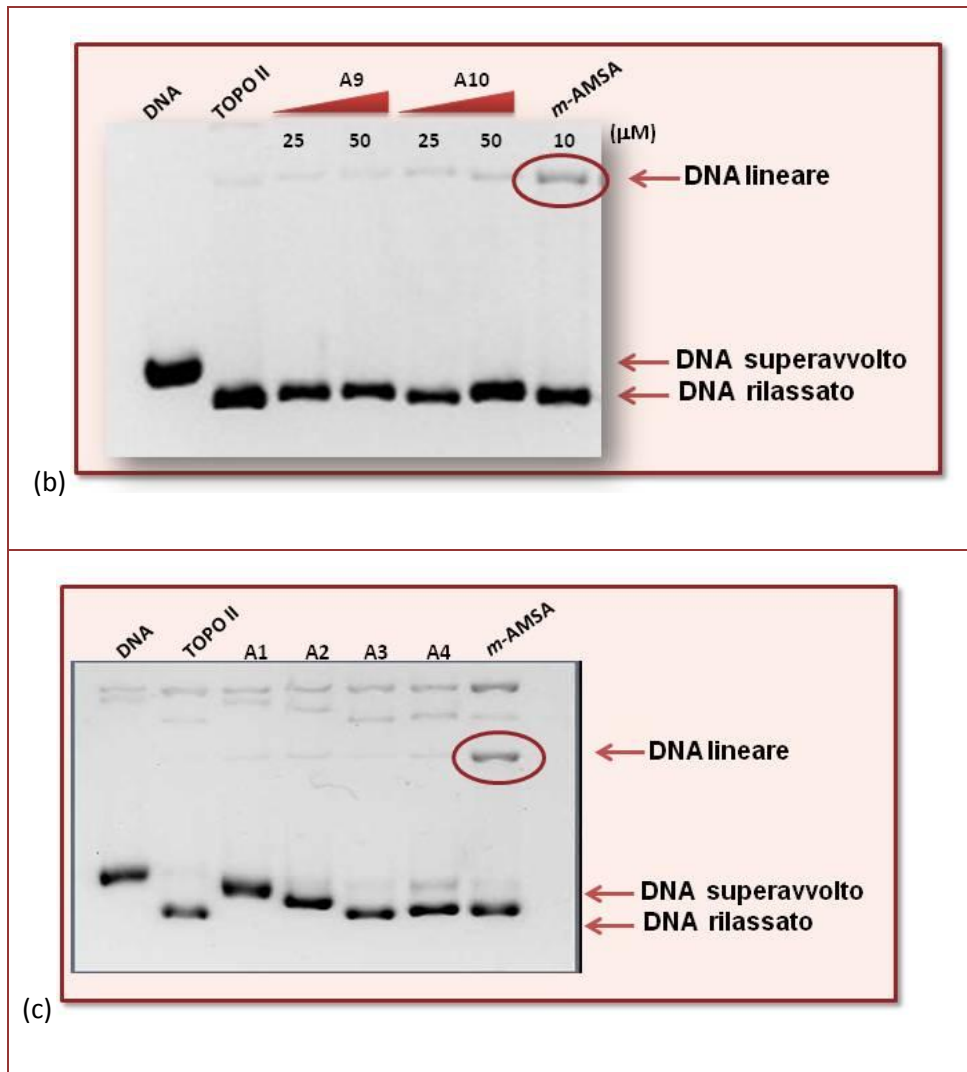
#### 4.4.2 Saggio di determinazione della formazione del *cleavage complex* mediato dalla DNA topoisomerasi II

Poichè i composti **A1** e **A2** interferiscono con l'attività di rilassamento del DNA superavvolta catalizzata dalla Topo II, è parso interessante stabilire se essi agiscano come inibitori catalitici oppure come veleni.

Per ognuno degli esperimenti sono stati allestiti, come descritto nella sezione Materiali e Metodi, un campione con il solo DNA plasmidico superavvolto pBR322, un secondo campione al quale è stato aggiunto al DNA l'enzima, ed infine i campioni contenenti DNA, enzima e i composti in esame alle concentrazioni stabilite, o la *m*-AMSA alla concentrazione di 10 µM, quale farmaco di riferimento.

Nella Figura 4.4 si riporta la corsa elettroforetica relativa al saggio di determinazione della formazione del *cleavage complex* per i composti selezionati. In queste condizioni sperimentali, discriminante per verificare se è avvenuta la formazione di tale complesso, è la comparsa della banda relativa al DNA lineare, evidente nell'incubazione con il farmaco di riferimento.





**Figura 4.4:** Determinazione della formazione del cleavage complex in presenza dei composti selezionati. **A11** e **A12** a 20  $\mu\text{M}$  (a) **A9** e **A10** a 25 e 50  $\mu\text{M}$  (b) e **A1-A4** alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$  (c). La m-AMSA è stata utilizzata come farmaco di riferimento a 10  $\mu\text{M}$ .

I composti **A11** e **A12** (Fig. 4.4c) ad una concentrazione 20  $\mu\text{M}$  non sono in grado di indurre la formazione del “cleavable complex”, come dimostrato dall’assenza della banda in corrispondenza del DNA lineare. Gli stessi risultati si osservano anche per i composti **A1-A4** (Fig. 4.4a), **A9** e **A10** (Fig. 4.4b), fino ad una concentrazione di 50  $\mu\text{M}$ .

La assenza di effetto è stato riscontrato anche in presenza dei composti **A5-A8**, valutati fino ad una concentrazione di 50  $\mu\text{M}$ , (risultati non mostrati).



Gli risultati sopra descritti ci consentono pertanto di concludere che tutti i composti considerati interferiscono con il ciclo catalitico della topoisomerasi II in qualità di *inibitori* dell'enzima, non di *veleni*.

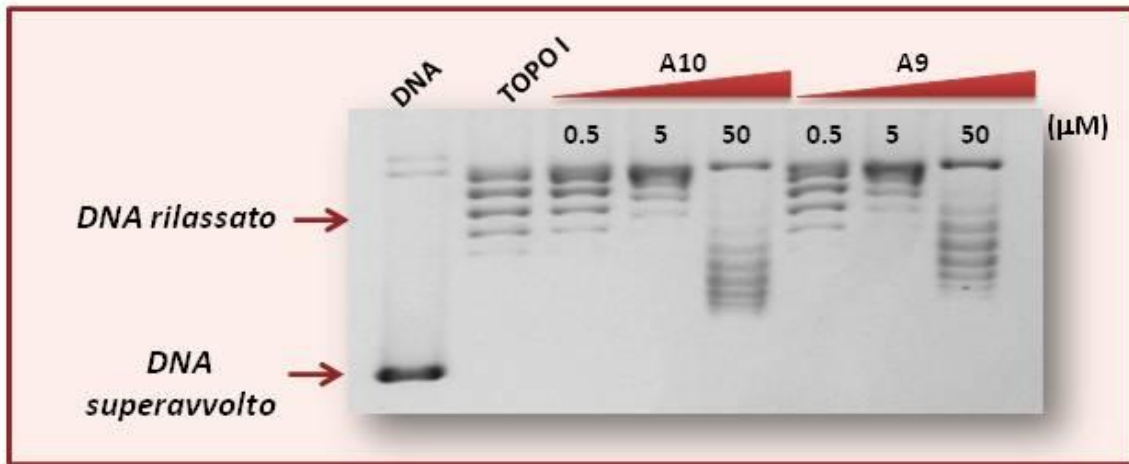
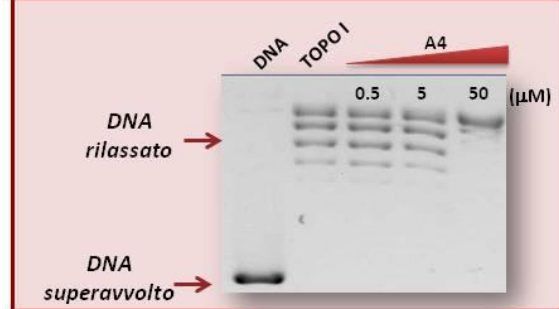
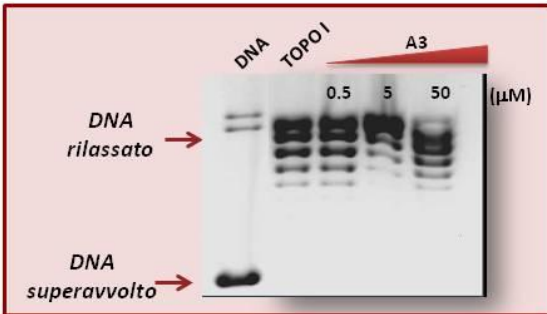
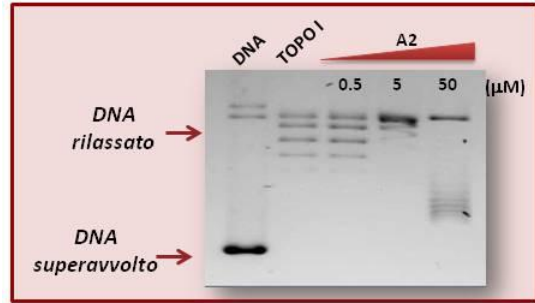
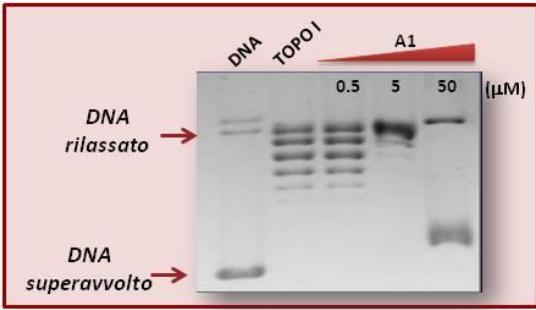
Alla luce di questi risultati e dell'evidente capacità intercalativa dimostrata dai nuovi derivati benzo- e pirido-tiopiranoindolici, si può ipotizzare che l'attività inibitoria osservata derivi da una maggiore difficoltà o dall'incapacità da parte dell'enzima di complessarsi al DNA come conseguenza di una distorsione strutturale della doppia elica dovuta all'intercalazione.

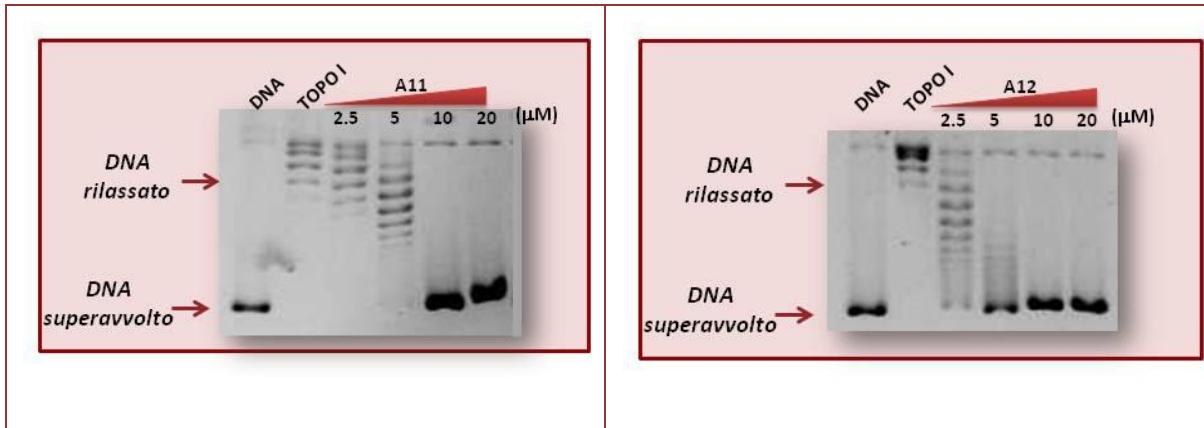
#### **4.4.3 Saggio di inibizione dell'attività di rilassamento della DNA topoisomerasi I**

Dato che l'effetto riscontrato sulla topoisomerasi II sembra derivare dalla capacità dei composti di complessarsi con la macromolecola, è parso interessante testarne l'attività anche sulla topoisomerasi I. L'azione di questo enzima determina un taglio ad un singolo filamento della doppia elica della macromolecola, provocando l'apertura della stessa e la formazione di intermedi a diverso grado di disavvolgimento.

Per ognuno degli esperimenti sono stati allestiti, come descritto nella sezione Materiali e Metodi, un campione con il solo DNA plasmidico superavvolto pBR322, un secondo campione al quale è stato aggiunto al DNA l'enzima, ed infine i campioni contenenti DNA, enzima e i composti in esame alle concentrazioni indicate.

La Figura 4.5 riporta i risultati della corsa elettroforetica relativa all'attività di rilassamento del DNA plasmidico superavvolto da pBR322 da parte della topoisomerasi I in presenza dei composti **A1-A4** e **A9-A12**. Anche in questo caso il DNA superavvolto migra più velocemente (**DNA**), mentre in presenza dell'enzima compaiono le bande relative ai topoisomeri (**TOPO I**) che migrano con velocità diverse.





**Figura 4.5:** Elettroforesi su gel di agarosio del saggio di inibizione dell'attività di rilassamento della Topo I in presenza dei composti selezionati.

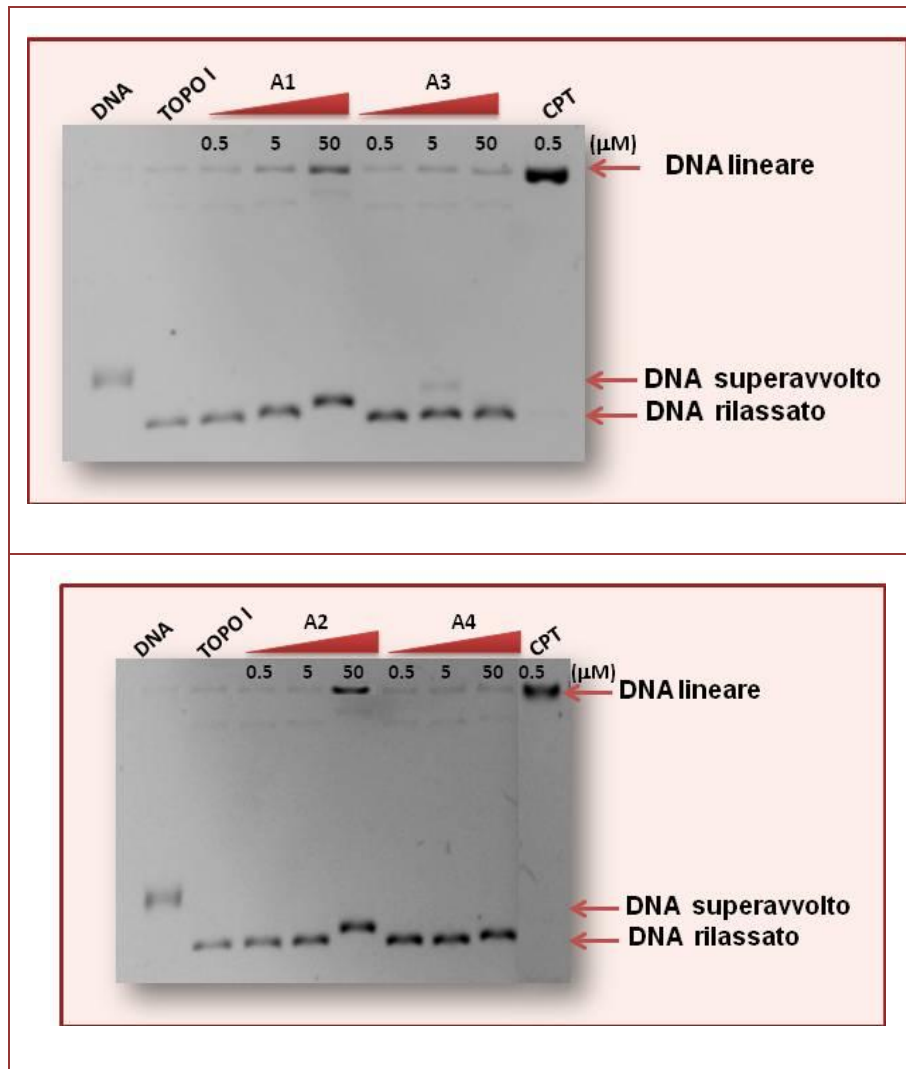
I risultati ottenuti con tutti i composti studiati indicano un'attività antitopoisomerasica dose-dipendente. Alle concentrazioni più basse l'inibizione è debole, infatti sono ancora ben visibili i diversi topoisomeri mentre all'aumentare della concentrazione l'inibizione dell'enzima è completa. In questa condizione sperimentale infatti i topoisomeri non sono più visibili e il DNA si presenta tutto allo stato superavvolto. Un ulteriore aumento della concentrazione induce nella banda di DNA superavvolto un rallentamento rispetto al campione di riferimento di DNA non trattato. Questo comportamento si può attribuire all'attività intercalativa del composto, che ad alte concentrazioni può indurre in virtù della complessazione modificazioni significative nella conformazione della macromolecola.

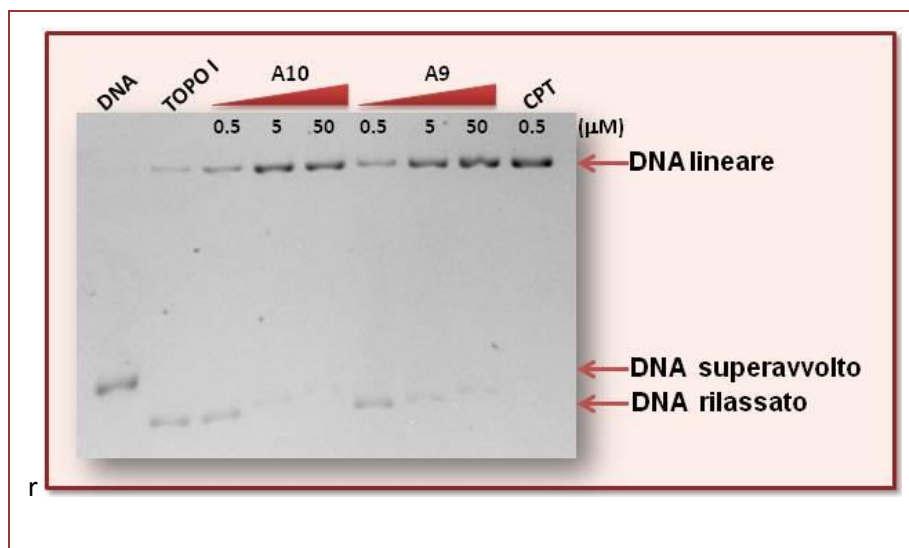
I composti **A3**, **A4**, **A9** e **A10**, alla concentrazione di 50  $\mu\text{M}$  manifestano un effetto inibitorio parziale dell'attività dell'enzima mentre, alla stessa concentrazione, i composti **A1** e **A2** inducono un'inibizione totale. È interessante sottolineare che i composti **A11** e **A12** inibiscono totalmente l'attività enzimatica a concentrazioni significativamente inferiori, 10 e 5  $\mu\text{M}$ , rispettivamente.

#### 4.4.4 Saggio di determinazione della formazione del *cleavage complex* mediato dalle DNA topoisomerasi I

Considerando gli interessanti risultati ottenuti sull'attività di rilassamento della topoisomerasi I, lo studio è proseguito con la determinazione della possibile formazione del "cleavage complex".

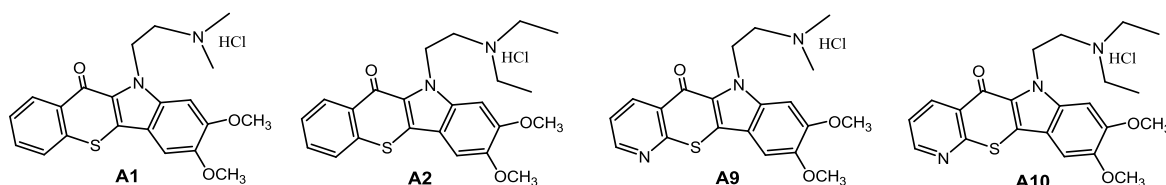
Nella Figura 4.6 si riporta la corsa elettroforetica relativa al saggio di determinazione della formazione del *cleavage complex* per i composti **A1-A4** e **A9-A10**. Come riferimento è stata utilizzata, nelle stesse condizioni sperimentali, la camptotecina (CPT), noto veleno della topoisomerasi I, alla concentrazione 0.5  $\mu\text{M}$ .





**Figura 4.6:** Elettroforesi su gel di agarosio del saggio di determinazione della formazione del cleavage complex in presenza dei composti selezionati.

I risultati ottenuti con indicano per **A1**, **A2**, **A9** e **A10** la capacità di stabilizzare il “cleavable complex” e in particolare tale capacità è più significativa per **A9** e **A10**. Dal punto di vista strutturale questi 4 composti sono benzo- e pirido-tiopiranoindoli caratterizzati dalla presenza dei medesimi sostituenti. In dettaglio, essi condividono due gruppi metossilici nelle posizioni 2 e 3 del tetraciclo e un atomo d’idrogeno nella posizione 7.



In conclusione tutti i composti presi in esame inibiscono l’attività di rilassamento catalizzata sia dall’enzima topoisomerasi II che topoisomerasi I, nessuno agisce come *veleno* della topoisomerasi II, mentre nel caso della topoisomerasi I, i composti **A1**, **A2**, **A9** e **A10** stabilizzano il “cleavable complex”.

#### 4.5 DETERMINAZIONI CITOFLUORIMETRICHE

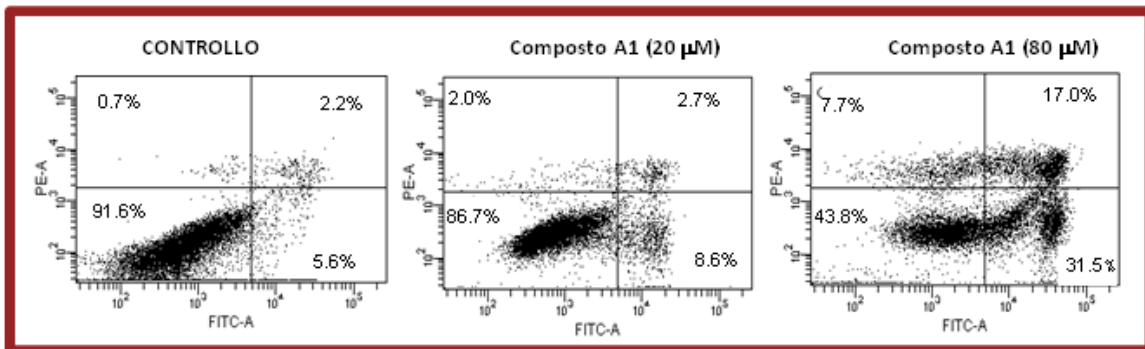
Per evidenziare la possibile induzione di morte cellulare programmata da parte dei composti è stata misurata mediante citofluorimetria a flusso la distribuzione di Annexin V-

FITC e ioduro di propidio-PI, (mediante un apposito Kit) su cellule HeLa, trattate per 18 ore con i composti a diverse concentrazioni.

In queste condizioni sperimentali è infatti possibile monitorare le cellule in queste tre condizioni: vive o in assenza di apoptosi misurabile (FITC-Annexin V e PI negativi); in apoptosi precoce con l'integrità della membrana mantenuta (FITC-Annexin V positiva e PI negativa); e infine in apoptosi tarda o morte (FITC-Annexin V e PI positivi).

Il livello basale delle diverse popolazioni cellulari è stato determinato analizzando una popolazione di cellule non trattate (91.6, 5.6, 2.2 e 0.7 le percentuali di cellule vive e relative all'apoptosi precoce, tardiva e alla necrosi, rispettivamente) (Figura 4.7).

I composti analizzati hanno diminuito la vitalità cellulare inducendo un corrispondente aumento della percentuale di cellule in apoptosi precoce e tardiva. In Figura 4.7 si riporta il grafico "dot plot" delle cellule HeLa di controllo e trattate con il composto **A1** a due diverse concentrazioni.



**Figura 4.7:** Apoptosi indotta in cellule HeLa dopo il trattamento con il composto **A1**, alle concentrazioni 20 e 80 µM. I numeri all'interno dei quadranti indicano la percentuale di cellule vive (quadrante in basso a sinistra, Annexin-V FITC-/PI-), in apoptosi precoce (quadrante in basso a destra, Annexin-V FITC+/PI-), in apoptosi tardiva (quadrante in alto a destra, Annexin-V FITC+/PI+), o necrotiche (quadrante in alto a sinistra, Annexin-V FITC-/PI+).

I dati ottenuti hanno evidenziato che il trattamento con il composto **A1** induce apoptosi cellulare in maniera dose-dipendente. Infatti si può notare un significativo aumento di cellule in apoptosi sia precoce che tardiva passando da 20 µM, 8.6%, e 2.7%,

rispettivamente, ad 80  $\mu\text{M}$ , 31.5% e 17.0%. All'aumentare della concentrazione si ha anche un certo aumento di cellule necrotiche (2.0% a 20  $\mu\text{M}$  e 7.7% a 80  $\mu\text{M}$ ), a fronte della loro pressochè totale assenza nelle condizioni di controllo (0.7%).

## CONCLUSIONI

Sono stati studiati otto derivati benzotiopiranoindolici (**A1-A8**) e quattro piridotiopiranoindolici (**A9-A12**), diversamente funzionalizzati: a livello dell'azoto indolico sono state inserite catene dialchilamminoalchiliche di diversa lunghezza, protonabili a pH fisiologico, mentre a livello del cromoforo tetraciclico possono essere presenti metossili o atomi di cloro.

Tutti i derivati hanno presentato un'attività antiproliferativa significativa sulle tre linee cellulari tumorali umane, prese in esame: HeLa, A-431 e MSTO-211H, con valori di  $GI_{50}$  sempre inferiori a 7.0  $\mu\text{M}$ . Di particolare interesse, il composto **A1** che si è rivelato il più citotossico, con  $0.31 \mu\text{M} < GI_{50} < 0.82 \mu\text{M}$ .

Le cellule HeLa manifestano nella pressochè totalità dei casi minore sensibilità al trattamento con i composti seguite dalle A-431 e infine dalle MSTO-211H.

I nuovi derivati pirido- e benzo-tiopiranoindolici si complessano con il DNA secondo una geometria di tipo intercalativo.

Tutti i composti presi in considerazione mostrano la capacità di inibire l'attività di rilassamento della DNA topoisomerasi II in maniera dose-dipendente. Interessanti appaiono soprattutto i composti **A11** e **A12**, i quali mostrano una capacità inibitoria totale a una concentrazione pari a 10  $\mu\text{M}$ . Dal punto di vista strutturale essi presentano come caratteristica comune la presenza del gruppo piridinico nel tetraciclo e nessun sostituente nelle posizioni 2, 3 e 7.

Nessuno dei composti studiati è in grado di agire come veleno nei confronti della topoisomerasi II.

Tutti i composti studiati manifestano anche un'attività anti-topoisomerasi I, dose-dipendente. Ancora una volta i composti più attivi appaiono **A11** e **A12**, i quali inducono un'inibizione totale a 10 µM.

Particolarmente degni di nota i composti **A1**, **A2**, **A9** e **A10** poichè stabilizzano il "*cleavable complex*" mediato dalla topoisomerasi I.

Un confronto in termini di relazioni struttura-attività permette di concludere che:

- I composti benzotiopiranoindolici recanti la catena dimetilamminoetilica a livello dell'azoto indolico sono più citotossici rispetto ai corrispondenti analoghi dietilamminoetilici.
- La presenza di un gruppo benzenico nel tetraciclo si dimostra più vantaggiosa in termini di citotossicità rispetto alla presenza di un gruppo piridinico.
- La presenza di un cloro nella posizione 7 del cromoforo diminuisce l'attività antiproliferativa.
- Il ruolo dei metossili nelle posizioni 2 e 3 del tetraciclo appare fondamentale per la comparsa di un'attività di veleno nei confronti della topoisomerasi I.



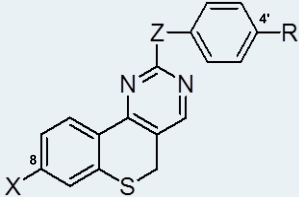
## 5. GRUPPO B: DERIVATI BENZOTIOPIRANOPIRIMIDINICI

### RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 5.1 STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA

La capacità dei composti benzotiopiranopirimidinici di inibire la proliferazione cellulare è stata studiata mediante saggi *in vitro* utilizzando tre linee cellulari tumorali umane, (HeLa, A-431 e MSTO-211H) trattate secondo le metodiche descritte nella sezione Materiali e Metodi.

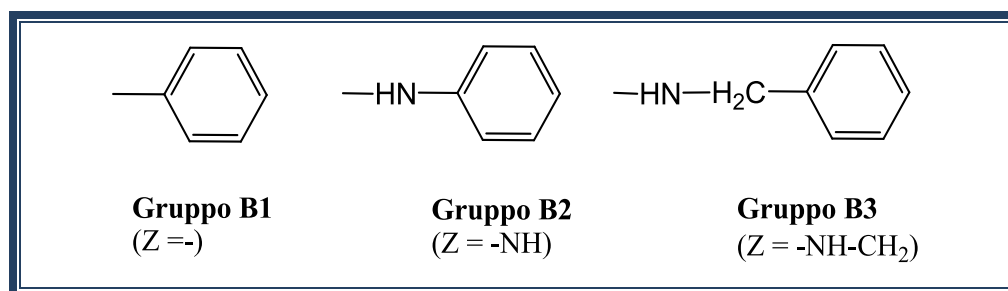
Nei saggi di attività antiproliferativa le cellule sono state incubate in presenza dei derivati in esame per 72 ore con concentrazioni comprese tra 0.1  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ . **SU5416** è stato preso in considerazione come composto di riferimento. Nella Tabella 5.1 vengono riportati i risultati ottenuti espressi come  $GI_{50}$ , ossia come concentrazione ( $\mu\text{M}$ ) di composto in grado di inibire la crescita cellulare del 50% delle cellule trattate rispetto ad un campione non trattato.



Comp.	Z	X	R	$GI_{50}(\mu\text{M})$		
				HeLa	A-431	MSTO-211H
B1a	-	H	H	>20	>20	>20
B1b	-	H	OCH <sub>3</sub>	>20	>20	>20
B1c	-	H	Cl	>20	>20	>20
B1d	-	OCH <sub>3</sub>	H	>20	6.5±1.2	11.9±1.1
B1e	-	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	>20	>20	>20
B1f	-	OCH <sub>3</sub>	Cl	>20	>20	>20
B1g	-	Cl	H	>20	>20	>20
B1h	-	Cl	OCH <sub>3</sub>	>20	>20	>20
B1i	-	Cl	Cl	>20	>20	>20
B2a	NH	H	H	10.2±2.1	>20	11.7±1.3
B2b	NH	H	OCH <sub>3</sub>	0.7±0.5	0.96±0.25	1.08±0.04
B2c	NH	H	Cl	15.6±2.2	>20	11.5±1.5
B2d	NH	OCH <sub>3</sub>	H	20.1	>20	15.0±1.6
B2e	NH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	0.83±0.14	0.96±0.2	1.08±0.2
B2f	NH	OCH <sub>3</sub>	Cl	>20	>20	>20
B2g	NH	Cl	H	>20	>20	>20
B2h	NH	Cl	OCH <sub>3</sub>	2.1±0.2	5.8±0.4	>20
B2i	NH	Cl	Cl	1.5±0.4	2.2±0.4	1.6±0.3
B3a	NHCH <sub>2</sub>	H	H	>20	>20	>20
B3b	NHCH <sub>2</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	>20	>20	>20
B3c	NHCH <sub>2</sub>	H	Cl	>20	>20	>20
B3d	NHCH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	>20	>20	>20
B3e	NHCH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	>20	>20	>20
B3f	NHCH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	>20	>20	>20
B3g	NHCH <sub>2</sub>	Cl	H	>20	>20	>20
B3h	NHCH <sub>2</sub>	Cl	OCH <sub>3</sub>	>20	>20	>20
B3i	NHCH <sub>2</sub>	Cl	Cl	>20	>20	>20
SU5416				38.5±0.5	37.2±0.4	27.3±1.8

**Tabella 5.1:** Attività antiproliferativa dei composti studiati e di **SU5416** su cellule HeLa, A-431 e MSTO-211H. I valori di  $GI_{50}$  sono calcolati come media di almeno tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

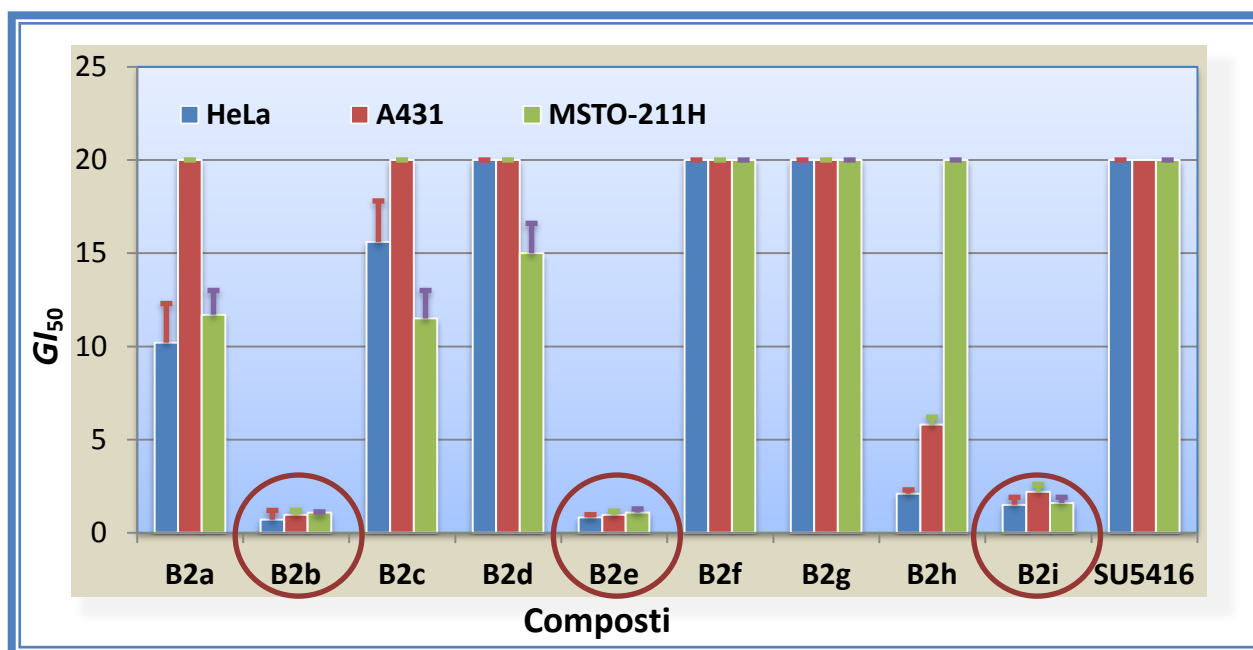
Per agevolare la discussione dei risultati i composti sono stati suddivisi in base alla lunghezza della catena (Z) ottenendo in questo modo tre gruppi: fenil derivati (**B1**), anilino derivati (**B2**) e benzilamino derivati (**B3**) (Figura 5.1). Ciascun gruppo consta di nove composti che a loro volta si differenziano in base ai sostituenti in posizione *para* (4') della catena laterale e in posizione 8 del cromoforo benzotiopiranopirimidinico (Tabella 4.3).



**Figura 5.1:** Catene laterali del gruppo benzotiopiranopirimidinico

Nella Tabella 5.1 e in Fig. 5.2 sono riportati i risultati ottenuti, espressi come  $GI_{50}$ , cioè come concentrazione ( $\mu\text{M}$ ) di composto in grado di provocare la morte del 50% delle cellule trattate rispetto ad un campione non trattato.

Osservando i valori ottenuti (Tabella 5.1) si può notare innanzitutto come sia i fenil che i benzilamino derivati (gruppi **B1** e **B3**) non manifestino un'attività antiproliferativa significativa nei confronti delle linee cellulari testate, ad eccezione del composto **B1d** che presenta una certa attività citotossica nei confronti delle cellule A-431 e MSTO-211H. Al contrario, i composti dotati di una anilina, come catena laterale (gruppo **B2**) presentano una promettente attività antiproliferativa e in particolare i *para* metossi derivati (**B2b**, **B2e**) e il dicloro, (**B2i**) mostrano il maggiore effetto citotossico.



**Figura 5.2** Grafico comparativo dell'attività antiproliferativa dei composti **B2a-i** e del composto di riferimento **SU5416** su cellule HeLa, A431 e MSTO-211H.

Inoltre si può osservare che esiste una correlazione tra l'attività antiproliferativa dei derivati del gruppo **B2** (Tabella 5.1 e Fig. 5.2) e i sostituenti presenti sia nel cromoforo, posizione (8), che nella catena laterale (posizione 4'). In particolare, quando la catena laterale nella posizione 4' non presenta alcun sostituito (**B2a**, **B2d**, **B2g**) l'attività è scarsa o assente, mentre se presenta un gruppo metossilico (**B2b**, **B2e**, **B2h**), l'attività antiproliferativa diminuisce se nella posizione 8 del cromoforo è presente un cloro. Al contrario, se la catena laterale presenta un cloro come sostituito (**B2c**, **B2f**, **B2i**) l'attività antiproliferativa compare solo se anche nella posizione 8 del cromoforo è presente un cloro. Complessivamente, i composti più attivi risultano **B2b**, **B2e** e **B2i** (Fig. 5.2).

Inoltre, i composti esaminati non sembrano manifestare una maggiore sensibilità verso una linea cellulare piuttosto che un'altra, indicando pertanto non specificità nei confronti delle cellule tumorali.

Per quanto riguarda il composto **SU5416**, noto inibitore del recettore tirosin-chinasico KDR e preso come riferimento, non si nota una rilevante azione antiproliferativa su

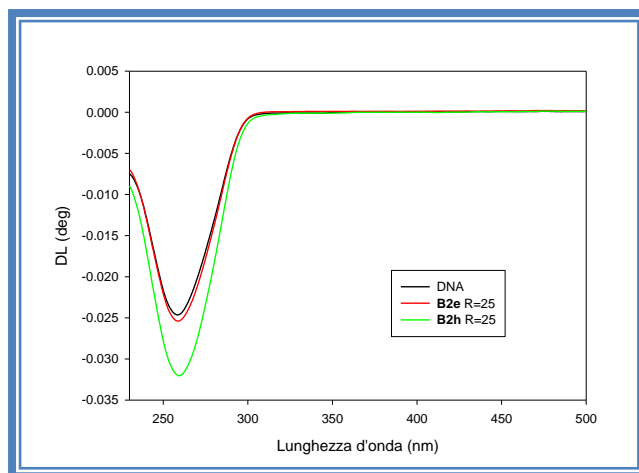
nessuna delle tre linee cellulari tumorali considerate, e questo in accordo con quanto riportato in letteratura<sup>[59]</sup>.

Pertanto, i risultati ottenuti permettono di concludere che:

- i derivati anilini rappresentano la condizione migliore in termini di attività, sia rispetto agli analoghi benzilaminici, che rispetto ai fenil derivati;
- il ruolo del sostituente X sembra meno rilevante rispetto a quello dei sostituenti anilini;
- l'inserimento di gruppi metossilici sul sostituente anilino; e idrogeno o metossile in X consentono di ottenere i derivati più attivi e con valori di  $G/_{50}$  paragonabili.

## 5.2 INTERAZIONE COMPOSTO-DNA

La formazione di un possibile complesso tra i composti in esame ed il DNA è stato studiato mediante misure di dicroismo lineare in flusso. Nella Figura 5.3 sono riportati a titolo di esempio gli spettri di dicroismo lineare relativi agli esperimenti eseguiti con una soluzione di DNA alla quale sono state aggiunte aliquote delle sostanze **B2e** e **B2h** in modo tale da ottenere un rapporto molare DNA/ligando pari a 25.



**Figura 5.3:** Spettri di dicroismo lineare (DL) di una soluzione di DNA da solo ed in presenza dei composti **B2e** e **B2h**, ad un rapporto molare  $[DNA]/[composto] = 25$  in ETN 0.01 M, pH = 7.

Osservando gli spettri ottenuti si può affermare che sia il composto **B2e** che il composto **B2h** non sono in grado di modificare significativamente lo spettro del DNA a lunghezze d'onda superiori rispetto a quelle di assorbimento della macromolecola. Infatti, nella regione di assorbimento dei cromofori (300-400 nm), non compaiono segnali dicroici indotti che dovrebbero indicare una possibile complessazione con la macromolecola.

Pertanto, dai risultati sopra riportati è possibile concludere che i composti esaminati non presentano un'attività complessante il DNA, e questo dato conferma l'ipotesi supportata dai risultati precedenti secondo i quali l'effetto citotossico provocato da queste tipologie strutturali dipende dal coinvolgimento di bersagli molecolari diversi dalla macromolecola<sup>[43]</sup>.

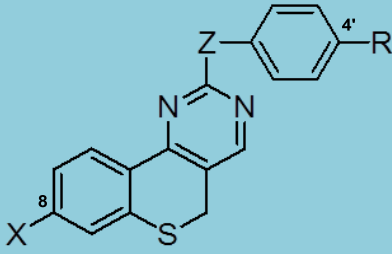
### **5.3 STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA SU HUVEC**

Studi precedenti svolti su diversi derivati contenenti un gruppo pirimidinico avevano dimostrato un effetto inibitorio nei confronti del recettore ad attività tirosin chinasi, KDR<sup>[47]</sup>.

Pertanto si è proseguito lo studio testando i composti su cellule non tumorali umane, le cellule HUVEC dell'endotelio della vena ombelicale umana, che esprimono il recettore suddetto.

Le cellule sono state trattate secondo le indicazioni descritte nella sezione Materiali e Metodi e i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 5.2.

COMPOSTI DEL GRUPPO B



Comp.	Z	X	R	$GI_{50}^a$ ( $\mu\text{M}$ ) HUVEC	% <sup>b</sup> KDR	$GI_{50}^c$ ( $\mu\text{M}$ ) KDR
B1a	-	H	H	4.0	<20	
B1b	-	H	OCH <sub>3</sub>	12	31	
B1c	-	H	Cl	11.3	<20	
B1d	-	OCH <sub>3</sub>	H	2.9	<20	
B1e	-	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	4.8	<20	
B1f	-	OCH <sub>3</sub>	Cl	>20	<20	
B1g	-	Cl	H	2.3	<20	
B1h	-	Cl	OCH <sub>3</sub>	4.7	41	
B1i	-	Cl	Cl	15.3	<20	
B2a	NH	H	H	2.4	54	8.2
B2b	NH	H	OCH <sub>3</sub>	0.45	67	2.7
B2c	NH	H	Cl	7.3	<20	>50
B2d	NH	OCH <sub>3</sub>	H	4.3	35	>50
B2e	NH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	0.74	39	17.5
B2f	NH	OCH <sub>3</sub>	Cl	>20	<20	>50
B2g	NH	Cl	H	>20	<20	>50
B2h	NH	Cl	OCH <sub>3</sub>	16.4	<20	>50
B2i	NH	Cl	Cl	0.35	61	5.6
B3a	NHCH <sub>2</sub>	H	H	>20	<20	
B3b	NHCH <sub>2</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	>20	<20	
B3c	NHCH <sub>2</sub>	H	Cl	12.3	<20	
B3d	NHCH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	>20	<20	
B3e	NHCH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	>20	<20	
B3f	NHCH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	>20	<20	
B3g	NHCH <sub>2</sub>	Cl	H	15.1	<20	
B3h	NHCH <sub>2</sub>	Cl	OCH <sub>3</sub>	12	35	
B3i	NHCH <sub>2</sub>	Cl	Cl	17	<20	
SU5416				12.8	40	12.9

<sup>a</sup>I valori di  $GI_{50}$  sono stati calcolati come media di almeno quattro esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

<sup>b</sup>Percentuali di inibizione di KDR alla concentrazione 7  $\mu\text{M}$ . <sup>c</sup>I valori di  $GI_{50}$  sono stati calcolati come media di almeno tre esperimenti e rappresentano la concentrazione che induce il 50% di riduzione dell'attività enzimatica.

**Tabella 5.2:** Attività antiproliferativa su cellule HUVEC e antiangiogenica anti-KDR dei composti studiati e di **SU5416** come composto di riferimento.

Tali risultati indicano come i composti più attivi sulle cellule, per i quali cioè si sono ottenuti valori di  $GI_{50}$  inferiori a 1  $\mu\text{M}$ , siano **B2b**, **B2e**, e **B2i**. Seguono in termini di efficacia antiproliferativa **B1a**, **B1d**, **B1e**, **B1g**, **B1h**, **B2a**, e **B2d**, per i quali i valori ottenuti sono ancora comunque inferiori a 5  $\mu\text{M}$ . Da ultimo in termini di attività abbiamo il derivato **B2c** con un valore di  $GI_{50}$  appena inferiore a 10  $\mu\text{M}$ . Per tutti gli altri, i valori osservati sono stati meno interessanti e sempre maggiori di 10  $\mu\text{M}$ .

Si deve sottolineare che per quanto riguarda i composti **B2b**, **B2e**, e **B2i**, essi mostrano un'elevata attività citotossica anche sulle altre linee cellulari prese in considerazione, suggerendo pertanto la presenza di un bersaglio condiviso.

Per quanto riguarda invece i valori di  $GI_{50}$  ottenuti per **B1a**, **B1d**, **B1e**, **B1g**, **B1h**, **B2a**, **B2c** e **B2d**, in questo caso l'effetto sulle cellule HUVEC è maggiore rispetto a quello ottenuto per le cellule tumorali, indicando pertanto una possibile specificità nei confronti del recettore tirosin chinasi, espresso in particolare su questa linea cellulare.

Pertanto, data la comparsa per alcuni derivati di una citotossicità interessante anche nelle cellule HUVEC, l'approfondimento del meccanismo d'azione è proseguito attraverso la determinazione *in vitro* dell'effetto sul recettore KDR.

## 5.4 DETERMINAZIONI FLUORIMETRICHE

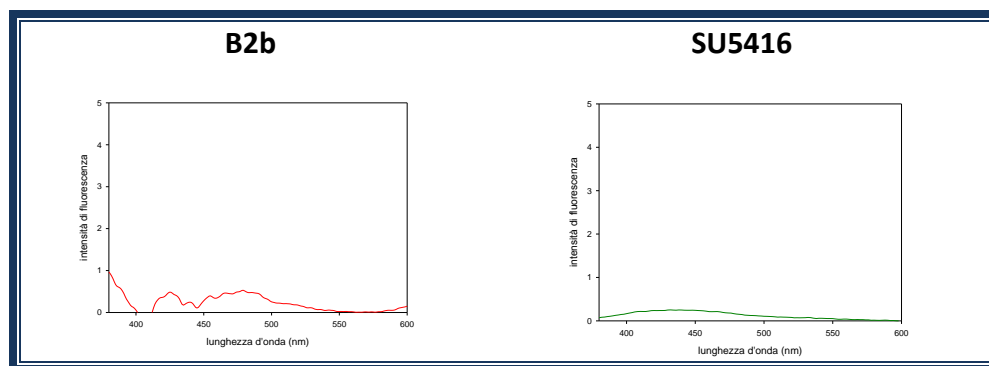
### 5.4.1. Spettri di emissione in fluorescenza

Allo scopo di eliminare eventuali interferenze, prima di eseguire il saggio di fosforilazione di KDR con i composti in esame, è stato determinato per ciascuno di essi lo spettro di emissione di fluorescenza nell'intervallo di lunghezza d'onda 360-600 nm, eccitando alla lunghezza d'onda di 355 nm.

Gli spettri di emissione in fluorescenza sono stati ricavati utilizzando soluzioni dei composti in esame alla concentrazione di 1  $\mu\text{M}$  in TAE. A titolo esemplificativo nella Fig. 5.4 si possono osservare gli spettri di fluorescenza del composto **B2b** e di **SU5416**. In



questa figura possiamo vedere che il composto riportato così come **SU5416** emettono un'intensità di fluorescenza pressochè nulla o del tutto trascurabile nelle condizioni sopra riportate. Analoghi risultati sono stati ottenuti anche per tutti gli altri derivati (spettri non riportati).



**Figura 5.4:** Spettro di emissione di fluorescenza del composto **B2b** e del composto di riferimento **SU5416**.

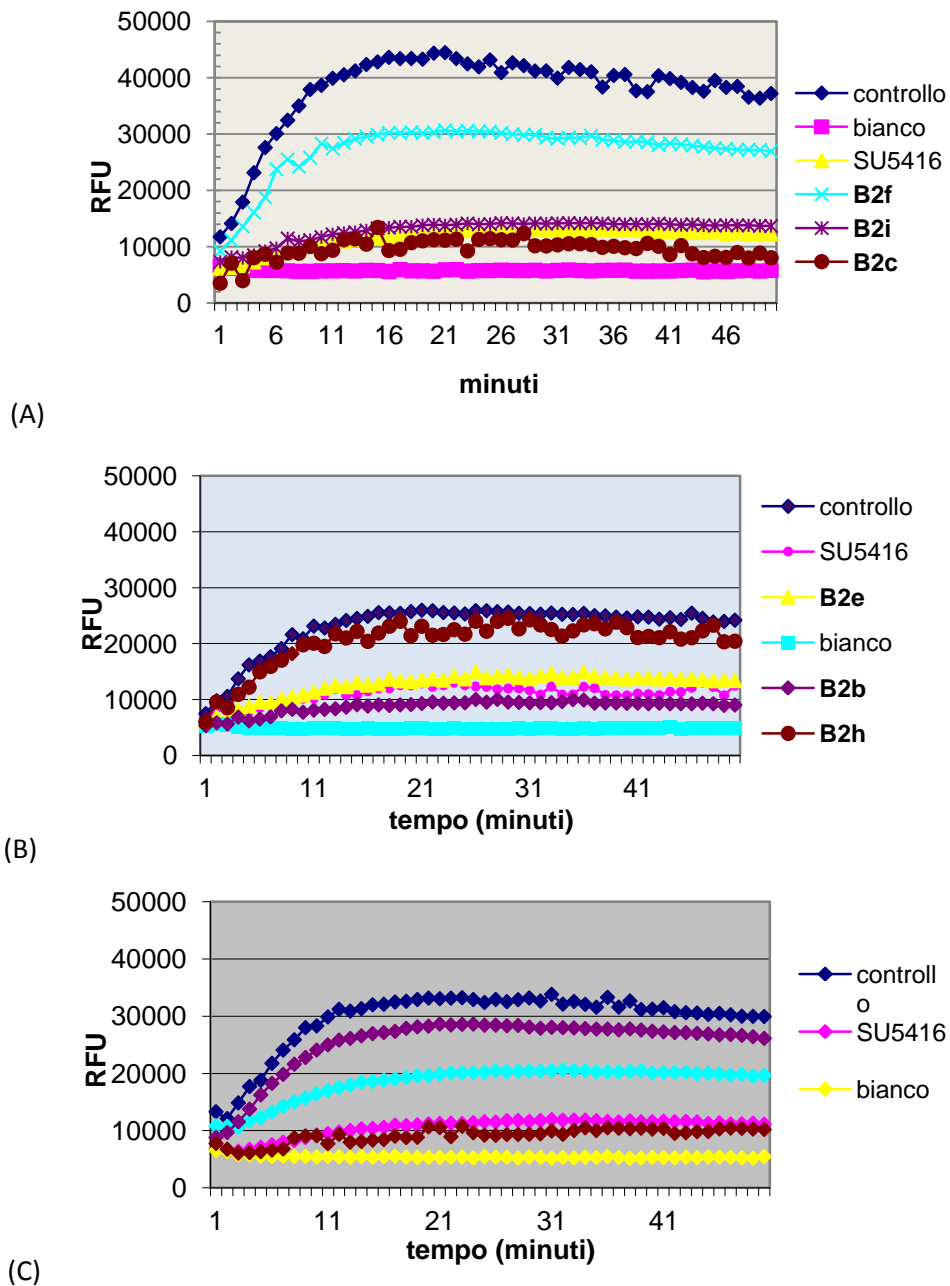
#### 5.4.2 Saggio di fosforilazione del recettore tirosin-chinasico KDR

Per verificare la riconducibilità dell'effetto antiproliferativo osservato sulle cellule HUVEC ad una possibile interferenza con l'attività del recettore KDR, si è proceduto determinando l'effetto dei composti in esame sull'attività tirosinchinasica dell'enzima *in vitro*.

Allo scopo di ottenere una prima panoramica d'insieme, i composti sono stati utilizzati preliminarmente tutti alla concentrazione 7  $\mu$ M. La scelta di questa concentrazione è stata dettata dal fatto che in questa condizione sperimentale **SU5416**, provoca un'inibizione dell'enzima di circa il 40%, consentendo pertanto una rapida individuazione dei composti sia a maggiore che a minore attività inibitoria.

Nelle Figure 5.5 A-C sono mostrati, a titolo di esempio, gli andamenti fosforilativi in presenza di enzima e substrato (controllo), in presenza di solo substrato (bianco) ed in presenza di enzima, substrato e dei composti **B2f**, **B2c**, **B2i**, e **SU5416** (A); **B2h**, **B2e**, **B2b**, e **SU5416** (B); **B2g**, **B2d**, **B2a**, e **SU5416** (C). Le corrispondenti percentuali di inibizione sono riportate in Tabella 5.2. Tali percentuali sono state calcolate considerando la differenza tra

i valori di fluorescenza (nel plateau) del controllo e il valore di fluorescenza del bianco pari a 100% di attività.

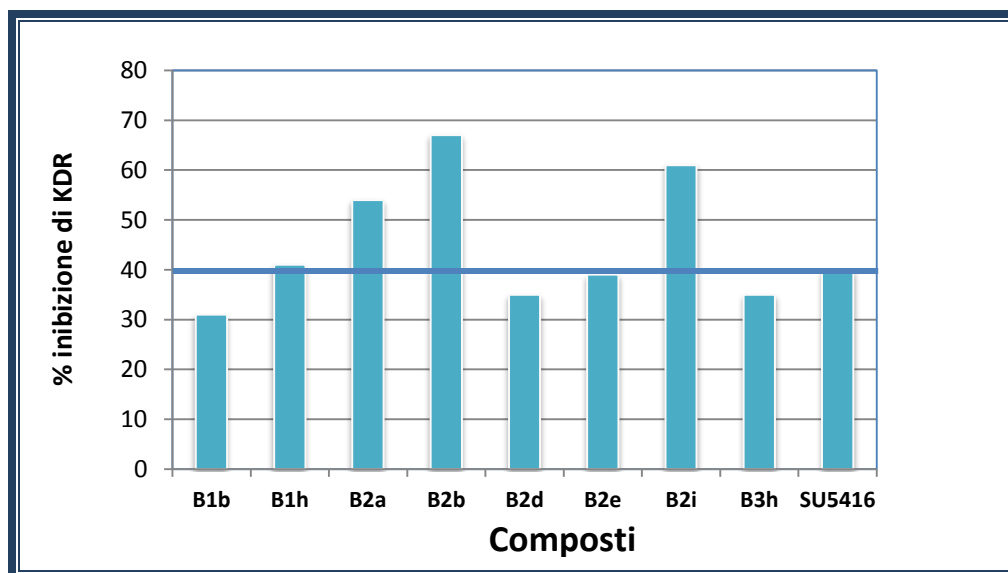


**Figura 5.5:** Saggio di inibizione di KDR in presenza dei composti **B2f**, **B2c**, **B2i**, e **SU5416** (A); **B2h**, **B2e**, **B2b**, e **SU5416** (B); **B2g**, **B2d**, **B2a**, e **SU5416** (C) alla concentrazione 7  $\mu$ M.

I risultati riportati in Tabella 5.2 evidenziano in generale valori di inibizione della fosforilazione interessanti per quasi tutti i derivati anilinici (gruppo **B2**), in alcuni casi (**B2a**,

**B2b** e **B2i**) addirittura maggiori rispetto al composto di riferimento **SU5416** (Fig. 5.6). L'inserimento di un gruppo metilenico nello spaziatore (composti del gruppo **B3**) o la delezione del gruppo aminico (gruppo **B1**) riducono significativamente o addirittura eliminano l'efficacia inibitoria nei confronti del recettore indicando che la lunghezza dello spaziatore nella catena laterale gioca un ruolo cruciale nei confronti dell'attività fosforilativa.

Ancora una volta, appare rilevante la presenza dei sostituenti sia in posizione 8 del cromoforo, che in posizione 4' della catena laterale. Nel dettaglio, derivati anilinici che non presentano sostituenti in 4' (**B2a**, **B2d**, **B2g**) o presentano un gruppo metossilico (**B2b**, **B2e**, **B2h**) mostrano una percentuale di inibizione che decresce progressivamente se nella posizione 8 del cromoforo è presente un metossile, o un cloro. Contrariamente, se la catena laterale presenta un sostituente 4'-cloro (**B2c**, **B2f**, **B2i**) l'inserzione di un ulteriore cloro nella posizione 8 aumenta la capacità inibitoria, come si può osservare nel composto **B2i**. Pertanto i composti più attivi appaiono **B2a**, **B2b**, e **B2i** mostrando, addirittura, una maggiore capacità di inibizione dell'attività chinasica rispetto a **SU5416** (Fig. 5.6). All'interno dei composti del gruppo **B1** e **B3**, solo i derivati 8-cloro 4'-metossi (**B1h** e **B3h**) presentano un certo effetto (Fig. 5.6).



**Figura 5.6:** Percentuali di inibizione di KDR dei composti attivi (% inibizione > 20 %) alla concentrazione 7  $\mu$ M.

L'attività inibitoria dei derivati 2-anilino sostituiti è stata calcolata anche come valore di  $GI_{50}$  (Tabella 5.2). I risultati confermano per **B2a**, **B2b**, **B2e** e **B2i** un'interessante capacità di inibire l'enzima, con valori di  $GI_{50}$  compresi tra 2.7 e 17.5  $\mu$ M, comparabili o perfino più bassi di quello ottenuto per il composto di riferimento (**SU5416**,  $GI_{50} = 12.9 \mu$ M).

## CONCLUSIONI

Sono stati studiati ventuno nuovi derivati benzotiopiranopirimidinici contenenti diverse catene laterali. I composti sono stati suddivisi in base alla lunghezza della catena ottenendo in questo modo tre gruppi distinti: fenil derivati (**B1**), anilino derivati (**B2**) e benzilamino derivati (**B3**). Ciascun gruppo consta di nove composti che a loro volta si differenziano in base ai sostituenti in posizione *para* (4') della catena laterale e in posizione 8 del cromoforo benzotiopiranopirimidinico.

I fenil e i benzilamino derivati (gruppi **B1** e **B3**) non mostrano un'attività antiproliferativa significativa nei confronti delle linee cellulari testate, ad eccezione del composto **B1d** che presenta una certa attività citotossica nei confronti di due linee cellulari, delle tre considerate. I composti dotati di un'anilina come catena laterale (gruppo **B2**), presentano invece una promettente attività antiproliferativa con valori di  $GI_{50}$  in alcuni casi anche submicromolari.

Tutti i composti non dimostrano apprezzabili differenze d'attività su una linea cellulare piuttosto che su un'altra, indicando pertanto non specificità nei confronti della tipologia tumorale.

Tuttavia, particolarmente interessanti sono apparsi i composti appartenenti al gruppo **B2** (anilino-derivati) poichè, sono in grado di provocare una maggiore attività antiproliferativa sulle cellule HUVEC, cellule endoteliali da vena ombelicale umana, e di inibire *in vitro*, in misura anche maggiore rispetto al composto di riferimento, l'enzima tirosinchinasico KDR, coinvolto, come noto, nell'angiogenesi tumorale.

## 6. GRUPPO C: ANALOGHI DEL TAMOXIFENE

### RISULTATI E DISCUSSIONE

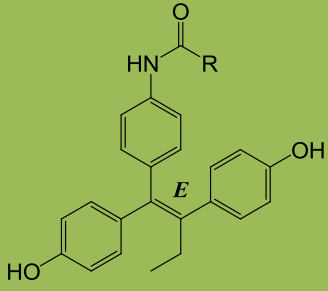
#### 6.1 STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA

I nuovi derivati del tamoxifene sono stati studiati mediante saggi *in vitro* allo scopo di evidenziare la capacità di inibire la proliferazione cellulare.

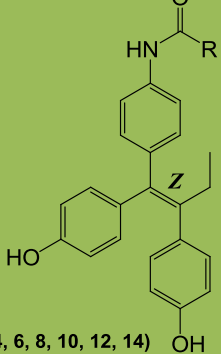
A tale scopo sono state utilizzate tre linee cellulari tumorali umane: MCF-7, HeLa e MSTO-211H.

Nei saggi di attività antiproliferativa le cellule sono state incubate per 72 ore con concentrazioni crescenti di ogni composto. Nella Tabella 6.1 e nella Fig. 6.1 sono riportati i risultati ottenuti, espressi come  $GI_{50}$ , cioè come concentrazione ( $\mu\text{M}$ ) di composto in grado di provocare la morte del 50% delle cellule trattate rispetto ad un campione non trattato.

**COMPOSTI GRUPPO C**



(1, 3, 5, 7, 9, 11, 13)

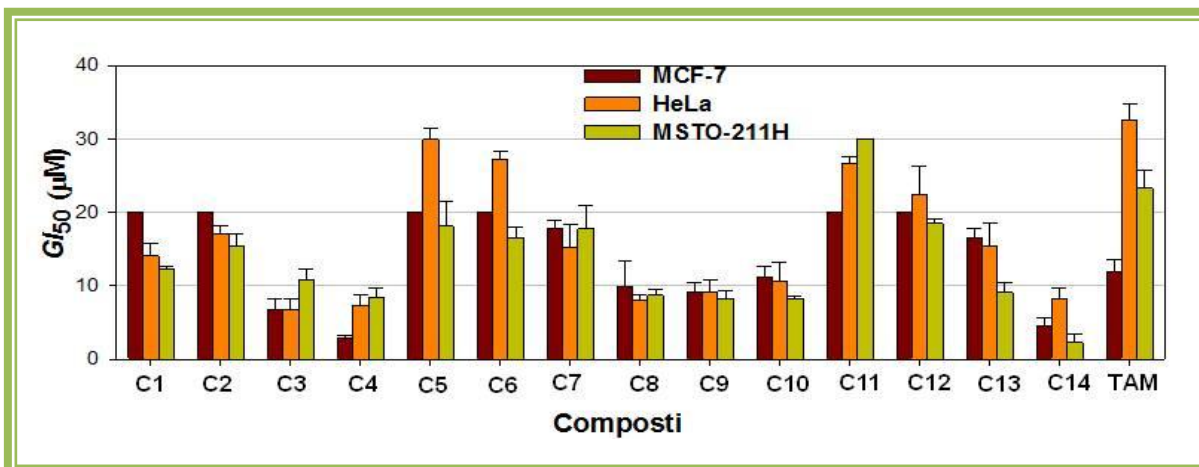


(2, 4, 6, 8, 10, 12, 14)

(1, 2) R = CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	(7, 8) R = N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	(11, 12) R = N
(3, 4) R = CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	(9, 10) R = N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	(13, 14) R = N
(5, 6) R = (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>		

Composto	GI <sub>50</sub> (μM)		
	MCF-7	HeLa	MSTO-211H
<b>C1</b>	>20	14.1±1.6	12.3±0.3
<b>C2</b>	>20	17.1±1.1	15.5±1.5
<b>C3</b>	6.7±1.5	6.7±1.6	10.9±1.3
<b>C4</b>	2.9±0.4	7.4±1.4	8.4±1.3
<b>C5</b>	>20	29.9±1.6	18.1±3.4
<b>C6</b>	>20	27.2±1.2	16.6±1.4
<b>C7</b>	17.9±1.1	15.2±3.2	17.8±3.2
<b>C8</b>	9.9±3.4	8.0±0.8	8.7±0.8
<b>C9</b>	9.1±1.3	9.1±1.8	8.3±1.1
<b>C10</b>	11.2±1.4	10.7±2.5	8.3±0.3
<b>C11</b>	>20	26.7±0.9	>30
<b>C12</b>	≥20	22.4±3.9	18.5±0.7
<b>C13</b>	16.5±2.4	15.4±3.1	9.1±1.3
<b>C14</b>	4.5±1.1	8.2±1.5	2.3±1.2
<b>Tamoxifene</b>	12.0±1.6	32.6±2.1	23.3±2.5

**Tabella 6.1:** Attività antiproliferativa dei composti studiati e del composto di riferimento tamoxifene, su cellule **MCF-7**, **HeLa** e **MSTO-211H**. I valori di GI<sub>50</sub> sono stati calcolati come media di almeno tre esperimenti ± deviazione standard.



**Figura 6.1:** Grafico comparativo dell'attività antiproliferativa dei composti studiati e del composto di riferimento tamoxifene (TAM) su cellule MCF-7, HeLa e MSTO-211H. I valori di  $GI_{50}$  sono stati calcolati come media di almeno tre esperimenti  $\pm$  deviazione standard.

Osservando i valori ottenuti (Tabella 6.1 e Figura 6.1) si può notare come i composti che presentano un etile legato al gruppo ammidico (**C1**, **C2**) risultano avere maggiore attività citotossica nei confronti delle linee cellulari prive del recettore estrogenico, rispetto alla linea cellulare estrogeno sensibile MCF-7. Il composto **C3**, avente l'isopropile, ha dimostrato un'attività discreta e paragonabile su tutte e tre le linee cellulari; il composto **C4**, suo stereoisomero, pur dimostrando un'attività antiproliferativa comparabile sulle linee cellulari estrogeno-negative, si è rivelato da due a tre volte più attivo nei confronti delle cellule MCF-7. Inoltre i composti **C5** e **C6** caratterizzati dalla presenza di un pentile sul gruppo ammidico, si sono rivelati altrettanto inattivi sulle linee HeLa e MSTO211-H dimostrando l'inadeguatezza di una catena laterale sviluppata in lunghezza.

I composti con un gruppo dimetilamminico (**C7**, **C8**) hanno mostrato attività differente a seconda della loro isomeria. L'isomero *Z* (composto **C8**) è significativamente più attivo sulle tre linee tumorali rispetto all'isomero *E* (composto **C7**) che possiede attività circa due volte minore. La presenza di un gruppo dietilamminico nei composti **C9** e **C10** fa sì che entrambi i derivati possiedano una simile e discreta attività antiproliferativa con risultati comparabili su tutte le tre linee cellulari. I derivati che presentano come sostituito un pirrolo (**C11**, **C12**) sono privi di attività citotossica. Infine, la presenza di una piperidina ha portato a due isomeri che si differenziano significativamente per attività: il composto **C14**

(isomero *Z*) si è dimostrato da 1.87 a 3.95 volte più attivo dell'analogo *E* (composto **C13**) in modo particolare sulla linea del mesotelioma bifasico verso la quale esercita la maggiore citotossicità.

## 6.2 DETERMINAZIONI CITOFLUORIMETRICHE

Numerosi studi hanno dimostrato la capacità del tamoxifene di indurre apoptosi sia nelle linee cellulari dotate del recettore per gli estrogeni, sia in linee prive di questo recettore<sup>[60]</sup>. Ciò ha portato a concludere che la molecola induce la morte apoptotica attraverso due vie: la via genomica, interagendo con il recettore degli estrogeni e impedendo la trascrizione di proteine attraverso la soppressione genica, e la via non genomica interagendo con bersagli non nucleari<sup>[60]</sup>.

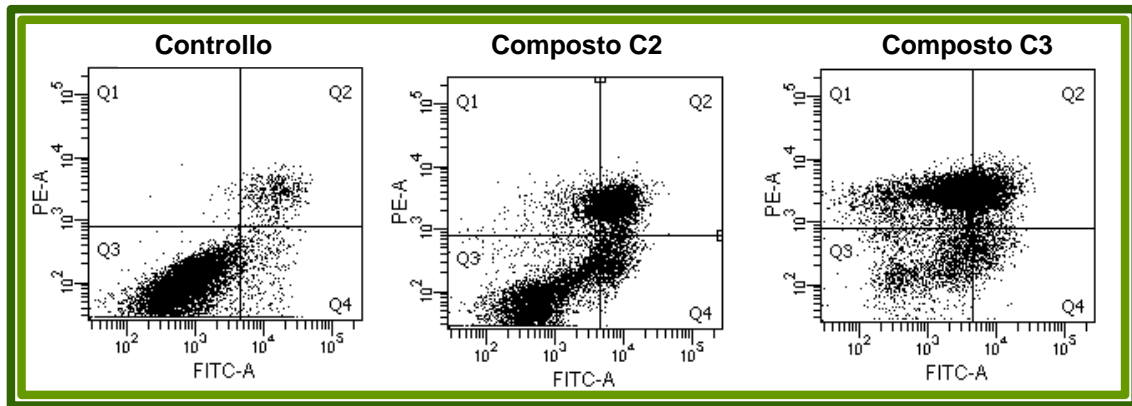
Sulla base di queste considerazioni, è stato approfondito il meccanismo di morte cellulare indotto da questa classe di derivati del tamoxifene, attraverso esperimenti di citofluorimetria a flusso su cellule HeLa verificando inoltre, se l'apoptosi fosse conseguente a depolarizzazione mitocondriale se inducesse attivazione delle caspasi.

In particolare sono stati testati i composti **C2** e **C3** data la loro stretta analogia strutturale ma diversa citotossicità.

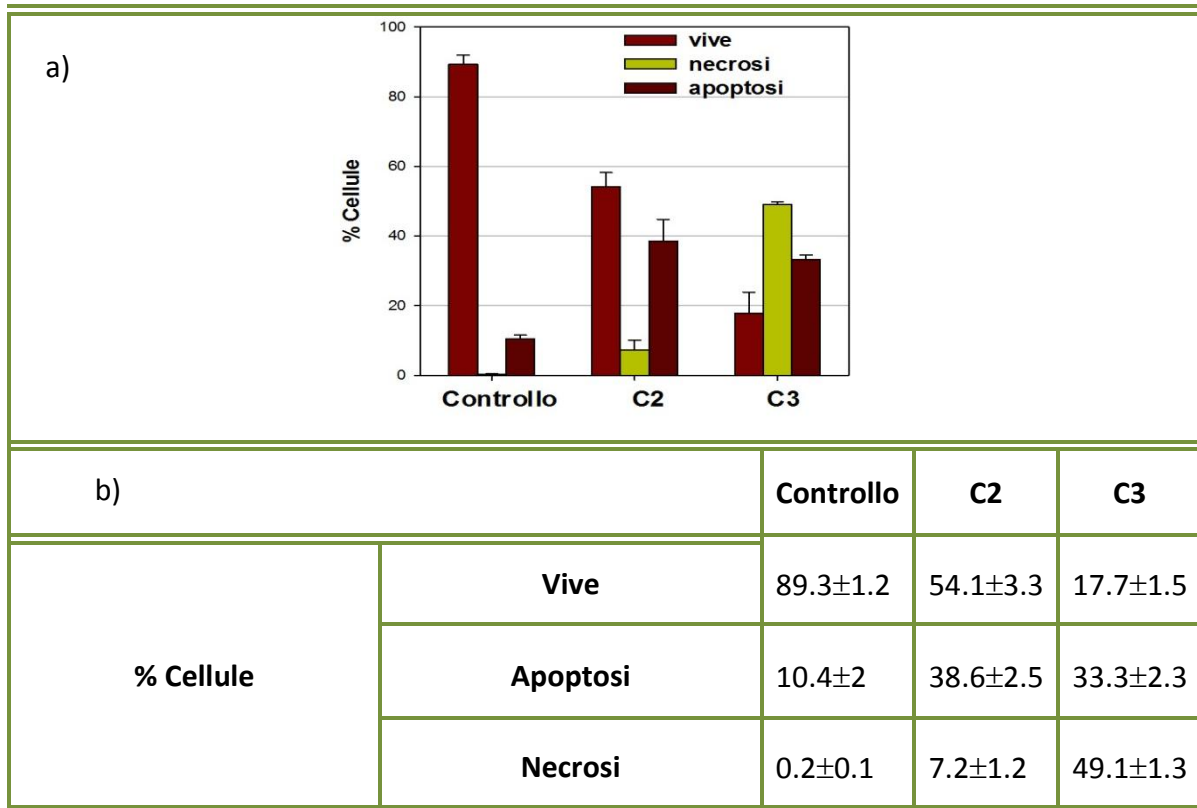
### 6.2.1 Determinazione dell'apoptosi

Per gli esperimenti di citofluorimetria sono state utilizzate cellule HeLa, trattate per 18 ore con i composti **C2** e **C3** alla concentrazione 100  $\mu$ M e incubate in presenza di annessina V-FITC e propidio ioduro (PI). Le rappresentazioni in dot-plot dei risultati ottenuti (Fig. 6.2) permettono di distinguere quattro quadranti in ognuno dei quali si possono individuare le cellule in un preciso momento della progressione apoptotica. Q1: cellule in necrosi, positive per PI; Q2: cellule in tarda apoptosi, positive per entrambi i fluorofori, Q3: cellule vive, negative sia ad annessina V sia a PI; Q4: cellule in apoptosi precoce, positive solo ad annessina V-FITC.





**Figura 6.2:** Rappresentazione mediante dot-plot dei risultati ottenuti dopo trattamento, delle cellule HeLa, con i composti **C2** e **C3** alla concentrazione di 100  $\mu$ M. E' stato riportato il grafico in dot-plot del saggio più significativo.



**Figura 6.3:** Istogramma raffigurante i risultati ottenuti dal saggio di citofluorimetria a flusso su cellule HeLa trattate con i composti **C2** e **C3** a 100  $\mu$ M (a). Le percentuali corrispondenti sono state calcolate come media di almeno tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard (b).

In Figura 6.3 sono raffigurati i dati della Figura 6.2 espressi come percentuale, calcolati come media di almeno tre esperimenti e la relativa deviazione standard. Le percentuali di

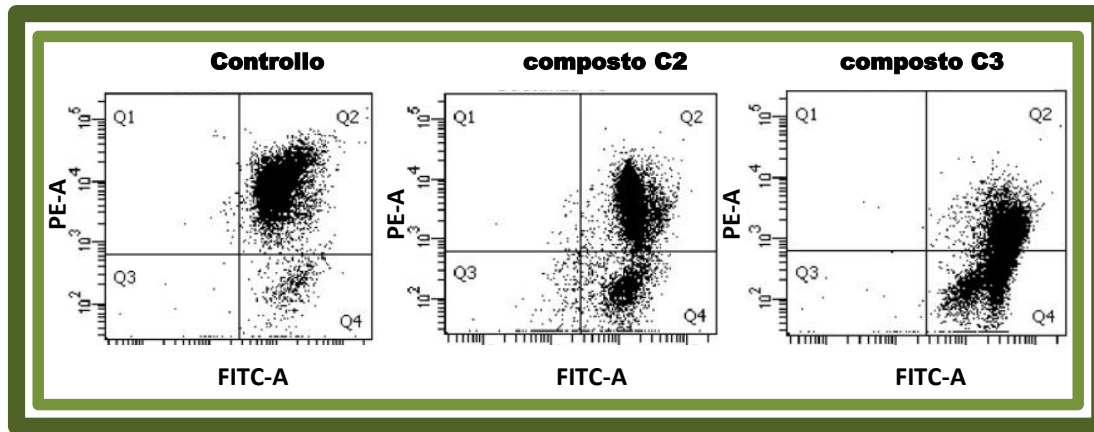
cellule in apoptosi precoce e tardiva sono state riunite in un'unica colonna per una migliore comprensione.

Dagli istogrammi e dai dati percentuale, riportati in Figura 6.3, si può osservare come i risultati ottenuti siano in accordo con i dati di citotossicità dei due composti: il composto **C3**, più citotossico, mostra una percentuale di cellule vive minore di quella del composto **C2**, meno citotossico del primo. Inoltre, si può notare come le cellule in necrosi, in seguito a trattamento con il composto **C3**, siano in percentuale maggiore rispetto a quelle in apoptosi, segno che la progressione della morte cellulare è molto avanzata. Al contrario, la popolazione trattata con il composto **C2**, a parità di condizioni sperimentali, presenta un numero maggiore di cellule in apoptosi rispetto a quelle in necrosi.

### **6.2.2 Determinazione della modificazione del potenziale mitocondriale in cellule integre**

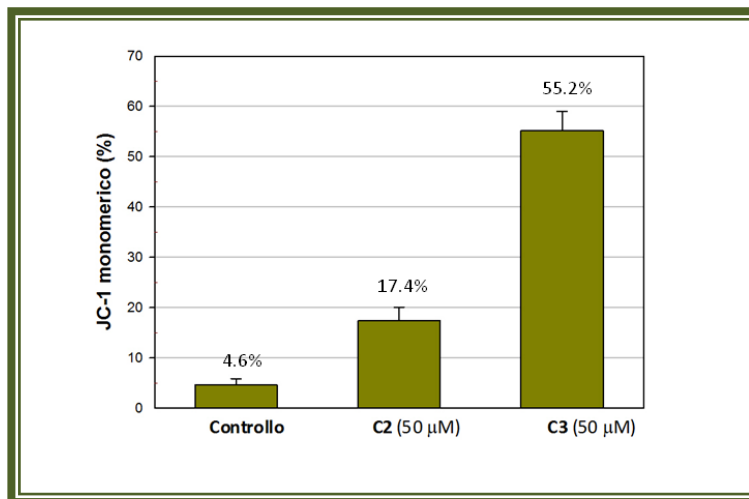
Per valutare il potenziale transmembrana mitocondriale di cellule integre trattate con i composti **C2** e **C3**, e quindi il grado di coinvolgimento di tali organelli nello stimolo apoptotico, le cellule sono state incubate in presenza del fluoroforo lipofilo cationico JC-1. Questo fluoroforo, nelle cellule vitali caratterizzate da un elevato potenziale di membrana mitocondriale (circa -170 mV), si accumula nei mitocondri dando luogo ad aggregati che emettono una fluorescenza rossa. Al contrario, nelle cellule in cui è avvenuta una depolarizzazione mitocondriale come accade ad esempio in seguito ad uno stimolo pro-apoptotico, il colorante rimane nel citosol in forma monomericamente emettendo una fluorescenza verde.

Le cellule HeLa sono state trattate con i composti **C2** e **C3** dopo 24 ore dalla semina alla concentrazione di 50  $\mu$ M e sono state analizzate dopo 18 ore dal trattamento (Fig. 6.4).



**Figura 6.4:** Rappresentazione mediante dot-plot della variazione del potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\psi$ ) in cellule HeLa dopo trattamento con i composti **C2** e **C3** alla concentrazione di 50  $\mu\text{M}$ . E' stato riportato il grafico in dot-plot del saggio piú significativo.

Dai dot-plot riportati nelle Figura 6.4 e dagli istogrammi riportati in Figura 6.5, risulta evidente che l'apoptosi indotta dalle due sostanze coinvolge un collasso del potenziale mitocondriale. Si può notare inoltre come nel campione trattato con la sostanza **C3**, la percentuale delle cellule con caduta di potenziale sia piú elevata rispetto al campione trattato con la sostanza **C2** alla stessa concentrazione (55.2% rispetto a 17.4%). Si può concludere quindi che il composto **C3** è piú efficace del composto **C2** nell'indurre apoptosi. È interessante a questo proposito sottolineare che da un punto di vista strutturale tali composti si differenziano per un metile in catena terminale e per l'isomeria.



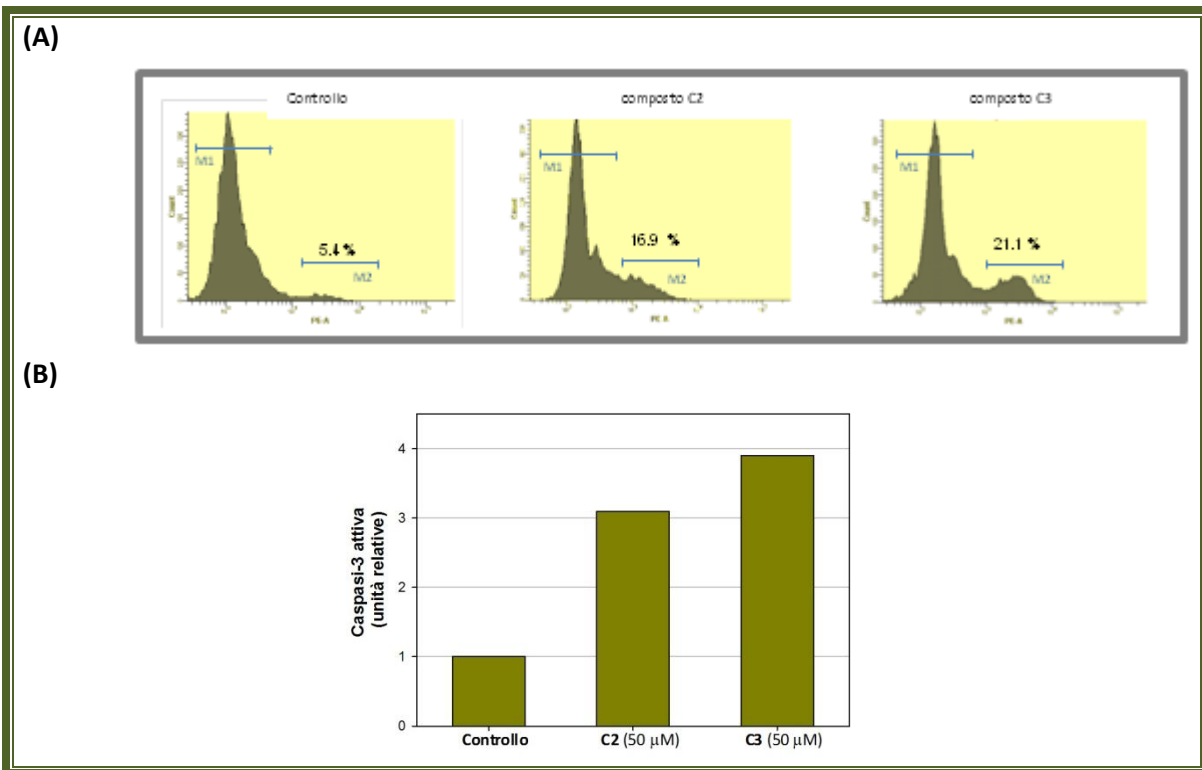
**Figura 6.5:** Istogramma raffigurante i risultati relativi alla determinazione del  $\Delta\psi$  mitocondriale in cellule HeLa trattate con i composti **C2** e **C3** a 50  $\mu\text{M}$ . Le percentuali sono state calcolate come media di almeno tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

### 6.2.3 Determinazione della caspasi-3 attiva

Dimostrato il coinvolgimento della depolarizzazione mitocondriale nel processo apoptotico indotto da **C2** e **C3** in esame è stata valutata anche la presenza di caspasi-3 attivata nelle cellule trattate con i medesimi composti. Infatti, i cambiamenti del potenziale di membrana interna mitocondriale, possono indurre il rilascio di fattori pro-apoptotici quali il citocromo *c*, il quale nel citosol lega APAF-1 (Apoptose Protease Activating Factor-1). La procaspasi-9 si lega a sua volta a questo complesso formando il cosiddetto apoptosoma, il quale catalizza l'attivazione della procaspasi-9 a caspasi-9 attiva la quale attiva una cascata di eventi caspasi-dipendenti, tipici della cellula in apoptosi.

Permeabilizzando le cellule sottoposte ad uno stimolo apoptotico, è possibile raggiungere le caspasi citoplasmatiche e, mediante opportuni anticorpi, valutare la presenza di forme tagliate attive. In questo saggio è stata valutata l'attivazione della caspasi-3, cioè è stata determinata la forma tagliata della proteina. Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule HeLa trattate con i composti **C2** e **C3** alla concentrazione di 50  $\mu$ M. Le cellule sono state incubate con la sostanza in esame dopo 24 ore dalla semina, ed esaminate dopo 18 ore dal trattamento.

Negli istogrammi della Figura 6.6 A si può osservare la quantificazione della caspasi-3 attiva determinata come unità relativa di fluorescenza. In particolare si osserva che le cellule non trattate (controllo) hanno una bassa presenza della caspasi-3 attiva (5.4 % rapportato a una unità relativa di fluorescenza), mentre nelle cellule trattate con i composti **C2** e **C3**, alla stessa concentrazione, la fluorescenza aumenta a 16.9 e 21.1 % quindi di circa 3 e 4 volte in termini di unità relativa di fluorescenza, rispettivamente (Figura 6. B). I risultati ottenuti indicano che l'apoptosi indotta è caspasi-dipendente.



**Figura 6.6: (A).** Determinazione della caspasi-3 attiva mediante citofluorimetria a flusso. Le cellule HeLa sono state trattate con i composti **C2** e **C3** a concentrazione 50  $\mu$ M. È stato riportato il grafico più rappresentativo dei saggi effettuati. **(B).** Istogramma ottenuto dai risultati del saggio di citofluorimetria a flusso rappresentato in **(A)**.

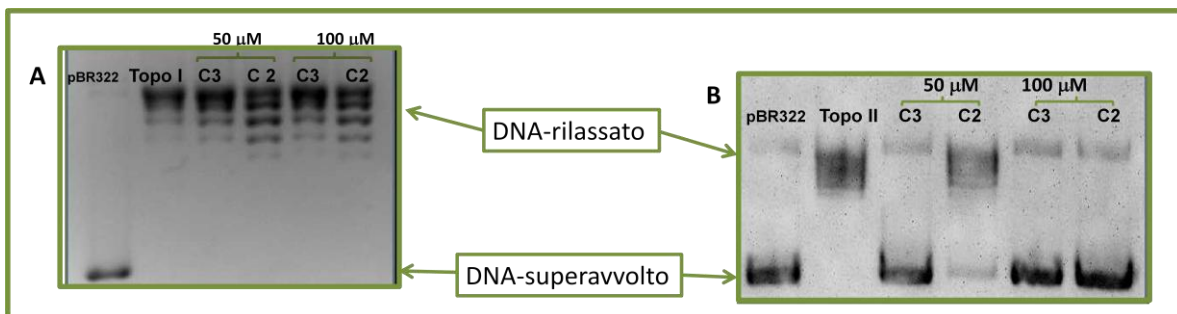
Dopo aver dimostrato che le cellule trattate con i composti **C2** e **C3** provocano la morte apoptotica delle cellule trattate, depolarizzando i mitocondri e attivando le caspasi si è rivolta l'attenzione sui possibili bersagli molecolari coinvolti nel processo di morte mediato dai composti.

### 6.3 INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLE DNA TOPOISOMERASI

In letteratura è stato riportato come il tamoxifene sia in grado di inibire il rilassamento della topoisomerasi I e della topoisomerasi II, a concentrazione 100  $\mu$ M<sup>[32]</sup>. Pertanto, si è voluto indagare se anche i suoi analoghi conservino questa attività, e per farlo si è utilizzata la tecnica dell'elettroforesi su gel di agarosio.

### 6.3.1 Saggio di inibizione dell'attività di rilassamento delle Topoisomerasi I e II

Nella Figura 6.7 A sono riportati i risultati della corsa elettroforetica relativi al saggio d'inibizione dell'attività di rilassamento della topoisomerasi I (Topo I) in presenza di due concentrazioni (50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) dei composti **C2** e **C3**. I risultati ottenuti mostrano che il DNA superavvolto migra velocemente nel gel, mentre in presenza dell'enzima, ha luogo la formazione di una serie di topoisomeri che corrono più o meno lentamente a seconda dei diversi numeri di legame. Sia alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$  che 100  $\mu\text{M}$  non si osserva inibizione dell'enzima da parte dei composti: infatti le popolazioni di topoisomeri dei campioni trattati sono del tutto analoghe alla popolazione che si osserva nel campione trattato solo con l'enzima (**TOPO I**). Per ampliare lo studio si è anche valutato l'effetto nelle medesime condizioni sperimentali di altri composti, che presentano diversi sostituenti (**C3**, **C4**, **C8**, **C9** e **C14**) e si è visto che nessuno di essi è in grado di inibire in maniera significativa l'attività di rilassamento dell'enzima (risultati non mostrati).

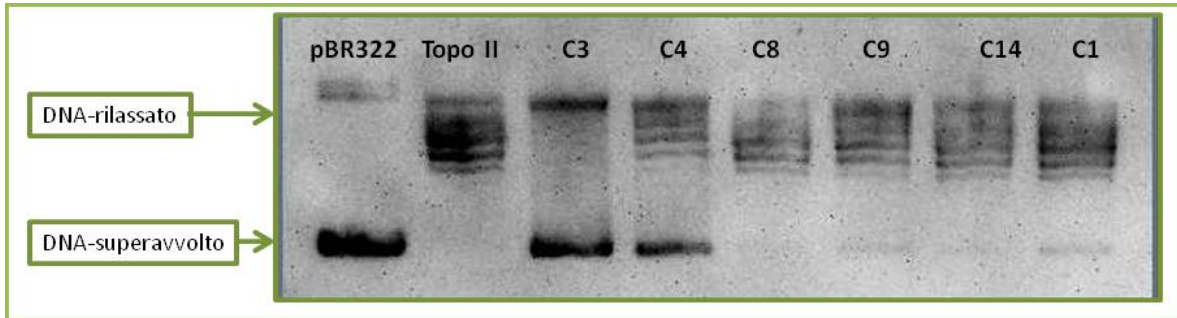


**Figura 6.7:** Elettroforesi su gel d'agarosio del saggio di inibizione dell'attività di rilassamento della Topoisomerasi I (A) e II (B) in presenza dei composti **C2** e **C3** alle concentrazioni 50 e 100  $\mu\text{M}$ .

Esperimenti analoghi sono stati svolti per determinare l'attività dei composti **C2** e **C3** sull'attività catalitica della topoisomerasi II.

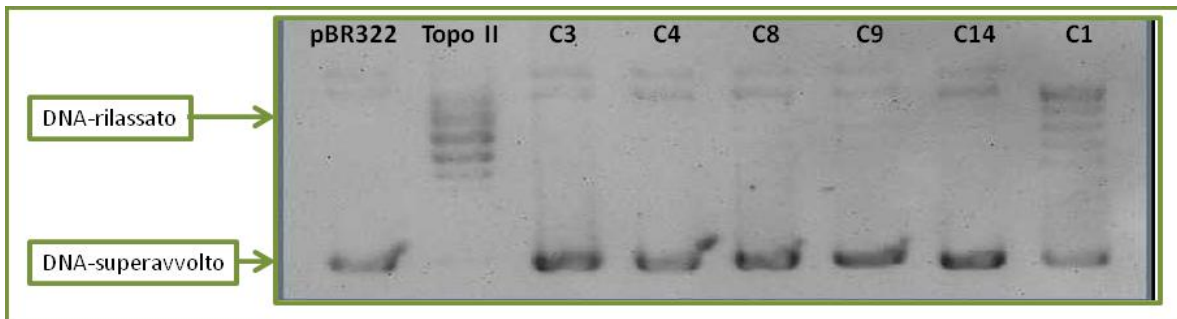
La Figura 6.7 B mostra come in questo caso ci sia un'effettiva inibizione dell'enzima nucleare da parte della sostanza **C3** già a partire dalla concentrazione più bassa esaminata, diversamente dalla sostanza **C2** che mostra avere sulla topoisomerasi un effetto inibitorio parziale a 50  $\mu\text{M}$  e completo solo a 100  $\mu\text{M}$ .

Sulla base di questi risultati, si è esteso lo studio anche alle rimanenti sostanze (**C1**, **C3**, **C4**, **C8**, **C9** e **C14**) incubandole con l'enzima sia a 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 6.8) che a 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 6.9).



**Figura 6.8:** Elettroforesi su gel d'agarosio del saggio di inibizione dell'attività di rilassamento della Topoisomerasi II in presenza dei composti **C3**, **C4**, **C8**, **C9**, **C14** e **C1** alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$ .

Come si può notare, dalla Figura 6.8, alla concentrazione 50  $\mu\text{M}$  solo i composti **C3** e **C4** sono in grado di provocare un'inibizione dell'attività di rilassamento, mentre gli altri composti non provocano alcuna inibizione.



**Figura 6.9:** Elettroforesi su gel d'agarosio del saggio di inibizione dell'attività di rilassamento della Topoisomerasi II in presenza dei composti **C3**, **C4**, **C8**, **C9**, **C14** e **C1** alla concentrazione 100  $\mu\text{M}$ .

Diversamente, a 100  $\mu\text{M}$  tutti i composti presi in considerazione inibiscono l'attività di rilassamento, analogamente a quanto riportato in letteratura per il tamoxifene<sup>[26]</sup>, Figura 6.9. Unica eccezione è il composto **C1**, dotato peraltro di minore citotossicità (Tabella 6.1), che non induce un'inibizione completa nemmeno a 100  $\mu\text{M}$ . Può essere interessante

sottolineare che, strutturalmente, tale composto presenta un etile legato al gruppo ammidico e isomeria *E*.

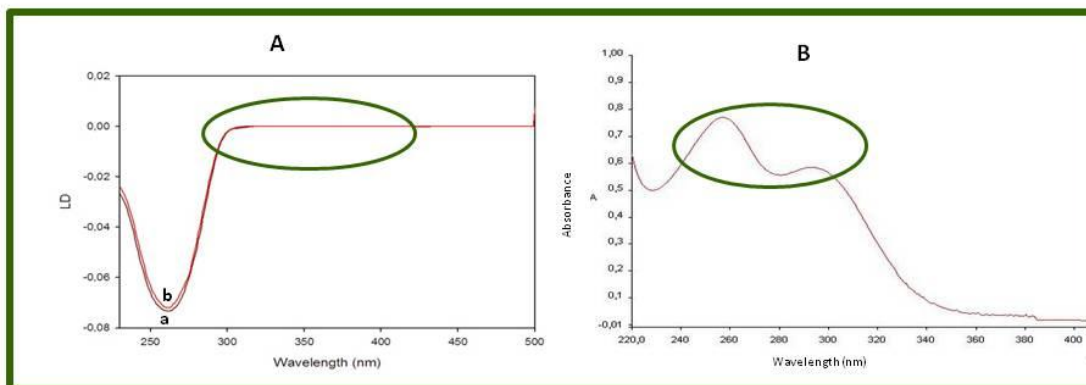
## 6.4 INTERAZIONE COMPOSTO-DNA

### 6.4.1 Dicroismo lineare

Vista la capacità dei composti di inibire la topoisomerasi II, si è ritenuto interessante valutare se essi fossero in grado di interagire con il DNA, come peraltro riportato in letteratura per il farmaco di riferimento<sup>[48]</sup>.

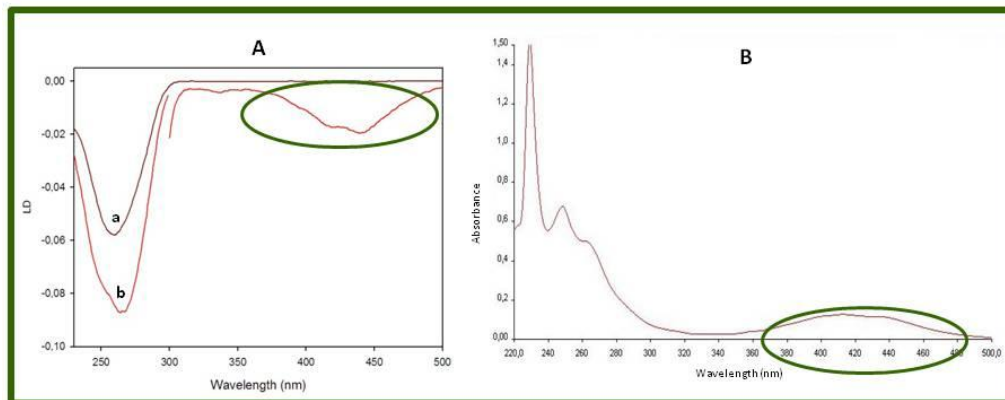
Nella Figura 6.10 si mostrano, a titolo rappresentativo, gli spettri di dicroismo lineare relativi all'esperimento eseguito con una soluzione di DNA cui è stata aggiunta un'aliquota della sostanza **C1** in modo da ottenere rapporti DNA/ligando pari a 12.5.

Come controllo positivo è stata utilizzata la *m*-amsacrina, noto intercalante del DNA; nel suo spettro infatti si riconosce la comparsa di un segnale dicroico negativo nella zona di assorbimento del cromoforo, tipica degli agenti complessanti intercalanti (Fig. 6.11).



**Figura 6.10:** (A) Spettro di dicroismo lineare (LD) di una soluzione di DNA (linea **a**) e di DNA-compound **C1** (linea **b**), con rapporto molare  $[DNA]/[composto] = 12.5$  in ETN 0.01 M, pH=7. (B) Spettro di assorbimento UV-vis di una soluzione etanolica  $2.9 \times 10^{-5} M$  del composto **C1**.





**Figura 6.11: (A)** Spettro di dicroismo lineare (LD) di una soluzione di DNA (linea **a**) e del complesso DNA-*m*-amsacrina (linea **b**), con rapporto molare [DNA/[composto]] = 12.5 in ETN 0.01 M, pH=7. **(B)** Spettro UV-vis della soluzione etanolica  $7.5 \times 10^{-6}$  M di *m*-amsacrina.

Dagli andamenti ottenuti si può concludere che la presenza del derivato trifeniletilenico non provoca alcuna variazione nell'andamento dello spettro dicroico rispetto su quello ottenuto con il solo DNA e tale osservazione consente di concludere che esso non è in grado di complessarsi efficacemente con la macromolecola.

Tale considerazione viene estesa anche a tutti gli altri composti (**C1-C14**) perché anch'essi non sono in grado di modificare in maniera apprezzabile lo spettro dicroico del DNA nè a 260 nm, nè a lunghezze d'onda d'assorbimento del cromoforo trifeniletilenico.

Pertanto, tali risultati permettono di concludere che tutti i derivati appartenenti a questo gruppo non sono in grado di complessarsi con il DNA.

## CONCLUSIONI

Sono stati studiati quattordici nuovi composti caratterizzati dal mantenimento dello scheletro trifeniletilenico del tamoxifene, e da diversi sostituenti amidici come catene laterali e funzionalizzati con gruppi OH nella posizione 4 dei fenili. In particolare, per ogni derivato sono stati presi in considerazione sia l'isomero *E* che *Z*.

Tutti i composti hanno presentato attività antiproliferativa sulle tre linee cellulari tumorali umane prese in esame: MCF-7, HeLa e MSTO-211H.

Un confronto tra i diversi valori di citotossicità ottenuti ha consentito di tracciare alcune relazioni struttura-attività riportate di seguito:

- i composti con un sostituente ramificato o un sostituente piperidinico, presentano la migliore attività antiproliferativa
- gli isomeri Z tendono ad essere più attivi nelle cellule MCF-7.

Un'analisi citofluorimetrica ha permesso di concludere che:

- composti selezionati, in base alla maggiore attività antiproliferativa, inducono l'apoptosi in accordo con i dati di citotossicità;
- l'apoptosi coinvolge un collasso dose-dipendente del potenziale elettrico transmembrana mitocondriale e l'attivazione della caspasi-3.

I derivati in esame non danno luogo ad un'apprezzabile complessazione con il DNA, tuttavia mostrano la capacità di inibire in maniera dose-dipendente l'attività di rilassamento della DNA topoisomerasi II, mentre nessuno di essi è in grado di interferire con il ciclo catalitico della topoisomerasi I.

## 7. CONCLUSIONI GENERALI

Ad oggi, uno degli obiettivi importanti nella lotta contro il cancro è lo sviluppo di nuovi farmaci caratterizzati da una promettente attività antiproliferativa e dalla comparsa di minimi effetti collaterali rispetto ai farmaci convenzionali.

In questo lavoro di tesi, sono stati presi in considerazione tre gruppi strutturalmente distinti di nuove molecole allo scopo di individuare composti *lead* che possano essere utili per lo sviluppo di nuovi farmaci ad attività antitumorale. Di tutti i nuovi composti è stata valutata l'attività antiproliferativa nei confronti di linee cellulari tumorali umane ed è stato indagato il meccanismo d'azione.

In particolare nell'ambito del primo gruppo questo studio ha permesso d'individuare derivati benzo- e pirido-tiopiranoindolici, caratterizzati di una significativa attività antiproliferativa, capaci di complessare il DNA secondo una geometria di tipo intercalativo, di inibire l'attività di rilassamento delle DNA topoisomerasi I e II, e d'indurre la morte cellulare attraverso un processo di tipo apoptotico.

Al secondo gruppo di composti studiati, appartengono derivati benzotiopiranopirimidinici. Nell'ambito di questi composti sono stati individuati alcuni anilino-derivati che non solo presentano un'interessante attività antiproliferativa su cellule tumorali e su cellule HUVEC, ma presentano anche la capacità di inibire l'attività tirosinchinasica misurata *in vitro* dell'enzima recettoriale KDR.

Al terzo gruppo appartengono derivati trifenil-etilenici, analoghi del farmaco tamoxifene ma recanti gruppi amidici come catena laterale e idrossili in posizione 4 dei fenili. I composti considerati hanno dimostrato la capacità di inibire la crescita cellulare di linee tumorali umane, inducendo un processo apoptotico che coinvolge il collasso del potenziale elettrico transmembrana mitocondriale e la concomitante attivazione della

caspasi-3. Inoltre, è stata messa in evidenza anche una inibizione dell'attività di rilassamento della topoisomerasi II.

Pertanto, all'interno di ciascuno dei tre gruppi è stato possibile individuare strutture molecolari dotate di un'interessante attività antiproliferativa e di differenti meccanismi d'azione. Tali strutture potranno costituire la base di partenza per l'ottenimento di nuovi farmacofori e contribuire quindi alla progettazione di nuovi farmaci a possibile attività antitumorale.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Gibbs J. B. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*. (2000) **287**, 1969-1973.
2. AIRTUM. I Numeri del Cancro in Italia 2013. [http://www.registri-tumori.it/PDF/AIOM2013/I\\_numeri\\_del\\_cancro\\_2013.pdf](http://www.registri-tumori.it/PDF/AIOM2013/I_numeri_del_cancro_2013.pdf)
3. Katzung B. G. (1999). Farmacología básica y clínica. Ed. Manual Moderno, México. Séptima Edición, pp 1011-1013.
4. Klug S. W., Cummings R. M. (1999). Conceptos de Genética. Ed. Iberia, Pretince Hall Madrid. 1a. Edición, pp 625-626.
5. Dalla Via L., Gia O., Marciani Magno S., Da Settimo A., Marini A. M., Primofiore G., Da Settimo F., Salerno S. Synthesis, in vitro antiproliferative activity and DNA interaction of benzimidazoquinazoline derivates as potential anti-tumor agents. // *farmaco*. (2001) **56**, 159-167.
6. Foye W. O., Lemke T.L., Williams D.A. (2005) Principi di chimica farmaceutica, Ed. Piccin, Padova, IV Edizione.
7. Pindur U., Lemster T. Antitumor drug design: DNA-binding ligands, which inhibit the topoisomerase I. *Pharmazie*. (1998) **53** (2) 79-86.
8. Nelson D. L., Cox M. M. (2002). I principi di biochimica di Lehninger. Ed. Zanichelli, III Edizione.
9. Capranico G., Zunino F. Antitumor inhibitors of DNA topoisomerase. *Curr. Pharm. Des.* (1995) **1**, 1-14.
10. Champoux J. J. DNA topoisomerases: Structure, function and mechanism. *Ann. Rev. Biochem.* (2001) **70**, 369-413.

11. Pommier Y., Pourquier P., Fan Y., Strumberg D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* (1998) **1400**, 83-106.
12. Insaf S. S., Danks M. K., Witiak D. T. A structure-function analysis of DNA topoisomerase II inhibitors. *Curr. Med. Chem.* (1996) **3** (6) 437-466.
13. Nitiss J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* (2009) **9** (5) 338-350.
14. Josko J., Gwozdz B., Jedrzejowska-Szypulka H., Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med. Sci. Monit.* (2000) **6** (5) 1047-1052.
15. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Phys. Cell. Phys.* (2001) **280** (6) C1358-C1366.
16. Folkman J., Haudenschild C. Angiogenesis *in vitro*. *Nature.* (1980) **288**, 551-556.
17. Gupta M. K., Qin R-Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* (2003) **9** (6) 1144-1155.
18. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature.* (1995) **1**, 27-31.
19. Papetti M., Herman I. M. Mechanism of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Phys.* (2002) **282** (5) 947-970.
20. Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* (1997) **18** (1) 4-25.
21. Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature.* (2003) **9** (6) 669-676.
22. Robinson C. J., Stringer S. E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell. Sci.* (2001) **114** (5) 853-865.

23. Dvorak H. F., Brown L. F., Detmar M., Dvorak A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* (1995) **146** (5) 1029-1039.
24. Kumar R., Yoneda J., Bucana C. D., Fidler, I. J. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int. J. Oncol.* (1998) **12** (4) 749-806.
25. Zachary I. VEGF signaling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem. Soc. Trans.* (2003) **31** (6) 1171-1177.
26. Kerbel R., Folkman J. Clinical translation of angiogenic inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* (2002) **2**, 727-739.
27. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncol.* (2004) **9** (1) 2-10.
28. Zhang J., Yang P. L., Gray N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature.* (2009) **9** (1) 28-39.
29. Gori, S. Neoplasie della Mammella. Linee Guida AIOM- *Associazione Italiana di Oncologia Medica*. Edizione **2013**.
30. Chlebowski R. T. Changing concepts of hormone receptor-positive advanced breast cancer therapy. *Clin. Breast Cancer.* (2012) **13** (3) 159-66.
31. Obrero M., Yu D. V., Shapiro D. V. Estrogen receptor-dependent and estrogen receptor-independent pathways for tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen-induced programmed cell death. *J. Biol. Chem.* (2002) **277**, 45695-45703.
32. Larosche I., Lett eron P., Fromenty B., Vadrot N., Abbey-Toby A., Feldmann G., Pessayre D., Mansouri A. Tamoxifen inhibits topoisomerases, depletes mitochondrial DNA and triggers steatosis in mouse liver. *J. Pharm. Exp. Ther.* (2007) **321** (2) 526-535.
33. Riggs B. L., Hartmann L. C. Selective estrogen-receptor modulators, mechanism on action to clinical practice. *N. Engl. J. Med.* (2003) **648**, 618-629.

34. Mandlekar S., Kong A. N. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis*. (2001) **6**, 469-477.
35. National Cancer Institute.  
[http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/targetedtherapies/breastcancer\\_htmlcourse/page2#a](http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/targetedtherapies/breastcancer_htmlcourse/page2#a)
36. Jordan V. C., Gapstur S., Morrow M. Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *J. Natl. Cancer Inst.* (2001) **93**, 1450-1457.
37. U. S. FDA- *Food and Drug Administration*.  
<http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm340704>.
38. Smith I. E., Dowset M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* (2003) **348**, 2431-2442.
39. Bulun S., Lin Z., Zhao H. Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2009) **1155**, 121–131.
40. Dalla Via L., Marciani Magno S., Gia O., Marini A. M., Da Settimo F., Salerno S., La Motta C., Simorini F., Taliani S., Lavecchia A., Di Giovanni C., Brancato G., Barone V., Novellino E. Benzothioapyranoindole-based antiproliferative agents: synthesis, cytotoxicity, nucleic acid interaction, and topoisomerase inhibition properties. *J. Med. Chem.* (2009) **52**, 5429-5441.
41. Da Settimo A., Marini A. M., Primofiore G., Da Settimo F., Salerno S., Viola G., Dalla Via L., Marciani Magno S. Synthesis, DNA binding and *in vitro* antiproliferative activity of purinoquinazoline, pyridopyrimidopurine and pyridopyrimido benzimidazole derivatives as potential antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* (1998) **33** (9) 685-696.
42. Dalla Via L., Gia O., Marciani Magno S., Da Settimo A., Primofiore G., Da Settimo F., Simorini F., Marini A. M. Dialkylaminoalkylindolonaphthyridines as potential



- antitumor agents: synthesis, cytotoxicity and DNA binding properties. *Eur. J. Med. Chem.* (2002) **37** (6) 475-486.
43. Dalla Via L., Marini A. M., Salerno S., Toninello A. Mitochondrial permeability transition induced by novel pyridothiopyranopyrimidine derivatives: Potential new antimitochondrial antitumour agents. *Biochem. Pharmacol.* (2006) **72**, 1657-1667.
44. Marini A. M., Da Settimo F., Salerno S., La Motta C., Simorini F., Taliani S., Bertini D., Gia O., Dalla Via L. Synthesis and *in vitro* antiproliferative activity of new substituted benzo[3',2':5,6]thiopyrano[4,3-d]pyrimidines. *J. Heterocycl. Chem.* (2008) **45** (3) 745-749.
45. Jimenez J. M., Green J., Gao H., Moon Y., Brenchley G., Knegtel R., Pierard F. Preparation of aminopyrimidine derivatives as inhibitors of protein kinases. U.S. Pat. Appl. Publ. **2005**, 196 pp.
46. Schenone S., Bondavalli F., Botta M. Antiangiogenic agents: an update on small molecule VEGFR inhibitors. *Curr. Med. Chem.* (2007) **14** (23) 2495-2516.
47. Musumeci F., Radi M., Brullo C., Schenone, S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors: drugs and new inhibitors. *J. Med. Chem.* (2012) **55**(24) 10797-10822.
48. Snyder R. D., Brown J. E. Evidence for and role of the dimethylamino group in tamoxifen DNA intercalation in intact Chinese hamster V79 cells. *Drug Chem. Toxicol.* (2002) **25** (4) 473-479.
49. Gey G., Coffman W., Kubicek M. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* (1952) **12**, 264-265.
50. Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Dosik H., Parks W. P. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* (1973) **51** (5) 1417-1423.

51. Haeder M., Rotsch M., Bepler G., Hennig C., Havemann K., Heimann B., Moelling K. Epidermal growth factor receptor expression in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* (1988) **48** (5) 1132-1136.
52. Soule H. D., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* (1973) **51** (5) 1409-1416.
53. Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G., Minick C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin Invest.* (1973) **52** (11) 2745-2756.
54. Norden B., Kurucsev T. Analysing DNA complexes by circular and linear dichroism. *J. Mol. Recogn.* (1994) **7** (2) 141-156.
55. Wada A., Kozawa S. Instrument for the studies of differential flow dichroism of polymer solutions. *J. Pol. Sci.* (1964) **2** (2) 853-864.
56. BD™ MitoScreen Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit Instruction Manual, BD Biosciences.
57. Bailly C. DNA relaxation and cleavage assay to study topoisomerase I inhibitors. *Methods Enzymol.* (2001) **340**, 610-623.
58. Staker B. L., Hjerrild K., Feese M. D., Behnke C. A., Burgin A. B. Jr., Stewart L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *PINAS USA.* (2002) **99**, 15387-15392.
59. Fong T. A., Shawver L. K., Sun L., Tang C., App H., Powell T. J., Kim Y. H., Schreck R., Wang X., Risau W., Ullrich A., Hirth P.K., McMahon G. SU5416 Is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Research.* (1999) **59**, 99-106.

60. Salami S.; Karami-Tehrani F. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clinical Biochemistry*. (2003) **36** (4) 247-253.