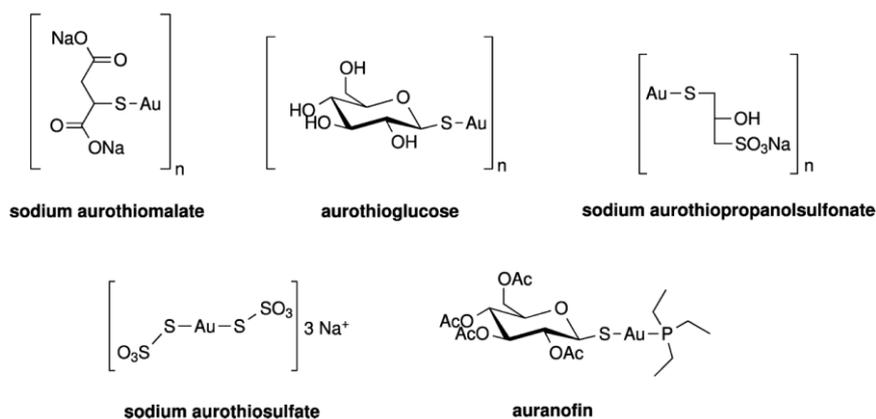


Composti antiartritici di oro

Circa il 2% della popolazione mondiale soffre di una infiammazione cronica e sistemica nota come **artrite reumatoide**. Sebbene la causa di questa malattia autoimmune non è ancora del tutto chiarita (sembra derivi da un complesso concorso di fattori ambientali e genetici), i suoi primi sintomi sono l'infiammazione delle giunture. Col tempo l'infiammazione causa la progressiva distruzione della cartilagine e rigonfiamento delle giunture, limitando i movimenti dei pazienti e causando forti dolori.

Negli anni 1925–1935 (la cosiddetta *gold decade*) molti composti a base di Au(I), soprattutto cianuri e tiosolfati, venivano usati per trattare la tubercolosi polmonare (una infezione batterica), con un approccio basato più sulla speranza che sull'evidenza sperimentale di una reale efficacia. In quegli anni si credeva che anche l'artrite fosse dovuta a un'infezione batterica. In base a questa assunzione errata, si scoprì che alcuni composti di Au(I) erano attivi contro l'artrite. Vennero così introdotti in uso clinico una serie di composti polimerici di Au(I), come l'aurotiomalato (*Miocrisina*), l'aurotioglucosio (*Solganol*), il sodio aurotiopropanolsulfonato (*Allocricina*) e il sodio aurotiosulfato (*Sanocrisina*) (figura). Essi sono tutti polimeri carichi, con unità lineari S–Au(I)–S, e vengono somministrati in soluzione acquosa per iniezione intramuscolo. Invece il complesso



monomero neutro tetraacetil- β -D-tioglucosio-oro(I)-trietilfosfina (*Auranofin*) è stato approvato dell'FDA più recentemente, nel 1985, ed essendo più lipofilo viene somministrato oralmente in capsule ed è molto ben tollerato. Questi farmaci antiartritici appartengono alla categoria dei *disease-*

modifying antirheumatic drugs (DMARD), e rallentano la progressione dell'artrite principalmente inibendo diverse catepsine, degli enzimi di degradazione che hanno una cisteina nel sito attivo. Infatti, Au(I) ($5d^{10}$), essendo uno ione grande e con piccola carica, e quindi facilmente polarizzabile, è un tipico acido di Lewis *soft* e quindi forma i complessi più stabili con leganti come CN^- , e leganti contenenti zolfo (RS^- , R_2S e $S_2O_3^{2-}$), fosforo (PR_3) e selenio. La coordinazione più comune per l'Au(I) è quella lineare, ma anche numeri di coordinazione più elevati (3 o 4) sono noti, in particolare in presenza di leganti chelanti (e.g. difosfine). In assenza di stabilizzazione da parte di leganti *soft*, in soluzione acquosa avviene rapidamente la disproportionazione di Au(I) in oro metallico e Au(III):



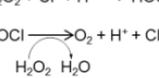
L'oro(I) ha una affinità molto maggiore per lo zolfo del tiolato (cisteina) rispetto allo zolfo del tioetere (metionina) e scarsa affinità per leganti N o O donatori. L'affinità per i tiolati aumenta al diminuire del loro pK_a . A causa di queste preferenze coordinative, i farmaci antiartritici di oro(I) contengono leganti tiolati e fosfinici, e la loro chimica in ambiente biologico è dominata da reazioni di scambio con siti di legame *soft* di proteine (cisteine e seleno-cisteine), mentre il DNA non è un target importante.

Nel sangue l'oro(I) viene trasportato dall'albumina legato alla Cys34 ($pK_a \sim 5$) mentre all'interno delle cellule si lega al tiolo del glutatione. Anche alcuni fattori di trascrizione (Jun, Fos, NF- κ B), che possiedono residui cisteinici adiacenti a residui basici di lisina e arginina, sono dei probabili bersagli. In seguito alla somministrazione, i composti polimerici di oro(I) subiscono rapidamente reazioni di scambio dei leganti e quindi è improbabile che i composti somministrati siano le specie

farmacologicamente attive. Nel caso dell'*auranofin* il legante fosfinico conferisce permeabilità alle membrane e influenza il suo profilo farmacologico, compreso l'*uptake* nelle cellule. La fosfina viene rilasciata più lentamente del legante tiolato. Una volta rilasciata la fosfina, i prodotti metabolici dell'*auranofin* potrebbero essere del tutto simili a quelli derivanti dai tiolati di Au(I). Il principale metabolita identificato nelle urine di pazienti trattati con farmaci di Au(I)-tiolati o con *auranofin* è $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$. Il fatto che questo metabolita viene trovato anche nelle urine di pazienti non fumatori (ca. 35 μg HCN/sigaretta) suggerisce che leganti piccoli ma forti come il cianuro possono giocare un ruolo importante nel metabolismo dei farmaci a base di metalli e non solo quelli di oro.

Vi sono comunque numerose evidenze sperimentali che suggeriscono che i farmaci a base di oro abbiano diversi modi di azione nei confronti di questa complessa patologia e che, in generale, la loro azione riguardi l'interazione con residui cisteinici o seleno-cisteinici di proteine. Oltre alle catepsine, un altro potenziale target dei composti di Au(I) è il sistema tioredossinico, che svolge un ruolo chiave nella regolazione del bilancio redox intracellulare. La **tioredossina riduttasi** (TrxR), catalizza la riduzione, dipendente da NADPH, della proteina redox tioredossina (Trx), così come di altri substrati endogeni ed esogeni, e sembra essere implicata in numerose patologie croniche, tra cui certi tipi di tumore e l'artrite reumatoide. I complessi di Au(I), e l'*auranofin* in particolare, sono gli inibitori più potenti e selettivi finora trovati (*in vitro*) per la TrxR purificata di mammifero e l'inibizione è stata attribuita al legame dell'Au(I) al centro redox-attivo -Cys-Sec- (Sec = seleno-cisteina). Inoltre è noto che i farmaci anti-infiammatori di Au(I) interagiscono con altri selenoenzimi, come la glutatione perossidasi: il selenio è più polarizzabile, e quindi più *soft*, dello zolfo e il pK_a della seleno-cisteina (~5.2) è molto più basso di quello della cisteina (8.5). Infine, a livello trascrizionale, i farmaci di Au(I) inibiscono una serie di geni pro-infiammatori tramite l'inibizione della attività dei fattori di trascrizione NF- κ B e AP-1 (Jun/Fos), che controllano l'espressione di geni per la collagenasi e numerose interleuchine.

Nonostante l'efficacia degli antiartritici a base di oro sia stata ampiamente verificata, in anni recenti ad essi sono quasi sempre preferiti nuovi farmaci DMARD, basati o su piccole molecole organiche oppure su anticorpi monoclonali o proteine. I farmaci a base di oro vengo prescritti solo quando gli altri non si sono dimostrati sufficientemente efficaci. In questi casi vengono di solito preferiti i composti iniettabili, che vengono assorbiti più rapidamente e si sono in genere dimostrati più efficaci dell'*auranofin* (che viene oggi usato molto raramente). Fra le cause principali del graduale abbandono degli antiartritici a base di oro ci sono soprattutto: la tossicità dell'Au(I), la *clearance* piuttosto lenta, la struttura non del tutto certa dei composti nelle soluzioni iniettabili e del meccanismo d'azione. Nelle condizioni ossidanti che si trovano nelle giunture infiammate può

Enzyme	Reaction catalyzed
NADPH oxidase	$\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$
Xanthine oxidase	$\text{Hypoxanthine} + 2\text{O}_2 + \text{NAD(P)H} \longrightarrow \text{Xanthine} + 2\text{O}_2^- + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}^+$ $\text{Xanthine} + 2\text{O}_2 + \text{NAD(P)H} \longrightarrow \text{Uric acid} + 2\text{O}_2^- + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}^+$
Myeloperoxidase	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$ 
Superoxide dismutase (Z = Cu ²⁺ /Cu ⁺ or Mn ³⁺ /Mn ²⁺)	$\text{EnZ}_{\text{ox}} + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{EnZ}_{\text{red}} + \text{O}_2$ $\text{EnZ}_{\text{red}} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{EnZ}_{\text{ox}} + \text{H}_2\text{O}_2$
Glutathione peroxidase Glutathione reductase	$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ or $2\text{GSH} + \text{ROOH} \longrightarrow \text{GSSH} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$
Catalase	$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

avvenire l'ossidazione di Au(I) a Au(III) e alcuni degli effetti collaterali immunologici che si osservano nella crisoterapia (e.g. dermatiti indotte dall'oro) sono attribuibili proprio alla produzione di metaboliti di oro(III) e alla loro successiva interazione con proteine. Si è visto che l'ipoclorito (prodotto dall'enzima mielo-perossidasi durante gli episodi cosiddetti di *oxidative burst* nei siti infiammati; in tabella le principali reazioni ossidative enzimatiche endogene) è in grado di ossidare l'Au(I) dell'aurotiomalo, dell'*auranofin* e anche $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ a Au(III). L'oro(III) è uno ione d⁸, isoelettronico al Pt(II), e i suoi complessi sono tipicamente

tetracoordinati e planari quadrati. Sebbene diversi tipi di leganti sono in grado di formare complessi stabili con Au(III), la sua chimica in ambiente biologico è dominata dalle sue forti proprietà

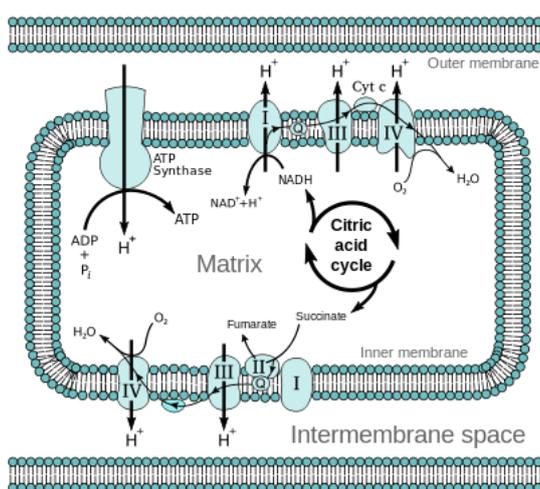
ossidanti. Quindi *in vivo* la maggior parte dei complessi di Au(III) verrà ridotta a Au(I) o Au(0) da parte dei riducenti naturali come tioli (cisteina), tioeteri (metionina) e proteine con disolfuri.

Composti antitumorali di oro

Il fatto che i farmaci di Au(I), e in particolare il meglio caratterizzato *auranofin*, inibiscano la tioredossina reduttasi (TrxR), un enzima che è sovra-espresso in molti tipi di tumori, ha spinto

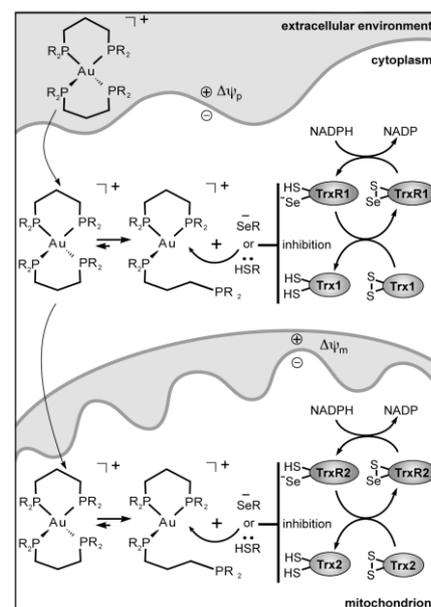
numerosi ricercatori a valutare le proprietà antitumorali dell'*auranofin*, che ha il vantaggio di essere già un farmaco e quindi potrebbe essere riposizionato senza troppe difficoltà. In effetti, dopo una serie di studi *in vitro*, che hanno dimostrato che il composto, inibendo TrxR

induce stress ossidativo e conseguente morte della cellula per apoptosi, *auranofin* – sebbene non fosse risultato particolarmente attivo su modelli di tumori nel topo – viene attualmente studiato in fase clinica.



La elevata reattività dei composti lineari di Au(I) verso i tioli delle proteine ne limita tuttavia l'attività antitumorale *in vivo* (reagiscono con troppe proteine). Allo scopo di ridurre questa reattività indiscriminata verso i tioli, sono stati studiati come antitumorali dei composti tetracoordinati di Au(I) con difosfine chelanti (sebbene con leganti monodentati Au(I) preferisca numero di coordinazione 2 con geometria lineare, con chelanti bidentati forma complessi tetraedrici molto stabili). Tra questi in particolare quello con il difenilfosfinoetano, dppe, $[\text{Au}(\text{dppe})_2]\text{Cl}$, ha dimostrato una buona attività antitumorale verso numerosi tumori modello nel topo, ed è stato fermato in fase pre-clinica a causa della notevole tossicità riscontrata in cani e conigli

a livello di cuore, fegato e polmoni attribuibile a malfunzionamento dei mitocondri. Al contrario di *auranofin*, il complesso $[\text{Au}(\text{dppe})_2]^+$ rimane integro anche in presenza di tioli e nel plasma umano. Essendo un catione lipofilo, come tutti i cationi di questo tipo, tende ad accumularsi nei mitocondri a causa dell'elevato potenziale della loro membrana interna (figura) (i mitocondri, che si trovano nella maggior parte delle cellule eucariote, sono degli organelli che convertono molecole di nutrienti in ATP nel processo di **fosforilazione ossidativa**. Durante la fosforilazione ossidativa avviene il processo di trasferimento di elettroni da elettrondonatori ad elettrone-accettori, l'ultimo dei quali è O_2 (il "complex IV" nella figura è la citocromo c ossidasi). Queste reazioni redox, compiute da una serie di proteine complesse collocate nella membrana interna dei mitocondri, rilasciano energia che viene quindi usata per generare ATP. Più in dettaglio, l'energia rilasciata dal flusso di elettroni attraverso questa catena di proteine (*electron transport chain*) viene usata



per pompare dei protoni attraverso la membrana interna dei mitocondri, generando un gradiente di pH e di potenziale elettrico (cioè di energia potenziale) ai suoi due lati. Questa energia potenziale viene utilizzata consentendo ai protoni di ritornare all'interno, cioè secondo il potenziale, fluendo attraverso un grosso e complesso sistema proteico che è l'ATP-sintasi. Questo enzima, che è un esempio di macchina molecolare, sfrutta questa energia per compiere la fosforilazione di ADP ad ATP. Una cellula eucariota tipicamente contiene circa 2000 mitocondri, che ne occupano circa il 20% del volume totale. Ogni mitocondrio è formato da una membrana esterna ed una interna composte da un doppio-strato di fosfolipidi e da proteine. Sebbene la catena di trasferimenti elettronici nei mitocondri, che porta alla riduzione tetra-elettronica di O_2 ad H_2O , sia molto efficiente, la "perdita" accidentale di elettroni può portare alla produzione di specie parzialmente ridotte di O_2 , come ione superossido (riduzione con 1 elettrone) e perossido (riduzione con 2 elettroni), cioè ROS). L'accumulo di cationi lipofili sul lato interno della membrana interna ne altera il potenziale e la permeabilizzazione. I cationi con chelanti meno stabili (ponte propilico anziché etilico), oltre ad accumularsi nei mitocondri, sono anche in grado di inibire la TrxR, analogamente all'*auranofin*. Il meccanismo ipotizzato è illustrato in figura.

Al momento c'è molto interesse verso i complessi di Au(I) con leganti NHC (vedi antibatterici di argento). Sebbene i leganti NHC siano molto forti, essi vengono comunque lentamente scambiati in vivo a favore di cisteina e seleno-cisteina e i complessi si comportano sostanzialmente come un *auranofin* a rilascio lento dello ione Au(I).