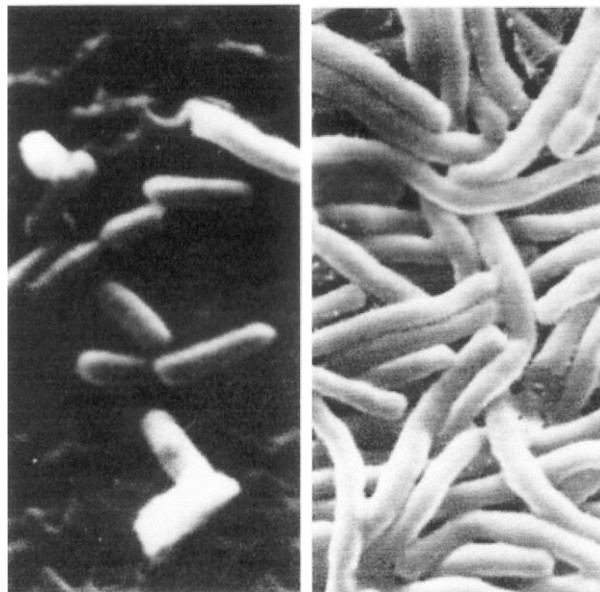


Antitumorali di platino

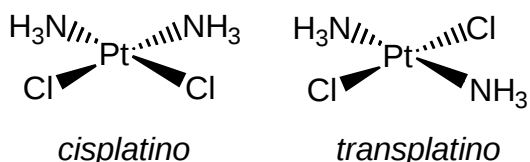
Il cisplatino

L'utilizzo di composti di coordinazione di platino nella terapia dei tumori è stato sicuramente uno degli sviluppi più inattesi nel campo dei farmaci negli ultimi 50 anni.

Questa nuova classe di chemioterapici fu scoperta casualmente (uno dei più noti esempi di *serendipity*) da Barnett Rosenberg (1927 – 2009) nel 1965. Rosenberg era da poco diventato professore di biofisica presso la Michigan State University a Lansing (USA); avendo un *background* come fisico e pochissima esperienza in biologia, uno dei suoi primi esperimenti fu studiare l'effetto dei campi elettromagnetici sulla divisione cellulare. In una fortunata serie di combinazioni, fu allestita una camera di crescita cellulare in cui erano presenti due elettrodi di platino immersi in un brodo di cultura contenente sali di ammonio e per provare il funzionamento dell'intero sistema, prima di applicarlo a cellule di mammiferi, fu utilizzato un comune batterio, l'*Escherichia coli*. Quindi, dopo aver permesso la crescita delle cellule batteriche fino allo stato stazionario, fu applicato un campo elettrico. La densità batterica cominciò a decrescere; quando il campo fu spento la densità ritornò a valori normali nel giro di poche ore. Le cellule batteriche a forma di bacchetta, che normalmente hanno una lunghezza di 2–5 μm ed un diametro di circa 1 μm , dopo esposizione al campo elettrico apparivano come filamenti, fino a 300 volte più lunghi del normale (**crescita filamentosa**). La figura mostra a sinistra i batteri prima dell'esperimento e a destra la crescita filamentosa.



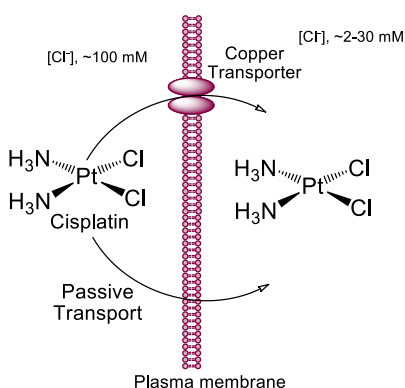
In pratica i batteri continuavano a replicarsi ma non riuscivano a dividersi. Conducendo opportune verifiche (e.g. utilizzando elettrodi di nichel, che non davano crescita filamentosa) Rosenberg capì che questo fenomeno non era dovuto direttamente al campo elettrico applicato, ma a composti in soluzione derivanti dall'elettrolisi, seppur minima, degli elettrodi di platino. In seguito ad analisi dettagliate, in soluzione vennero individuate numerose specie cariche e neutre di Pt(IV) e Pt(II), formalmente derivate dal cloroplatinato d'ammonio, $(\text{NH}_4)_2[\text{PtCl}_6]$ (sali d'ammonio erano presenti nel brodo di coltura), anche per effetto della luce. In seguito a vari esperimenti risultò infine che l'attività era dovuta essenzialmente a specie neutre, cloro-ammino complessi di Pt(II). Esistono due complessi neutri planari-quadrati di questo tipo, gli isomeri geometrici *cis*-diclorodiamminoplatino (*cisplatino*) e *trans*-diclorodiamminoplatino (*transplatino*) (figura). Il primo risultò essere attivo nei confronti della crescita filamentosa **a concentrazioni sub-tossiche**, mentre il complesso *trans* risultò inefficace a basse concentrazioni (e tossico a concentrazioni più elevate). Questa differenza di attività fra i due isomeri geometrici fu la prima evidenza dell'importanza della geometria.



Il complesso a geometria *cis* era già noto fin dal 1844 come “sale di Peyrone”, dal medico-farmacista torinese Michele Peyrone che lo aveva preparato per primo. Un anno dopo Reiset sintetizzò un altro composto di platino avente uguale composizione ma diverse proprietà chimico-fisiche (risultato poi essere l'isomero *trans*). Le strutture di questi sali furono risolte, in maniera definitiva, nel 1890 da Werner che, così facendo, stabilì le basi della moderna chimica di coordinazione. Infatti, egli propose che la geometria di tali complessi fosse di tipo planare quadrato e che la differenza tra i due composti risiedeva nel diverso modo in cui erano disposti i leganti intorno all'atomo di platino.

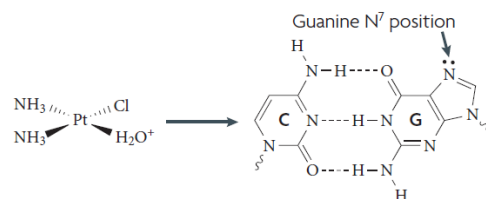
Gli esperimenti sui batteri suggerivano che il cisplatino interagisse con il DNA e che quindi, come altri composti organici con proprietà simili (e.g. le mostarde azotate) potesse avere proprietà antitumorali. Si passò quindi agli esperimenti *in vivo* su animali e poi, incoraggiati dai risultati, agli studi di fase clinica sull'uomo. I primi studi clinici diedero indicazioni controverse: mentre alcuni pazienti mostrarono risultati molto positivi, altri evidenziarono l'elevata tossicità del composto, soprattutto a livello dei reni e del sistema nervoso, oltre a forte nausea e vomito e mielosoppressione (riduzione dell'attività del midollo osseo). Fortunatamente, nuove procedure di somministrazione (pre- e post-idratazione) si dimostrarono efficaci a ridurre in modo significativo la tossicità renale, consentendo di somministrare ai pazienti dosi più elevate ($\geq 50 \text{ mg/m}^2$). I risultati spettacolari ottenuti in pazienti affetti da tumori dell'apparato genitale, soprattutto tumore ai testicoli dove il cisplatino si dimostrò praticamente curativo, portarono alla sua approvazione da parte della FDA (*Food and Drug Administration*) nel 1978. Da allora il cisplatino è uno dei farmaci più utilizzati al mondo nella terapia antitumorale, ed è in assoluto uno dei farmaci di maggior successo (un cosiddetto *blockbuster drug*). Viene usato in quasi la metà dei regimi chemioterapici sia da solo o, più spesso, in combinazione con altri farmaci come gli inibitori della topoisomerasi II (doxorubicina, etoposide, mitomicina, bleomicina e epirubicina), mostarde (ciclofosfamide e melfalan), antimetaboliti (gemcitabina, 5-fluorouracile e metotrexato) alcaloidi della vinca (vinblastina e vinorelbina) e taxolo. Solitamente, in un trattamento standard, dopo la rimozione chirurgica del tumore, i pazienti vengono trattati con cicli di somministrazioni i.v. di cisplatino (ed eventualmente degli altri farmaci). Per quanto riguarda il controllo della tossicità, oltre alla già menzionata idratazione, la nausea e il vomito possono oggi venire attenuati con somministrazione di antagonisti dei recettori della serotonina (e.g. *plasil*). La neurotossicità è quella che determina la dose massima (*dose-limiting toxicity*): il cisplatino induce neuropatia periferica, tinnito (ronzio alle orecchie) e parziale perdita dell'udito. Può essere reversibile sebbene il recupero sia spesso lento. Il cisplatino è molto efficace contro un numero piuttosto limitato di tumori, in particolare il tumore ai testicoli (90% di cure), alla vescica e alle ovaie, e presenta attività minore nel carcinoma cervicale, nei tumori di testa e collo, nei melanomi e nei tumori ai polmoni a cellule piccole (SCLC). Altri tumori sono invece spontaneamente resistenti al cisplatino (e ai suoi analoghi, vedi dopo); accade poi piuttosto spesso che tumori, dopo una fase iniziale di remissione, acquisiscano **resistenza** al farmaco dopo un certo numero di cicli.

Meccanismo d'azione del cisplatino



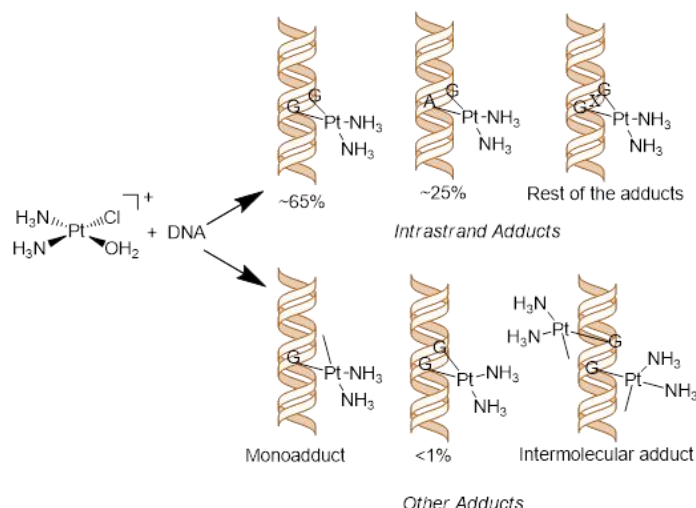
E' largamente accettato che il principale bersaglio del *cisplatino* sia il **DNA**, con il quale il complesso forma una serie di addotti di coordinazione. Nel sangue, dove la concentrazione di cloruro è piuttosto elevata (ca. 100 mM) il cisplatino rimane intatto, cioè non si ha sostituzione dei cloruri, anche se si può associare in modo non covalente alle proteine presenti nel siero, in particolare all'albumina. L'ingresso nelle cellule, sia tumorali che sane, avviene principalmente per diffusione passiva; in anni recenti si è trovato che l'ingresso può anche venire mediato, con un meccanismo attivo, dalla proteina trans-membrana CTR1 deputata al trasporto del rame. Una volta all'interno delle cellule, dove la concentrazione di cloruro è decisamente più bassa (4–20

mM) si ha il processo di idrolisi (o aquazione) cioè di rilascio, comunque lento, prima di un cloruro e poi anche del secondo. Le corrispondenti aquo-specie sono più reattive di quella neutra, sono dei forti elettrofili che reagiscono prontamente con numerosi leganti biologici sostituendo le molecole d'acqua. Tra i possibili leganti nel citosol, oltre a innumerevoli proteine, ricordiamo le metallotioneine, ricche di cisteine e quindi particolarmente affini al Pt(II), ione *soft*, e soprattutto il glutathione, anch'esso con una cisteina, che può raggiungere



concentrazione 10 mM. Si stima che solo l'1 – 10% del cisplatino riesca a entrare nelle cellule, mentre il restante 90% (almeno) è responsabile della tossicità sistemica.

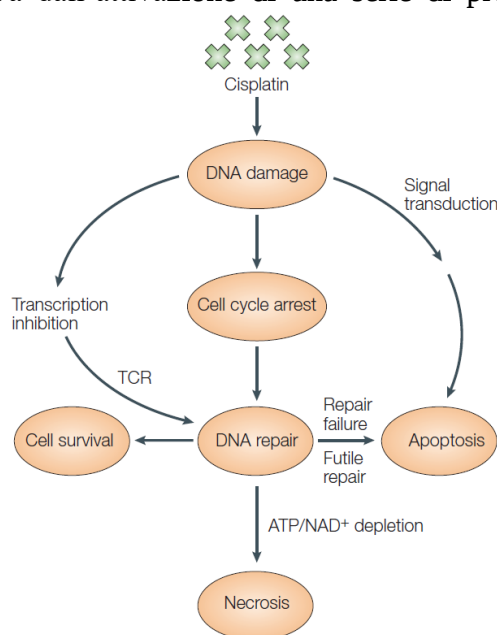
Le basi puriniche del DNA sono dei forti nucleofili tramite l'atomo di azoto N7, non impegnato nell'accoppiamento di Watson-Crick. Il cisplatino si lega formando addotti bifunzionali (figura), che si ritiene siano all'origine delle sue proprietà citotossiche. In particolar modo, il platino si coordina al DNA formando in prevalenza legami *intra-catena* (1,2-*intrastrand cross-link*) 1,2-d(GpG) (60–65%) e 1,2-d(ApG) (20–25%) (mentre molto meno abbondante è l'addotto con l'ordine delle due basi invertito, 1,2-d(GpA)). In misura molto minore si formano addotti 1,3-intracatena d(GpXpG) (1,3-*intrastrand cross-link*), legami inter-catena tra due guanine di filamenti diversi (1,2-*interstrand cross-link*) e addotti fra proteine e DNA (nonostante il DNA si trovi nella cromatina, avvolto intorno agli istoni).



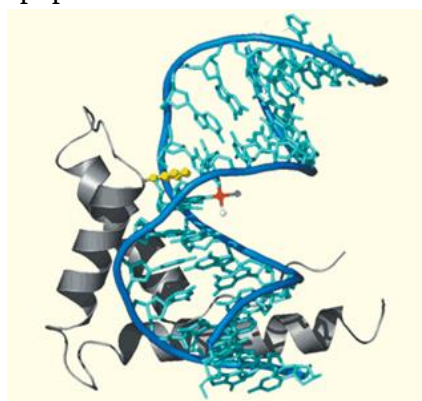
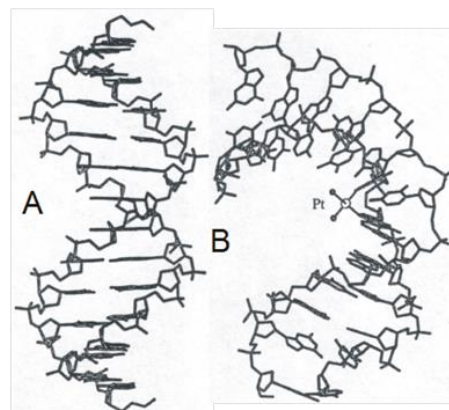
Il legame 1,2-*intrastrand* non può venire formato dal transplatino, clinicamente inattivo, a causa della sua geometria, quindi si suppone che l'attività antitumorale del cisplatino sia in stretto rapporto con la formazione specifica di tali addotti. Si valuta, in base a dati analitici su DNA di pazienti trattati con cisplatino, che si formino circa 50.000 addotti per cellula e che un sito di platinazione ogni 250.000 basi sia sufficiente per inibire la trascrizione del DNA e quindi a indurre citotossicità.

La platinazione del DNA causa una serie

di **eventi a cascata** che portano alla morte cellulare, che può avvenire per necrosi (caratterizzata da rigonfiamento del citosol e rottura della membrana cellulare) o per **apoptosi** (caratterizzata invece da riduzione del volume cellulare, condensazione della cromatina e frammentazione del DNA). Il tipo di morte cellulare indotto dal cisplatino dipende dalla concentrazione: la necrosi avviene su cellule trattate con concentrazioni elevate, mentre a basse concentrazioni, compatibili con quelle raggiungibili *in vivo*, si ha apoptosi. L'apoptosi deriva dall'attivazione di una serie di proteasi aspartiche appartenenti alla famiglia delle caspasi. Ma come si arriva dalla platinazione del DNA all'apoptosi? Senza entrare in troppi dettagli, molti dei quali non sono ancora neppure del tutto chiari, la serie di eventi che porta alla morte cellulare è riassunta schematicamente nella figura. La platinazione del DNA induce una modifica strutturale della doppia elica, evidenziata sia da studi NMR in soluzione che di diffrazione di raggi-X allo stato solido. La coordinazione del platino a due guanine adiacenti (1,2-*intrastrand cross-link*), infatti, induce una distorsione di 26° – 50° dell'angolo diedro che si forma tra le due guanine coinvolte nel cross-link (nel DNA non modificato tali basi sono parallele tra loro), un piegamento (*kink*) della doppia elica verso il solco maggiore (figura; a sinistra la conformazione di un frammento di DNA normale, a destra quella di un frammento di DNA platinato), e lo "svolgimento" parziale (*unwinding*) della doppia elica in vicinanza del sito di platinazione. Queste inusuale conformazione nel punto di platinazione viene riconosciuta da specifiche proteine (*damage-*



response proteins), tra cui enzimi che compongono i sistemi di riparo del DNA, fattori di trascrizione, istoni (quelli intorno a cui il DNA è avvolto nella cromatina) e proteine contenenti il dominio HMG (*High Mobility Group*). In particolare, il piegamento verso il *major groove* espone una parte del *minor groove* che viene riconosciuto da queste proteine. La figura mostra la struttura ai raggi X dell'addotto ottenuto co-cristallizzando un frammento di DNA platinato a una coppia di guanine adiacenti sullo stesso filamento e una proteina HMG. A seconda di come viene riconosciuto dalla cellula il DNA danneggiato, cioè da quali proteine, si possono avere diverse risposte (*signal transduction*), come l'attivazione diretta dell'apoptosi, o l'arresto del ciclo cellulare e il tentativo di riparare il DNA (vedi dopo). In base al modo in cui le proteine di riparo intervengono nei confronti degli addotti cisplatino-DNA la cellula sarà in grado di riparare il danno oppure attiverà un programma irreversibile di morte cellulare per apoptosi.



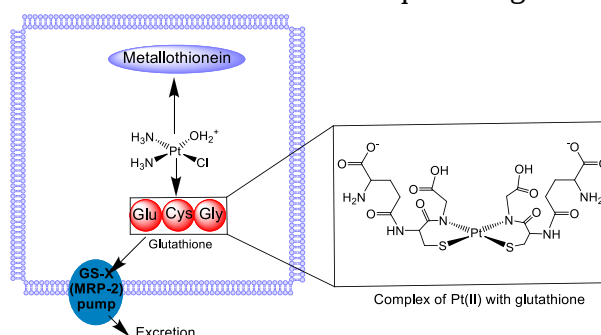
Meccanismi di resistenza ai composti di platino

Il differente modo di espressione delle proteine e la loro attività potrebbero essere la spiegazione del perché solo alcuni tipi di tumori (come quello testicolare, ovarico e alla testa) siano curati con successo dal cisplatino.

La resistenza dei tumori al cisplatino, spontanea o indotta, è un problema estremamente serio, in quanto limita notevolmente l'utilizzo del farmaco, e molto studiato. Si è rivelato anche un problema estremamente complesso ed è lontano dall'essere compreso. Come già detto, i principali processi cellulari tramite i quali il cisplatino attacca le cellule tumorali sono: *uptake* e trasporto, formazione di addotti con DNA e loro riconoscimento

da parte di specifiche proteine (*damage-response proteins*), la “traduzione” del segnale del danno al DNA che ne inibisce la replicazione e trascrizione e attiva numerose *signal transduction pathways* che, tramite un'ampia serie di proteine che controllano la crescita cellulare, la sua differenziazione e le risposte allo stress, possono portare all'arresto del ciclo cellulare e al riparo del danno oppure alla morte cellulare. Numerosi studi hanno individuato **quattro principali meccanismi di resistenza**: 1) diminuzione del livello di platino nella cellula in seguito a diminuzione dell'*uptake* e/o aumento dell'efflusso; 2) aumento del livello di tioli cellulari (glutathione, metallothioneine e altre molecole contenenti zolfo) che interagiscono col platino, disattivandolo; 3) aumento della capacità di riparo del DNA e/o aumento della resistenza al danno; 4) cambiamenti nelle catene di segnali che portano alla morte cellulare (*cell-death pathways*), o alla sua sopravvivenza. In particolare, riduzione della risposta apoptotica e attivazione di *survival pathways*.

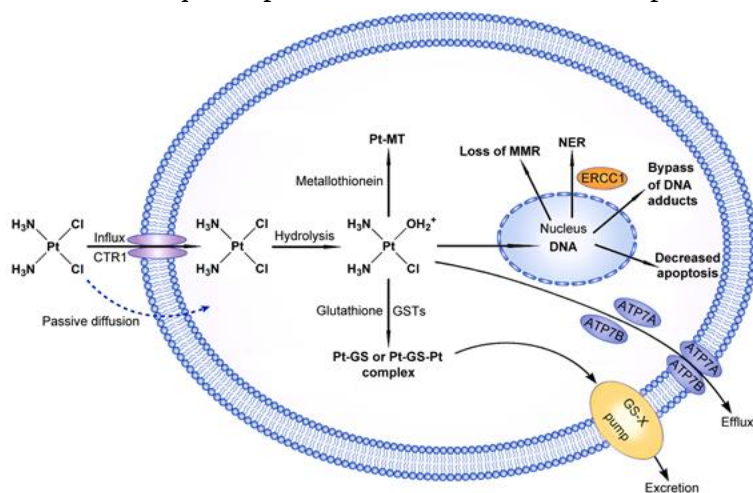
Dell'*uptake* del cisplatino si è già detto. Per quanto riguarda l'efflusso, ci sono numerose evidenze sperimentali che indicano che esso è mediato sia da proteine trans-membrana di efflusso, sia da proteine specifiche per l'efflusso del rame, in particolare ATP7A e ATP7B. Per quanto riguarda il secondo punto, i gruppi tiolici delle cisteine nel glutathione e nelle metallothioneine difendono la cellula dal cisplatino. A causa dell'elevata affinità del tiolato per il Pt(II), dopo essere entrato in una cellula un complesso di platino si può legare preferenzialmente a tali gruppi piuttosto che alle basi del DNA. Nei pazienti trattati col cisplatino si rileva l'aumento di glutathione e metallothioneine, che contribuisce



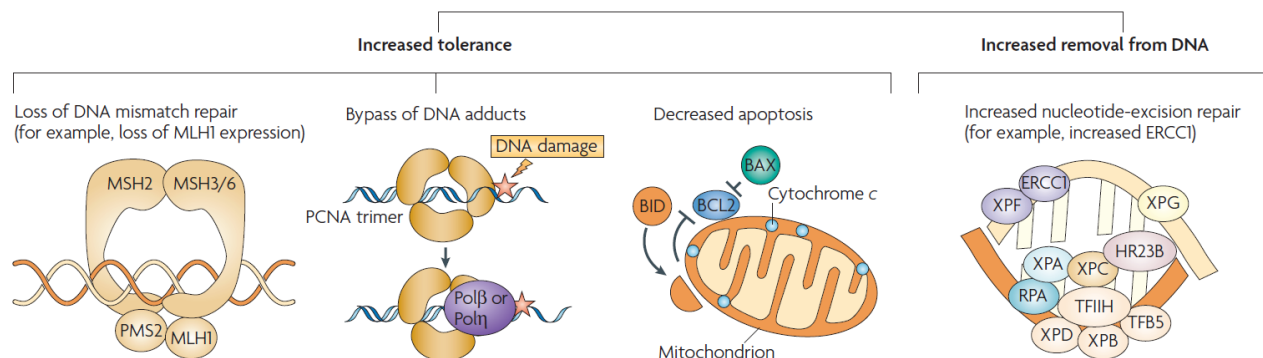
alla resistenza. I risultanti complessi Pt–glutathione vengono esportati delle cellule tramite la pompa ATP-dipendente *glutathione S-conjugate export* (GS-X) (figura).

Particolarmente importante è l'aspetto del riparo del DNA platinato. Numerose linee cellulari platino-resistenti, derivanti da diversi tipi di tumori, presentano un'aumentata capacità di riparo del DNA rispetto alla loro controparte sensibile al cisplatino. Il principale meccanismo di riparo per rimuovere gli addotti cisplatino–DNA è il **NER** (*Nucleotides Excision Repair*) che agisce tagliando un piccolo frammento oligonucleotidico e permettendo la sintesi di un nuovo pezzo di DNA. Il NER opera in diversi stadi: il riconoscimento della lesione, il taglio e la rimozione di una porzione di circa 30 basi del singolo filamento contenente la lesione, la ri-sintesi del pezzo di filamento e il suo legame al posto di quello rimosso. A sottolineare l'importanza di questo sistema, si ritiene che l'elevata attività del cisplatino verso il tumore ai testicoli sia dovuta al fatto che le cellule di questo tumore abbiano una intrinseca bassa capacità di rimuovere gli addotti cisplatino–DNA e bassi livelli delle **proteine di riparo**, come XPA e **ERCC1** (*excision repair cross-complementing-1*), cioè sostanzialmente un sistema NER poco efficiente. Si ritiene anche che le proteine HMG, particolarmente espresse nei tessuti dei testicoli, possano contribuire all'efficacia del cisplatino. Come già detto queste proteine riconoscono il sito di platinazione del DNA e potrebbero schermarlo nei confronti del sistema di riparo NER. Sembra anche probabile che il transplatino sia inattivo perché i suoi addotti con il DNA sono riparati molto più efficientemente di quelli del corrispondente isomero *cis*. È stato accertato che il transplatino forma prevalentemente addotti monofunzionali e legami *inter*-catena con il DNA, e questi potrebbero essere riconosciuti e trattati in maniera differente rispetto agli addotti *intra*-catena.

L'incremento della tolleranza della cellula nei confronti del DNA danneggiato è un altro fattore che gioca un ruolo importante nella resistenza al cisplatino. Questa aumentata tolleranza può avvenire tramite la perdita (o comunque la diminuzione) di importanza del meccanismo di riparo **MMR** (*mismatch repair*), che coinvolge numerose proteine ed enzimi. Normalmente la platinazione del DNA interferisce con la normale attività del sistema MMR, impedendo che il riparo del DNA danneggiato vada a buon fine, attivando di conseguenza una risposta apoptotica (*apoptotic pathway*). Quando il sistema MMR è carente, le cellule possono continuare a proliferare nonostante i danni al DNA causati dalla platinazione, cioè diventano resistenti. La tolleranza al cisplatino può anche aumentare perché gli enzimi di polimerasi, come le polimerasi β e η , riescono a bypassare i siti di platinazione, o infine tramite una decrescita (*downregulation*) delle risposte apoptotiche, cioè della trasduzione del danno al DNA tramite catene di enzimi e proteine. Questo è il meccanismo più complesso e la cui comprensione è in continua evoluzione. Citiamo soltanto la cosiddetta *p53-pathway*. La proteina p53, o antigene tumorale cellulare p53 (*tumor suppressor protein p53*), è una fosfo-proteina nucleare, ossia un fattore di trascrizione, coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare, nel riparo del DNA e nell'apoptosi e ricopre la funzione di soppressore tumorale. La sua funzione è particolarmente importante per sopprimere i tumori nascenti e infatti si è trovato che essa è mutata in più del 50% dei tumori umani. Il ruolo di questa proteina nella resistenza al cisplatino è controverso e dipende sia dal tipo di tumore che dalle circostanze: infatti può attivare sia meccanismi che portano ad apoptosi oppure processi che portano al riparo del DNA e sopravvivenza della cellula. Normalmente le cellule mancanti la proteina p53 sono più resistenti al cisplatino rispetto a quelle con p53 funzionante. Tuttavia, il riconoscimento degli addotti cisplatino–DNA da parte del sistema di riparo NER può mediare dei



processi di trasduzione che attivano la *p53 pathway*, portando all'arresto del ciclo cellulare che consente di riparare il DNA danneggiato aumentando quindi la resistenza al cisplatino. La figura conclusiva riassume quanto detto sui meccanismi di resistenza al cisplatino.



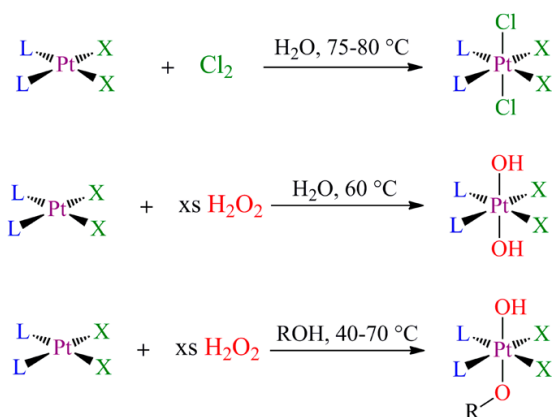
Correlazione struttura-attività (SAR) e farmaci di seconda e terza generazione

Dalla scoperta dell'attività antitumorale del cisplatino sono stati preparati migliaia di composti di platino (a seconda delle fonti, da più di 1000 a più di 5000), sia Pt(II) che Pt(IV), e ne sono state saggiate le proprietà antitumorali, tipicamente con esperimenti *in vitro* valutando la **citotossicità** verso linee di cellule tumorali (e non). In base a questi studi è stato possibile individuare delle **correlazioni fra struttura del complesso e attività antitumorale**, riportate di seguito.

- Per essere attivi i complessi planari quadrati di Pt(II) devono scambiare solo alcuni dei loro leganti (gruppi uscenti) in reazioni con molecole biologiche: il complesso viene attivato in seguito ad idrolisi dei gruppi uscenti anionici.
- La geometria è fondamentale: i gruppi uscenti devono essere in *cis* tra loro; gli isomeri di tipo *trans* dei complessi con leganti monodentati, sono generalmente inattivi.
- La velocità di idrolisi dei gruppi uscenti deve essere moderata. Infatti, una velocità molto elevata implica che il complesso interagisca indiscriminatamente con componenti biologici, inducendo elevata tossicità (e.g. gruppi uscenti labili come il nitrato), e non raggiunge le cellule tumorali; una velocità di attivazione troppo bassa permette al complesso di arrivare sul "bersaglio" ma con scarsa attività perché troppo inerte.
- I leganti in *trans* rispetto ai gruppi uscenti devono essere legati "fortemente", tipicamente devono essere gruppi amminici relativamente inerti. Questi *non-leaving groups* (o *supporting ligands*) rimangono quindi nell'addotto formato fra il frammento attivo e il DNA.
- Sui leganti amminici (due monodentati o uno bidentato) ci deve essere almeno un atomo di idrogeno residuo, presumibilmente per permettere la formazione di legami a idrogeno con la molecola bersaglio.
- I complessi dovrebbero essere elettricamente neutri, sebbene la forma attiva potrebbe essere carica dopo il processo di aquazione.

Sono risultati attivi anche numerosi complessi di Pt(IV). I complessi di Pt(IV), con struttura elettronica $5d^6$ basso-spin, sono esacoordinati con geometria ottaedrica. Essi possono avere potenzialmente dei vantaggi rispetto ai complessi planari-quadrati di Pt(II) perché sono più inerti verso le reazioni di sostituzione e quindi ci si aspetta che – nel loro percorso verso il tumore – reagiscano meno con altri componenti biologici. Cioè le reazioni collaterali indesiderate con proteine possono venire minimizzate. Generalmente si ritiene che i complessi di Pt(IV) vengano ridotti *in vivo* a Pt(II) per mezzo di agenti extra- e intra-cellulari, ancor prima di reagire con il DNA.

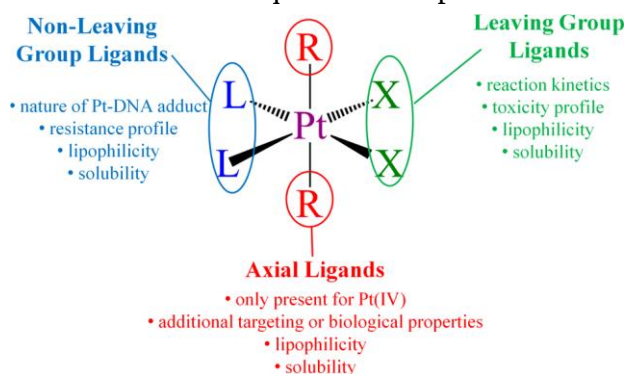
Due potenziali agenti riducenti piuttosto abbondanti sono l'**acido ascorbico** nel sangue (11–79 μM) e il **glutathione** all'interno delle cellule (0.5–10 mM). La riduzione del Pt(IV) ottaedrico a Pt(II) planare quadrato comporta ovviamente la perdita di due leganti. Solitamente i complessi di Pt(IV) con attività antitumorale vengono sintetizzati per ossidazione, tipicamente con Cl_2 o H_2O_2 , di un opportuno complesso di Pt(II) (figura), cioè si fa una addizione ossidativa. Normalmente i due leganti che si aggiungono vanno in geometria *trans* mentre la stereochimica dei quattro leganti nel piano equatoriale rimane la stessa del complesso di Pt(II) di partenza. Si riteneva che in seguito a



riduzione avvenisse sempre il processo inverso, cioè venissero rilasciati i due leganti mutuamente in *trans* che si trovano lungo l'asse perpendicolare al piano del complesso planare quadrato originale. Tuttavia, una serie di studi più recenti ha evidenziato che questo non è sempre vero (vedi dopo il satraplatino) e la composizione dei prodotti di riduzione di Pt(IV) dipende dalla natura dell'agente riducente. Inoltre, le cinetiche di riduzione intracellulare delle specie di Pt(IV) dipendono sia dal tipo di cellula che dai leganti nella sfera di coordinazione del complesso, che definiscono ovviamente anche il suo potenziale redox. In generale

per i complessi di Pt(IV) l'imprevedibilità della riduzione *in vivo* a formare le specie attive di Pt(II) in termini di velocità, quantità e localizzazione, e l'incertezza sulla natura delle specie che si formano, possono essere delle notevoli complicazioni per l'uso clinico. D'altra parte, la presenza di due leganti aggiuntivi consente di modulare maggiormente le proprietà del complesso. Inoltre, i due gruppi "aggiuntivi", potrebbero comportarsi come *targeting ligands*, oppure possedere funzioni particolari, cioè essere essi stessi attivi una volta rilasciati in seguito a riduzione.

In buona sostanza quindi i complessi antitumorali di platino sono dei pro-farmaci che vengono



attivati tramite idrolisi dei gruppi uscenti, eventualmente preceduta da riduzione nel caso dei complessi di Pt(IV) (che potrebbero quindi essere chiamati dei *pro-pro-farmaci*). L'influenza dei vari leganti sulle proprietà del complesso è riassunta nella figura. È chiaro che i gruppi uscenti influenzano la velocità di attivazione, mentre quelli non-uscenti sono gli unici a influenzare la *natura* degli addotti con il DNA.

Nei 30 anni che hanno seguito l'introduzione del cisplatino in uso clinico, delle migliaia di

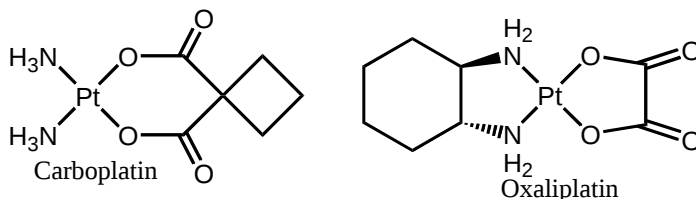
complessi di platino sintetizzati e saggiati *in vitro* e – a volte – anche *in vivo*, **solo 23** hanno raggiunto il livello di investigazione in fase clinica e di questi solo due hanno ottenuto l'approvazione FDA per l'uso a livello globale, carboplatino e ossaliplatino (figura), mentre altri tre vengono utilizzati in Asia a livello nazionale (Cina, Corea del sud e Giappone).

La ricerca di nuovi analoghi del *cisplatino* è stata dettata dall'esigenza di estendere l'efficacia rispetto ai tumori resistenti al cisplatino e di minimizzare la tossicità.

Carboplatino

Come già detto, la tossicità dei composti di

Pt(II) è direttamente correlata alla velocità di aquazione, cioè di rilascio dei gruppi uscenti. I complessi con gruppi uscenti molto labili, come il nitrato in *cis*-[Pt(NH₃)₂(ONO₂)₂], sono molto tossici, mentre quelli con leganti a rilascio molto più lento, come i dicarbossilati chelanti, sono notevolmente meno tossici. In questo modo è stato sviluppato il cosiddetto carboplatino, in cui al posto dei due cloruri c'è il 1,1-ciclobutanodicarbossilato (cbdc) che idrolizza con una costante cinetica di 10⁻⁸ s⁻¹, rispetto a 10⁻⁵ s⁻¹ per il cisplatino. Ad esempio, in tampone fosfato a pH = 7, in assenza di cloruri, il processo di aquazione del cisplatino ha un tempo di semi-vita di 2.4 h, mentre quello del carboplatino è di 268 h. Il *carboplatino*, approvato dall'FDA nel 1985, è decisamente meno tossico del cisplatino, e può venire utilizzato a dosi molto più alte (300–450 mg m⁻²) rispetto al cisplatino (20–120 mg m⁻²), a seconda del regime di somministrazione. Alla minore tossicità, che permette di somministrare dosi più elevate, è associata però anche una **minore potenza** del



farmaco, cioè sono richieste dosi maggiori di *carboplatino* per raggiungere gli stessi effetti terapeutici del *cisplatino*. Anche il tipo di tossicità è un po' diversa: la mielo-soppressione, che non è preoccupante nella terapia a base di *cisplatino*, è il principale effetto collaterale (dose-dipendente) del *carboplatino*. Gli altri effetti tossici del *carboplatino* sono generalmente meno marcati e meglio tollerati rispetto a quelli del *cisplatino*. Nausea e vomito hanno una minore durata e sono più facilmente controllati con farmaci antiemetici. Non si osservano generalmente effetti a carico dei reni. Anche la neurotossicità (dose-dipendente) è meno comune di quella osservata nel trattamento con il *cisplatino*. Dal momento che **la specie attiva** che si ottiene dopo dissociazione del cbdc è **la stessa** che si ottiene dal *cisplatino*, il *carboplatino* è attivo sostanzialmente verso gli stessi tumori. Viene normalmente preferito al *cisplatino* nel trattamento del tumore alle ovaie, ma è meno attivo nel cancro ai testicoli, al collo, alla testa.

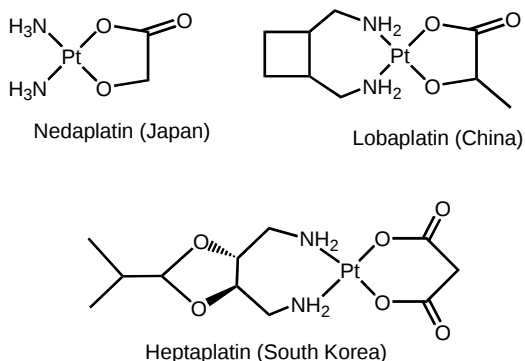
Ossaliplatino

La ricerca di analoghi che non mostrassero resistenza incrociata (*cross-resistance*) con *cisplatino* e *carboplatino*, ha portato alla sintesi di complessi in cui al posto delle ammoniache sono state utilizzate altre ammine, sia monodentate che chelanti. In questo modo si è cambiata la natura del frammento attivo. Fra questi il migliore è risultato quello con il legante *trans*-(1*R*,2*R*)-1,2-diamminocicloesano (DACH) al posto delle ammoniache e l'ossalato come gruppo uscente, chiamato ossaliplatino (figura). L'ossaliplatino, usato in terapia in Francia dal 1996, ha mostrato, in associazione con il 5-fluorouracile e la leucovorina, efficacia nel trattamento del tumore coloretale (diminuisce le metastasi al fegato) ed è stato per questo approvato dall'FDA nel 2002.

La maggiore differenza tra *cisplatino* e *carboplatino* da un lato, e ossaliplatino (o altri composti contenenti simili leganti) dall'altro è il modo in cui le proteine cellulari riconoscono e "processano" gli addotti platino-DNA. Il tipo di addotti formati dall'ossaliplatino con il DNA è infatti sostanzialmente lo stesso di quello osservato per il *cisplatino*, cioè prevalentemente addotti GpG *intrastrand*, ma naturalmente la loro natura specifica è diversa in quanto sono diversi i leganti non-labili. Il legante DACH, piuttosto voluminoso rispetto alle ammoniache e idrofobico, puntando verso il *major groove* del DNA contrasta il legame delle proteine addette al riparo della lesione. Questi importanti risultati confermano l'ipotesi che modifiche strutturali del legante inerte possono alterare lo spettro dell'attività antitumorale e superare la resistenza. Anche questo complesso di platino presenta una minore nefrotossicità in confronto al *cisplatino*, presumibilmente correlata alla lenta idrolisi del suo gruppo uscente, l'ossalato. La tossicità principale dell'ossaliplatino è la neuropatia, caratteristica di tutti i derivati di platino contenenti il DACH. Si osservano generalmente nausea e vomito, mentre non è presente ototossicità.

Nedaplatino, lobaplatino e eptaplatino

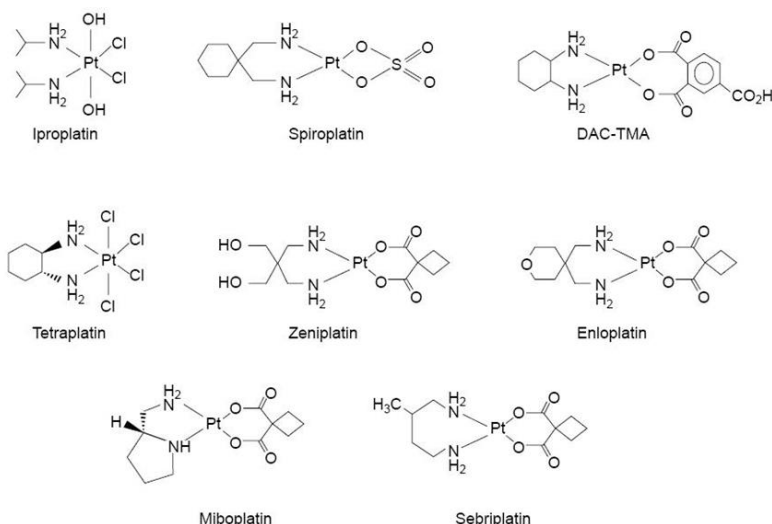
I tre complessi di Pt(II) in uso clinico a livello nazionale in Asia (figura) sono il *nedaplatino* (*cis*-diammino 2-idrossiacetato-platino(II), complesso di seconda generazione (ha due ammoniache come gruppi non-uscenti) sviluppato e approvato per l'uso clinico in Giappone, e due complessi di terza generazione: il *lobaplatino* (1,2-diamminometilciclobutano-platino(II) lattato), registrato per l'uso clinico in Cina e in fase clinica III in Europa, che presenta come gruppo amminico un derivato del ciclobutano e come gruppo uscente il lattato, e l'*eptaplatino*, approvato nella Corea del Sud e che ha come gruppo uscente il malonato. Tutti formano comunque principalmente addotti di tipo intra-



strand d(GpG) e d(ApG) con il DNA. Il *nedaplatino* viene usato in Giappone nel trattamento chemioterapico dei tumori di testicoli, ovaie, utero, testa e collo e polmoni. Sia *lobaplatino* che *eptaplatino* hanno mostrato, *in vitro*, attività verso linee cellulari di tumori resistenti al *cisplatino* (come ci si può aspettare dai farmaci di terza generazione). Il *nedaplatino* è dieci volte più solubile del *cisplatino* e decisamente meno nefrotossico sia di *cisplatino* che *carboplatino*. In Cina viene

utilizzato per il trattamento della leucemia mieloide cronica, del tumore metastatico al seno e nel tumore al polmone a cellule piccole. L'eptaplatino ha una tossicità piuttosto bassa *in vivo*, con MTD (*maximum tolerated dose*) 480 mg m⁻²; le tossicità limitanti, DLT (*dose limiting toxicity*) sono a livello epatico, renale e del midollo spinale. Viene utilizzato in Corea del Sud nel trattamento dei tumori gastrici.

Composti che non hanno superato la fase clinica

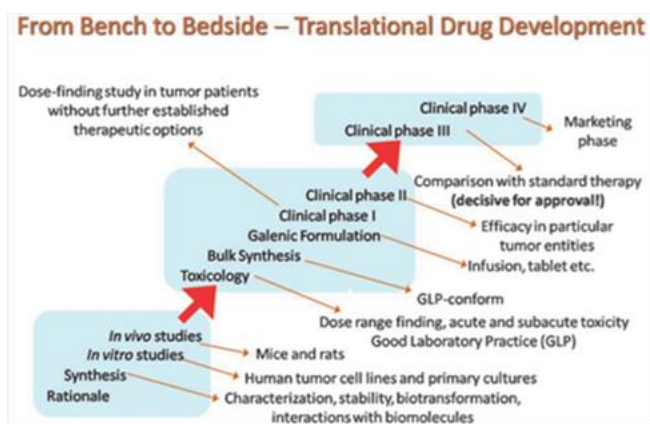


La figura riporta i principali composti di Pt(II) e Pt(IV) che non hanno superato la fase clinica, o per elevata tossicità non prevista e non controllabile (in fase 1) (ad esempio lo zeniplatino ha dimostrato una tossicità renale molto marcata, non osservata in precedenza sugli animali, e non attenuata neppure dalla pre-idratazione), o per mancanza di sufficiente attività (in fase 2) o per non essersi dimostrati migliori di quelli già esistenti (fase 3) o, a volte, anche solo per motivi economici. La figura riassume il processo di selezione di un farmaco antitumorale

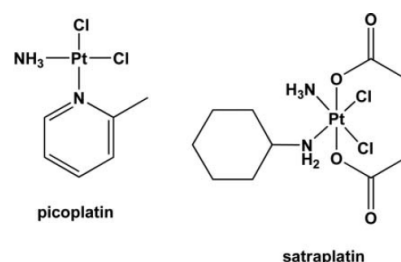
attraverso le varie fasi cliniche. Come si vede a colpo d'occhio, tutti questi composti rispettano sostanzialmente le regole SAR illustrate prima. Fra quelli di Pt(II), soltanto **miboplatin** ha raggiunto la fase 3. Il composto era stato selezionato in base alla sua buona solubilità, bassa tossicità renale, e attività verso tumori resistenti al cisplatino. In due studi di fase 3 non si è dimostrato tuttavia migliore del cisplatino, sia somministrato da solo che in combinazione con ciclofosfamide e doxorubicina. Fra tutti i complessi di platino entrati in fase clinica senza poi diventare dei farmaci, l'**iproplatin**, *cis,trans,cis*-diclorodiidrossobis(isopropilammino)platino(IV), è stato quello più studiato, con ben cinque studi di fase 1, ventidue di fase 2 e uno di fase 3 che

hanno coinvolto globalmente più di 1000 pazienti.

Altri complessi che non hanno superato la fase clinica sono il satraplatino e il picoplatino (figura). Da notare che entrambi sono meno "convenzionali" in quanto contengono l'ammoniaca e un'altra amina, cioè sono asimmetrici, e quindi la loro sintesi è più difficoltosa. Il **satraplatino** è un complesso di Pt(IV) che, essendo inerte e prontamente assorbito dalla mucosa gastrointestinale, aveva potenzialmente il grosso vantaggio di poter essere somministrato per via orale. Inoltre

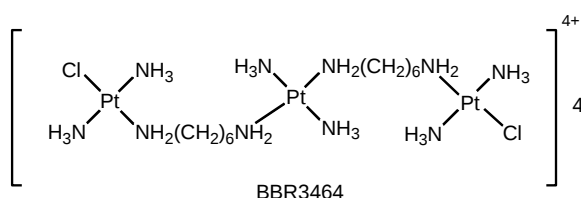


presentava *in vitro* attività anche verso numerose linee cellulari di tumori resistenti al cisplatino. Quando raggiunge il flusso sanguigno viene ridotto generando almeno sei diversi complessi di Pt(II), fra i quali il più abbondante (e il più attivo) è quello senza i due acetati assiali. Anche il satraplatino è stato abbandonato dopo aver raggiunto la fase clinica 3. Il picoplatino contiene una picolina (2-metilpiridina) come gruppo non uscente, oltre all'ammoniaca. La picolina si dispone



sostanzialmente perpendicolare rispetto al piano del complesso e quindi con il metile genera ingombro sterico lungo l'asse perpendicolare. Il complesso era stato progettato proprio per sfavorire l'interazione associativa (quindi l'attacco perpendicolare al piano) con leganti forti come il glutathione, che disattivano il cisplatino prima di raggiungere il DNA. Sebbene i test *in vitro* e *in vivo* abbiano dimostrato che il complesso è attivo anche su linee cellulari platino-resistenti, ben tollerato senza particolare neuro- e nefro-tossicità e possa essere somministrato per via orale, esso è stato ritirato dalla fase clinica per mancanza di efficacia dopo essere stato valutato in tre fasi 2 su tre diversi tumori.

L'ultimo complesso di platino ad aver raggiunto la fase clinica (1999), chiamato **BBR3464**, è ancor meno convenzionale, essendo una specie multinucleare e cationica (figura). Il composto è stato sviluppato con l'intenzione di fare addotti diversi con il DNA, che in linea di principio dovrebbero portare ad attività diversa rispetto ai complessi mononucleari convenzionali. In effetti *in vitro* BBR3464 ha un *uptake* cellulare più elevato e più rapido del cisplatino (nonostante le dimensioni maggiori e la carica!), si lega più rapidamente al DNA ($t_{1/2}$ ca. 40 min, presumibilmente a causa della sua carica positiva che facilita l'interazione col DNA che è un poli-anione) e soprattutto, come previsto, forma col DNA degli addotti diversi rispetto al cisplatino, ritenuti la causa della sua elevatissima citotossicità. Mentre il cisplatino (come gli altri complessi mononucleari) forma degli



addotti *intra-strand* a *short-range* (1,2 o al massimo 1,3) e rigidi, gli addotti formati da BBR3464 sono definiti a *long-range* e flessibili, con un'elevata percentuale di *inter-strand cross-links*. Soprattutto, gli addotti formati da BBR3464 non inducono distorsioni marcate nel

DNA, tipo *kink* e *unwinding*, caratteristiche dei complessi mononucleari. A causa delle modeste variazioni conformazionali causate dalla platinazione, questi addotti sono dei cattivi substrati per il riconoscimento da parte delle proteine, e.g. le HMG, e quindi sfuggono più facilmente al riparo. Negli studi preclinici *in vitro* e *in vivo* il complesso polinucleare ha mostrato di essere citotossico a dosi anche 1000 volte inferiori rispetto al cisplatino, ed è risultato attivo anche verso una serie di tumori platino-resistenti. La fase clinica I ha confermato l'elevata tossicità, con una MTD di 0.9 mg m⁻². Tuttavia, dopo aver raggiunto la fase 2 contro tre tipi di tumore, BBR3464 è stato ritirato per mancanza di sufficiente attività ed eccessiva tossicità, soprattutto perché presenta una finestra terapeutica troppo stretta.

“Composti” di platino in fase clinica

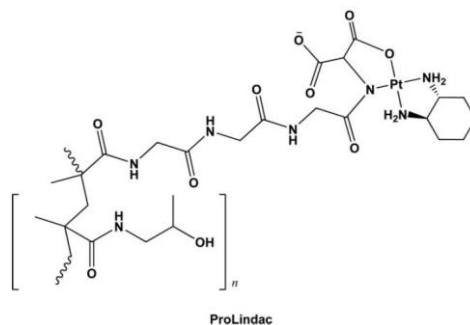
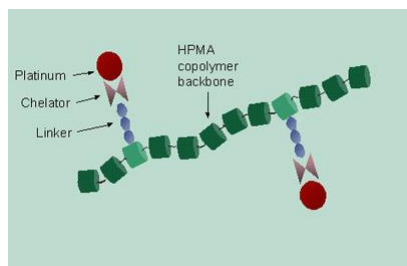
I composti di platino attualmente ancora in fase di valutazione clinica e che potrebbero diventare dei farmaci in un prossimo futuro non sono dei nuovi complessi, ma delle **formulazioni** di complessi noti basate su vari *nano-carriers* che dovrebbero consentire da un lato un *loading* elevato del farmaco e dall'altro il suo rilascio controllato e prolungato. Cioè in pratica l'obiettivo della ricerca si è spostato dallo sviluppo di nuovi complessi a quello di migliorare l'aspetto di *delivery*, e con esso la tossicità e l'efficacia, dei composti esistenti. La seguente tabella, da un lavoro del 2019, elenca i sistemi di questo tipo entrati in fase clinica.

Table 1. Representative metaldrug delivery systems that have entered clinical trials.

Delivery System	Active Drug	Formulation	Clinical Status	Tumor Target	Identifier
Polymeric nanoparticles	oxaliplatin	AP5346	Phase II	Head and Neck cancer	NCT00415298
	oxaliplatin	NC-4016	Phase I	Colorectal cancer	NCT03168035
	cisplatin	NC-6004	Phase III	Pancreatic cancer	NCT03109158
Liposome	cisplatin	Lipoplatin	Phase I	Lung cancer	NCT02702700
	cisplatin	SPI-077	Phase I, II	Ovarian, Breast and Skin cancer	NCT01861496 NCT00004083
	oxaliplatin	Lipoxal	Phase I	Advanced gastrointestinal cancer	NCT00964080
Inorganic Nanoparticles	iron oxide	Ferumoxytol	Early Phase I	Glioblastoma	NCT00660543

Data are gathered from www.clinicaltrials.gov.

Il **ProLindac™** è un nano-polimero che porta il frammento attivo dell'ossaliplatino, cioè il frammento $[Pt(R,R\text{-dach})]$, legato a un polimero biocompatibile e idrofilo, l'idrossipropilmetacrilamide, HPMA (figura). Altre nano-particelle sono basate sul copolimero biocompatibile e bio-degradabile PLGA, acido poli(lattico-co-glicolico). L'intenzione di questi sistemi è quella di sfruttare l'effetto EPR (*enhanced permeability retention*) per un miglior *targeting* dei tumori solidi.

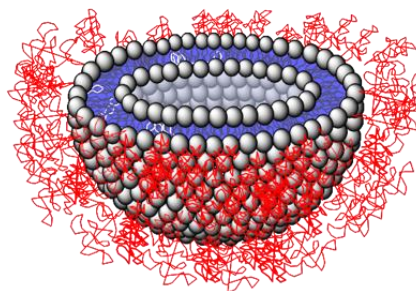


Il Pt è legato al polimero tramite gli atomi di azoto e ossigeno dell'amidomalonato; il chelato è stabile a pH fisiologico ma nelle condizioni di pH più acido esistenti nello spazio extracellulare dei tumori solidi (il pH è tra 0.5 e 0.8 unità più basso) rilascia lentamente il frammento attivo di platino. In uno studio su animali, il composto si è

dimostrato in grado di fornire livelli di platino nel plasma più elevati e più duraturi e una maggior quantità di addotti $[Pt(R,R\text{-dach})]$ nel tumore rispetto all'ossaliplatino. ProLindac™ è attualmente in fase clinica 2, sia come componente singolo che in combinazione con altri farmaci antitumorali (e.g. il paclitaxel).

I liposomi sono uno dei primi *nano-carrier* usati per il rilascio di farmaci, e vantano numerose formulazioni per farmaci antitumorali approvate dall'FDA e in uso clinico. Sono micelle inverse, cioè vescicole sferiche con un *core* acquoso circondato da un doppio-strato lipidico: composti idrofili vengono incorporati nel *core* acquoso, mentre quelli lipofili possono essere intrappolati nel doppio-strato lipidico.

Il **Lipoplatin™** è una forma di cisplatino (o, alternativamente, di carboplatino o ossaliplatino) incapsulato in liposomi di dimensioni nanoscopiche (90 – 130 nm) e tempi di semi-vita *in vivo* elevati (120 h) che, sfruttando l'effetto EPR, dovrebbero extravasare con relativa selettività nei tumori solidi. Il lipoplatino è stato sviluppato nel tentativo di ridurre la tossicità sistemica del cisplatino e consentire di somministrare dosi più elevate migliorando contemporaneamente il *targeting* verso tumori primari solidi e metastasi. La micella inversa è formata da glicerofosfolipidi, come il dipalmitoil fosfatidil glicerolo (DPPG), ed è ricoperta esternamente da catene di PEG (filamenti rossi in figura). Il lipoplatino attraversa con relativa facilità la membrana cellulare in virtù della “natura fusogena” di lipidi tipo DPPG, e la presenza della copertura di PEG serve a prolungare il tempo di permanenza nel sangue prevenendo l'individuazione da parte del sistema immunitario. Studi di fase clinica 1 hanno dimostrato che effettivamente nei pazienti trattati con il lipoplatino si ha un maggior accumulo di platino nei tessuti tumorali rispetto a quelli sani (fino a 200 volte, il che tuttavia non significa necessariamente un aumento di platino nelle cellule). In uno studio di fase 3, la combinazione lipoplatino + gemcitabina si è dimostrata leggermente superiore a quella di cisplatino + gemcitabina, con minore nefro- e neuro-tossicità. Altri studi di fase 3, in combinazione con 5-FU e con radioterapia sono in corso. Molti ritengono che il lipoplatino potrebbe essere il prossimo “composto” di platino a ottenere l'approvazione dall'FDA.



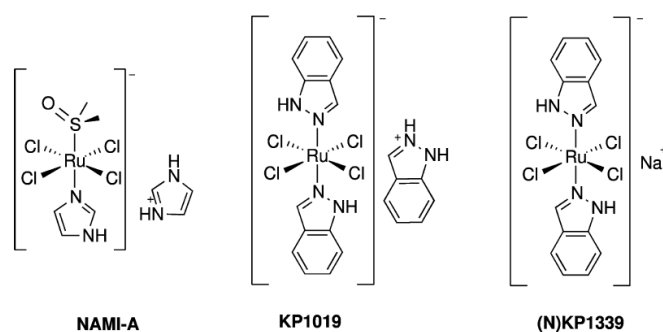
Rutenio

Dal momento che individuare dei composti di platino che possano avere proprietà terapeutiche migliori rispetto a cisplatino, carboplatino e ossaliplatino si è rivelata un'impresa molto difficile, la ricerca si è ben presto indirizzata anche verso altri metalli. L'obiettivo era – ed è tuttora – principalmente quello di trovare complessi che abbiano attività verso tumori resistenti ai composti

di platino e che, possibilmente, presentino anche tossicità sistemica inferiore. I composti di rutenio furono fra i primi ad essere studiati e ancora oggi rappresentano un settore di ricerca molto attivo. In condizioni fisiologiche il rutenio può assumere principalmente due stati di ossidazione, Ru(III), d^5 , e Ru(II), d^6 , entrambi a basso spin. In entrambi gli stati di ossidazione i complessi sono esacoordinati ottaedrici. Fra i primi composti di rutenio ad essere investigati ci furono i due isomeri di Ru(II) con dimetilsolfossido *cis*- e *trans*-[RuCl₂(dms_o)₄] (studiati a Trieste), e cloro-ammino complessi di Ru(III) come *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] (dove è chiara l'influenza del cisplatino). Dal momento che i complessi neutri di Ru(III) sono piuttosto inerti per quanto riguarda la sostituzione dei cloruri (cioè per l'attivazione), venne avanzata l'ipotesi che essi fossero dei pro-farmaci, attivati *in vivo* per riduzione alle corrispondenti specie di Ru(II) che, essendo a questo punto anioniche, rilasciano più rapidamente i cloruri. Secondo questa ipotesi, nota come “*activation by reduction*” (e mai realmente dimostrata) i composti di Ru(III) potrebbero avere una certa selettività per l'attivazione nei tumori solidi (rispetto ai tessuti sani), un po' come si ipotizza per i composti di Pt(IV). Infatti le masse tumorali, crescendo rapidamente senza lo sviluppo dei sistemi di vascolarizzazione tipici dei tessuti sani, sono normalmente ipossiche e quindi un ambiente più favorevole alla riduzione rispetto ai tessuti sani.

Complessi di rutenio(III)

Verso la fine degli anni 1980 vennero sviluppati, quasi in contemporanea, due complessi anionici di Ru(III) strutturalmente simili. A Trieste venne sviluppato il complesso Na[*trans*-RuCl₄(dms_o-S)(Im)] (Im = imidazolo), denominato NAMI. Sebbene il composto non sia particolarmente citotossico contro linee cellulari tumorali *in vitro*, diede ottimi risultati *in vivo* saggiato su tumori murini, in particolar modo si



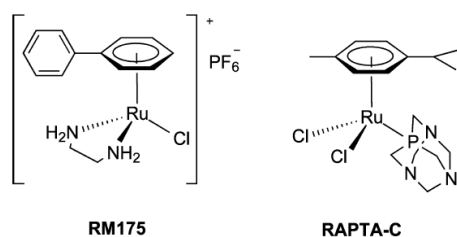
dimostrò più attivo del cisplatino nei confronti delle metastasi polmonari (mentre era scarsamente attivo verso il tumore primario). Tuttavia NAMI non possedeva molti dei requisiti chimico-fisici necessari per uno sviluppo farmaceutico: il complesso è igroscopico e quindi non molto stabile allo stato solido e inoltre cristallizza (mediamente) con due molecole di DMSO di cristallizzazione (occasionalmente sostituite parzialmente da molecole di acetone) generando così variabilità nell'analisi elementare. Questi problemi vennero risolti passando al corrispondente sale di imidazolio, [ImH][*trans*-RuCl₄(dms_o-S)(Im)], denominato NAMI-A (figura). Il NAMI-A, pur essendo ancora ben solubile in acqua, è stabile allo stato solido e non presenta molecole di cristallizzazione; inoltre viene ottenuto in due semplici stadi a partire dal rutenio triclورو (il precursore universale di tutti i composti di rutenio) con ottima resa e purezza. Studi in soluzione acquosa evidenziarono che il complesso è piuttosto labile, soprattutto in condizioni fisiologiche, e dissocia abbastanza rapidamente almeno due cloruri e il dms_o. Il complesso si riduce anche rapidamente e quantitativamente in presenza di riducenti biologici, come acido ascorbico e cisteina. Quindi sostanzialmente anche il NAMI-A è un pro-farmaco e numerose evidenze sperimentali suggeriscono che in realtà tutti i leganti originali vengono persi quando si lega a biomolecole *in vivo*. Il complesso interagisce in soluzione con il DNA, ma molto meno del cisplatino e in modo meno selettivo. D'altra parte interagisce rapidamente con le proteine del plasma, albumina e transferrina, che potrebbero contribuire al suo trasporto nel tumore. Tutte le indicazioni *in vitro* hanno suggerito che il DNA non è il bersaglio molecolare, ma l'origine dell'attività antimetastatica deriva dal suo effetto sulla mobilità e sull'invasività delle cellule tumorali, con un meccanismo che sembra avvenire a livello extra-cellulare (o meglio sulla superficie della cellula). In virtù della sua ottima attività antimetastatica sui tumori murini, il NAMI-A venne introdotto in fase clinica 1 nel 1999 (primo composto di rutenio); lo studio fu condotto su 24 pazienti, affetti da tumori di diverso tipo, e venne determinata una MTD (*maximum tolerated dose*) di 300 mg·m⁻²·day⁻¹. Lo studio è

proseguito nel 2008 con una fase clinica 1-2, nella quale il NAMI-A è stato saggiato in combinazione terapeutica con la gemcitabina su pazienti affetti da tumore polmonare a cellule non-piccole (NSCLC), senza dare però risultati positivi.

Come già detto, nello stesso periodo è stato sviluppato a Vienna il complesso strutturalmente simile $[\text{IndH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{Ind})_2]$ (Ind = indazolo, figura) denominato **KP1019**. Il composto, pur non essendo particolarmente citotossico verso linee cellulari tumorali *in vitro*, dimostrò ottima attività *in vivo* su tumori animali e, in particolare, verso un tumore coloretale resistente al cisplatino. In definitiva, sia il NAMI-A che KP1019 dimostrarono attività *in vivo* per certi aspetti diversa e migliore rispetto al cisplatino. KP1019 venne studiato in fase 1 su pochi pazienti nel 2001, raggiungendo una dose di $600 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$ senza incontrare troppa tossicità. La scarsa solubilità del complesso impedì tuttavia di raggiungere dosi più elevate che avrebbero richiesto volumi di infusione troppo grandi. Per questo motivo si fece il percorso inverso rispetto al NAMI-A, passando al corrispondente sale sodico $\text{Na}[\text{trans-RuCl}_4(\text{Ind})_2]$ (figura) denominato NKP1339. Con questo composto, molto più solubile, venne ripetuto uno studio di fase clinica 1 più completo (e con un ciclo di somministrazione diverso), raggiungendo una dose di $780 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$, dove la nausea risultò essere il fattore limitante. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, KP1019/NKP1339 è più inerte rispetto a NAMI-A e sembra mantenere alcuni dei leganti originali anche *in vivo*. Quindi, nonostante la somiglianza a livello strutturale, i due composti si comportano diversamente, soprattutto dal punto di vista della velocità di rilascio dei leganti (e quindi di attivazione). Come il NAMI-A, KP1019 si lega rapidamente alle proteine del plasma, e si ritiene che la transferrina sia, almeno in parte, responsabile del suo *uptake* (o meglio dei suoi metaboliti) nelle cellule. Anche in questo caso l'attività antitumorale non sembra essere "tipo-cisplatino", cioè non sembra derivare da interazioni con il DNA. Si ritiene che sia KP1019 che NKP1339 inducano apoptosi tramite la cosiddetta *mitochondrial pathway*, cioè localizzandosi nei mitocondri e alterandone il funzionamento.

Complessi di rutenio(II)

In anni più recenti, la ricerca si è concentrata su composti organometallici di Ru(II) del tipo *half-sandwich*, o detti anche di tipo *piano-stool* in quanto la loro geometria tetraedrica ricorda quella di uno sgabello per pianoforte, con un sedile – rappresentato dall'arene – e tre gambe. La presenza dell'arene – legato in modo molto stabile – conferisce una notevole lipofilia e, in caso di interazione con il DNA, può contribuire comportandosi come un intercalante. Sono stati sintetizzati



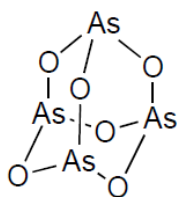
centinaia di complessi di questo tipo, variando sostanzialmente i leganti presenti sugli altri tre siti disponibili, che si possono in larga parte ricondurre ai due precursori mostrati in figura, chiamati RM175 e RAPTA-C. I complessi del tipo RM175 contengono un chelante bidentato e un solo gruppo labile, in questo caso il cloruro, che viene rilasciato in soluzione acquosa. Questi composti sono solitamente molto citotossici *in vitro* e hanno dimostrato attività *in vivo* contro

modelli di tumore nel topo, anche platino-resistenti. Si ritiene (in base a molti studi condotti con nucleobasi, oligonucleotidi e DNA) che il loro meccanismo d'azione derivi dalla formazione di **addotti monofunzionali con il DNA**, preferenzialmente legandosi alle guanine. Il legante 1,2-diamminoetano (o etilendiammina) forma legami a idrogeno addizionali con il DNA che contribuiscono a stabilizzare gli addotti. Quindi si ritiene che abbiano un meccanismo d'azione simile a quello del cisplatino, anche se formano addotti diversi col DNA. I complessi tipo RAPTA (dove RAPTA sta per *Ruthenium Arene PTA*, PTA essendo l'acronimo della fosfina coordinata 1,3,5-triaza-7-fosfotriciclo[3.3.1.1]decano che fornisce elevata solubilità in acqua) sono invece neutri e contengono due gruppi uscenti anionici. Questi composti, pur essendo strutturalmente simili, hanno comportamento e caratteristiche biologiche notevolmente diverse da quelli tipo RM175. Solitamente sono poco citotossici *in vitro*, e *in vivo* non sono particolarmente attivi nel ridurre il tumore primario ma, come il NAMI-A, hanno attività contro le metastasi. Dal punto di

vista meccanicistico, in seguito al rilascio dei due cloruri generano specie in grado di formare potenzialmente addotti bifunzionali, ma l'evidenza sperimentale suggerisce che interagiscono preferenzialmente con le proteine piuttosto che col DNA, con il quale interagiscono debolmente, con un ipotetico meccanismo che ricorda quello proposto per il NAMI-A piuttosto che per il cisplatino. Studi recenti nei quali i complessi *half-sandwich* dei due tipi sono stati fatti interagire con i nuclei cellulari, cioè con la cromatina, hanno confermato che mentre RM175 interagisce preferenzialmente con il DNA, RAPTA-C si lega maggiormente alle proteine degli istoni nella cromatina.

Arsenico

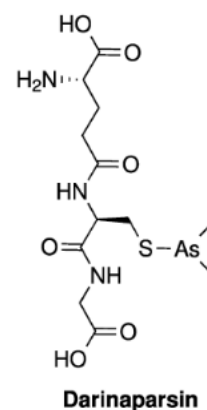
Nonostante il grande interesse per i composti di rutenio e il fatto che due di essi abbiano raggiunto



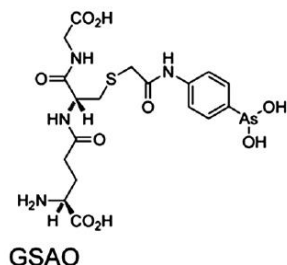
gli studi di fase clinica, oltre al platino l'arsenico è, al momento, l'unico altro metallo non radioattivo approvato dalla FDA nel 2000 per il trattamento dei tumori. Formulazioni a base di composti inorganici di arsenico (solfuri e ossidi) erano usati da secoli nella medicina tradizionale Cinese, e nel 1700–1800 anche in Europa contro varie malattie. È stato reintrodotta nell'uso clinico negli anni 1970, da quando vengono usate soluzioni iniettabili di **triossido di arsenico**

(ATO, 0.15 mg/kg al giorno per diverse settimane) per il trattamento di numerose leucemie e soprattutto della **leucemia promielotica acuta** (*acute promyelocytic leukemia*, APL). In particolare, l'ossido di arsenico viene utilizzato per il trattamento di pazienti che non rispondono all'acido retinoico (ATRA) in combinazione con antracicline, che è il cosiddetto *first line treatment* per questa forma di leucemia. Molto efficace è anche il trattamento congiunto ATO/ATRA. Grazie a questi trattamenti, nel volgere di qualche decennio la APL si è trasformata da una malattia mortale a una guaribile, con statistiche che riportano il 90% di sopravvissuti dopo 5 anni. Inoltre, in studi preclinici si è visto che As₂O₃ induce apoptosi non soltanto verso le cellule di APL, ma anche verso tumori solidi, come quello della prostata, dell'esofago e delle ovaie. Il triossido di arsenico presenta, come facilmente immaginabile, una tossicità piuttosto seria (la dose letale di As₂O₃ per ingestione è di ca. 70 mg), dovuta all'elevata affinità di As(III) per i gruppi SH di molecole come acido lipoico e i residui cisteinici di peptidi (e.g. glutazione), proteine ed enzimi. L'azione dell'arsenico sulle cellule avviene tramite svariati meccanismi. Nelle cellule leucemiche l'arsenico induce la degradazione della proteina mutante PML-RAR α , che è il prodotto della fusione di due geni causata da una traslocazione a livello dei cromosomi. Questa proteina mutante, specifica delle cellule leucemiche APL, ha un ruolo centrale nello sviluppo della malattia in quanto blocca la **differenziazione mieloide**, cioè delle varie cellule del sangue (eritrociti, granulociti, macrofagi..). In pratica l'arsenico riesce a indurre la parziale differenziazione dei pro-mielociti. Inoltre, la formazione di legami As(III)–S/Se inibisce l'attività di enzimi come glutazione reduttasi, glutazione perossidasi (Se), tioredossina reduttasi (Se) e tioredossina perossidasi, tutti enzimi che contribuiscono a formare la difesa cellulare contro lo stress ossidativo. Quindi l'esposizione a As₂O₃ diminuisce le difese contro i ROS e quindi favorisce la morte cellulare. L'arsenico inoltre interferisce anche a **livello epigenetico** (vedi dopo), inibendo la metilazione di un istone e influenzando quindi numerose vie di trasduzione dei segnali che comportano un'ampia serie di effetti sulle cellule, che includono: induzione dell'apoptosi, inibizione della crescita, inibizione dell'angiogenesi, inibizione della respirazione mitocondriale (almeno nelle cellule leucemiche).

Anche se la tossicità di As₂O₃ è trattabile con altri farmaci, si stanno comunque cercando di sviluppare dei derivati a base di arsenico più selettivi. Un nuovo potenziale farmaco, un composto organo-arsenico coniugato al tripeptide glutazione (e potenzialmente un metabolita di As₂O₃), l'S-dimetilarsinoglutatione, **Darinaparsin** (figura), è attualmente studiato in fase clinica. In uno studio di fase clinica II il darinaparsin, composto ben tollerato, ha mostrato buoni risultati nei confronti di linfomi e sta ora venendo sviluppato



sia come mono-terapico che in combinazione contro il linfoma a cellule T, anche con una formulazione orale. Inoltre è anche attivo contro alcuni tumori solidi. Un altro arseno-derivato del glutathione in fase clinica I è il 4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino) phenylarsonous acid, GSAO (figura).



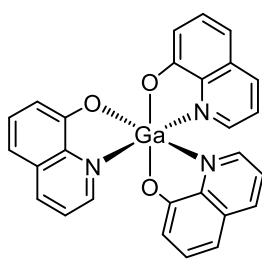
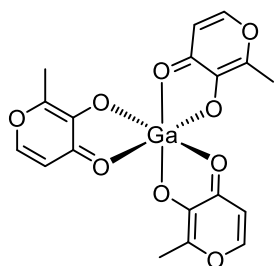
È interessante il meccanismo di azione proposto per questi coniugati arsenico-glutathione. Le cellule tumorali sono spesso caratterizzate dall'avere alti livelli sia di glutathione (GSH) che dei due enzimi implicati nel suo metabolismo, la glutathione transferasi (GST, che catalizza la coniugazione del glutathione a substrati xenobiotici, primo *step* per la detossificazione) e la gammaglutammil transferasi (γ GT). Elevate concentrazioni di queste molecole solitamente disattivano i farmaci (e.g. cisplatino) tramite coniugazione al GSH ed efflusso dalla cellula.

Darinaparsin e GSAO, apparentemente, sfruttano invece la sovra-espressione di questi enzimi nelle cellule tumorali per essere attivati. Ad esempio, si ritiene che il darinaparsin viene prima trasformato da γ GT esterna in dimetilarsinocisteina, che poi viene importata nella cellula tumorale tramite i trasportatori della cisteina.

Gallio

I sali di gallio possiedono svariate proprietà biologiche che potrebbero potenzialmente portare ad applicazioni di tipo terapeutico. Ad esempio il Ga(III) ha effetto ipocalcemico. L'ipercalcemia, uno sbilanciamento fra il calcio escreto con l'urina e quello riassorbito dalle ossa, è una comune ma seria complicazione dei pazienti di cancro. Infusioni di gallio nitrato, $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, vengono usate nei malati di cancro in alternativa ai bisfosfonati per trattare l'ipercalcemia, cioè ridurre il riassorbimento del calcio da parte delle ossa.

Gli studi sulle proprietà antitumorali del gallio nitrato, nonostante evidenza clinica (fase II) di attività nei confronti di linfomi non-Hodgkin e nei tumori di vescica, prostata e ovaie, sono stati abbandonati a causa di difficoltà relative al modo di somministrazione e alla sua tollerabilità (nefrotossicità e alcuni casi severi di neuropatia ottica). Si riteneva che l'indice terapeutico sarebbe migliorato se si fosse riusciti a mantenere un livello di ione Ga(III) nel plasma basso ma costante



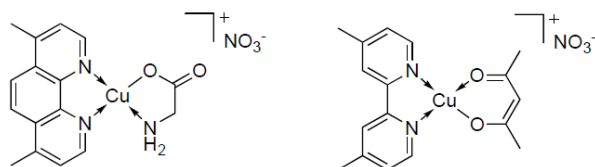
nel tempo. In altre parole, l'applicabilità dei composti di Ga(III) dipende fortemente dalla presenza di opportuni leganti in grado di prevenire, o almeno di rallentare, l'idrolisi. Per questo motivo per stabilizzare le soluzioni di gallio nitrato per uso clinico viene usato il citrato. Il complesso gallio tris-maltolato (figura), saggiato *in vitro* su cellule di linfoma, ha dimostrato di inibire la loro proliferazione e di indurre apoptosi a concentrazioni

più basse e più rapidamente rispetto al $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, in virtù di un migliore *uptake*. Il simile complesso tris(8-idrossichinolinato), KP46, ha mostrato attività promettente sia *in vitro*, su cellule di melanoma, che *in vivo* nel tumore al rene. La elevata lipofilità dei leganti permette l'assorbimento del gallio a livello intestinale consentendo la somministrazione orale. Uno studio di fase clinica I su una formulazione orale del composto KP46 (2009) ha dimostrato una buona tollerabilità ed evidenza di attività verso il carcinoma renale. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, si ritiene sia dovuto alla somiglianza dello ione Ga(III) con il Fe(III) oltre che per la carica, anche per le dimensioni (Fe^{3+} 0.65 Å vs Ga^{3+} 0.62 Å) e acidità di Lewis. Si ritiene che lo ione gallio sfrutti i meccanismi di *uptake* del ferro, cioè la transferrina, per l'ingresso nelle cellule, e che possa competere per gli stessi siti del ferro negli enzimi. Tuttavia, dal momento che il metabolismo intracellulare del ferro prevede processi redox, mentre il gallio è redox-inattivo, avendo un solo stato di ossidazione, esso perturba o inibisce i processi metabolici in cui è implicato il ferro. In particolare, si è dimostrato che il gallio – legandosi nel sito al posto del ferro – inibisce la

ribonucleotide riduttasi, che a sua volta induce perturbazioni a livello del ciclo cellulare e infine apoptosi a causa della diminuzione dei nucleotidi necessari per la sintesi di nuovo DNA da parte delle cellule in proliferazione.

Rame

Come già ampiamente detto, il rame è uno dei metalli essenziali. Nei pazienti affetti da alcuni tipi di tumore il livello di rame nel sangue è più elevato del normale. Si ritiene che questo aumento possa essere dovuto al fatto che il rame è necessario per il processo di angiogenesi (cioè la crescita di nuovi vasi sanguigni), che è particolarmente importante per la crescita del tumore e lo sviluppo di metastasi.



Sono stati studiati anche numerosi complessi di rame come potenziali agenti antitumorali. Complessi cationici planari quadrati di Cu(II) con chelanti bidentati, detti “Cassiopeine”, di formula generale $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{L-amminoacidato})](\text{NO}_3)$ e $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{O}-\text{O})](\text{NO}_3)$, dove N–N è una diimina

aromatica come bpy, phen o loro derivati sostituiti e O–O è acetilacetato (acac), e in particolare $[\text{Cu}(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenantroline})(\text{glicinato})](\text{NO}_3)$ (Cas II-gly) e $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'-bipyridine})(\text{acetilacetato})](\text{NO}_3)$, (Cas III-ia), sono stati ampiamente studiati in Messico *in vitro* e *in vivo* su modelli animali e Cas II-gly sta per entrare in uno studio di fase clinica I. Si è visto che, mentre la natura del chelante anionico ha poca influenza sulla attività, i derivati con la fenantrolina sono decisamente più attivi di quelli con il bipyridile, presumibilmente perché intercalano meglio nel DNA. Inoltre si è trovata una correlazione fra citotossicità *in vitro* e potenziale redox: i composti meno ossidanti sono quelli più citotossici. Si ritiene che il meccanismo d'azione sia dovuto all'intercalazione del complesso nel DNA, seguita da riduzione a Cu(I) e generazione di ROS che portano a danni irreparabili nel DNA inducendo la morte cellulare per apoptosi. In altre parole, si ritiene che Cas II-gly sia in grado di attivare H_2O_2 con un meccanismo tipo-Fenton usando dei riducenti naturali presenti nella cellula come sorgente di elettroni per passare da Cu(II) a Cu(I).