



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE

CURRICOLO: Farmacologia Molecolare e Cellulare

XXXI CICLO

## **Caratterizzazione *in vitro* della biotrasformazione di nuovi potenziali farmaci per la terapia dei tumori**

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Piero Maestrelli

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Luigi Quintieri

**Dottorando:** Veronica Di Paolo



# INDICE

RIASSUNTO .....	5
SUMMARY .....	7
<b>1. INTRODUZIONE GENERALE.....</b>	<b>9</b>
1.1 La biotrasformazione degli xenobiotici .....	9
1.1.1 Generalità e importanza degli studi di biotrasformazione degli xenobiotici ...	9
1.1.2 Variabilità interspecie e variabilità legata al sesso .....	10
1.1.3 Biotrasformazione dei farmaci.....	12
1.2 Classificazione delle reazioni di biotrasformazione .....	13
1.3 Gli enzimi citocromo P450 .....	14
1.4 Gli enzimi alcol deidrogenasi e aldeide deidrogenasi.....	17
1.5 Le aldeidi ossidasi: una classe di enzimi emergente.....	19
1.6 Le solfotrasferasi.....	23
1.7 Le glutatione trasferasi: generalità e ruolo in ambito oncologico .....	27
<b>2. CONTESTO E SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>33</b>
<b>3. NBDHEX E IL SUO ANALOGO STRUTTURALE MC3181 .....</b>	<b>35</b>
3.1 INTRODUZIONE.....	35
3.1.1 Inibitori di GSTP1-1 .....	35
3.1.2 NBDHEX e MC3181.....	36
3.2 MATERIALI E METODI.....	41
3.2.1 Reagenti .....	41
3.2.2 Valutazione della stabilità metabolica di NBDHEX e suoi analoghi .....	42
3.2.3 Analisi HPLC.....	45
3.2.4 Analisi LC-DAD-MS/MS.....	46
3.2.5 Analisi dei dati .....	49
3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	51
3.3.1 Reattività di NBDHEX e MC3181 nei confronti del GSH.....	51
3.3.2 Stabilità metabolica del glutationil-NBD .....	56
3.3.3 Reattività di MC2753e MC4351 nei confronti del GSH .....	61
3.3.4 Valutazione della possibile solfonazione di NBDHEX e MC3181 da parte di solfotrasferasi epatiche umane, murine e di ratto .....	66
<b>4. LA PIRIMETAMINA.....</b>	<b>71</b>
4.1 INTRODUZIONE.....	71
4.1.1 La pirimetamina come agente antitumorale.....	71
4.2 MATERIALI E METODI.....	75
4.2.1 Reagenti .....	75
4.2.2 Incubazione di PYR con microsomi epatici umani e di ratto, in presenza di NADPH.....	75
4.2.3 Incubazione di PYR con microsomi epatici di ratto, in presenza di UDPGA .....	76
4.2.4 Analisi HPLC.....	77
4.2.5 Analisi LC-DAD-MS.....	78
4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	79
4.3.1 Valutazione della stabilità metabolica di PYR .....	79

5. L'O-VANILLINA E I SUOI ANALOGHI.....	85
5.1 INTRODUZIONE.....	85
5.1.1 La vanillina .....	85
5.1.2 NFkB: generalità e ruolo nella trasformazione tumorale .....	85
5.1.3 Inibitori di NFkB.....	88
5.2 MATERIALI E METODI.....	91
5.2.1 Reagenti .....	91
5.2.2 Caratterizzazione della stabilità dell' <i>o</i> -vanillina e dei suoi analoghi strutturali, vanillina, 2-idrossi-4-metossibenzaldeide, 2-idrossi-5- metossibenzaldeide, 2-idrossi-6-metossibenzaldeide e salicilaldeide in presenza di citosol epatico .....	91
5.2.3 Analisi HPLC.....	92
5.2.4 Analisi dei dati .....	93
5.3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	95
 6. MG: INIBITORI DELLA POLIMERIZZAZIONE DELLA TUBULINA .....	 103
6.1 INTRODUZIONE.....	103
6.1.1 Microtubuli: un target per la terapia dei tumori .....	103
6.1.2 Limiti dei farmaci che interagiscono con i microtubuli .....	105
6.1.3 Derivati del fenil pirrolo chinolone (PPyQ).....	106
6.2 MATERIALI E METODI.....	109
6.2.1 Reagenti .....	109
6.2.2 Valutazione della stabilità di MG2474, MG2712, MG2713, MG2714, MG2710, MG2718 e MG2854 al metabolismo microsomiale epatico.....	109
6.2.3 Analisi HPLC.....	111
6.2.4 Analisi dei dati .....	112
6.3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	113
6.3.1 Stabilità di MG2474, MG2712, MG2713, e MG2714 al metabolismo ossidativo microsomiale epatico.....	113
6.3.2 Stabilità degli N-benzoil derivati del 7-PPyQ MG2710, MG2718 e MG2854 al metabolismo microsomiale epatico .....	115
 APPENDICE.....	 121
 BIBLIOGRAFIA.....	 133

## RIASSUNTO

La caratterizzazione della stabilità metabolica di un nuovo potenziale farmaco e l'identificazione del sistema enzimatico coinvolto nella sua biotrasformazione rivestono notevole importanza nello sviluppo di nuovi agenti terapeutici [Foti e Dalvie, *Drug Metab Dispos*, 44:1229, 2016]. Un primo obiettivo dell'attività svolta nell'ambito del Dottorato di Ricerca era rappresentato dalla valutazione della reattività nei confronti del tripeptide glutatione (GSH) di alcuni derivati del nitrobenzossadiazolo in fase di caratterizzazione preclinica, quali agenti antitumorali, rappresentati dall'inibitore di GSTP1-1 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esano (NBDHEX) e dai suoi analoghi MC3181, MC2753.

I risultati ottenuti dimostrano come l'estere benzoico di NBDHEX (MC2753) presenti, a differenza di NBDHEX e MC3181, elevata stabilità in presenza di concentrazioni fisiologiche di GSH [Fulci *et al.*, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32:240, 2017]. Successivi esperimenti, volti a valutare la stabilità di MC2753 all'azione di esterasi, hanno tuttavia dimostrato un'elevata suscettibilità del composto all'idrolisi mediata da carbossilesterasi (CES) microsomiali epatiche umane. La sostituzione della funzione esterea presente in MC2753 con una funzione ammidica ha permesso l'ottenimento di un composto (MC4351) molto promettente, in quanto dotato di stabilità all'azione di CES microsomiali e, a differenza di NBDHEX e MC3181, scarsamente reattivo vs. GSH.

Alla luce di un possibile riposizionamento in ambito oncologico della pirimetamina (PYR) [Fang, *Cancers (Basel)*, 6:494, 2014], sostanza nota per la sua attività antiprotozoaria, è stato inoltre intrapreso uno studio con l'obiettivo di ampliare le conoscenze sul suo destino metabolico. Studi di metabolismo epatico *in vitro*, condotti al fine di valutare la possibile glucuronidazione e/o ossidazione del farmaco in presenza di frazioni microsomiali umane e di ratto, hanno dimostrato come esso non vada incontro a glucuronidazione nelle due specie considerate. Per contro, l'incubazione di PYR con adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH) e microsomi epatici di ratto, o microsomi epatici umani isolati da un soggetto trattato con fenobarbital, ha condotto alla formazione di almeno 3 prodotti di mono-ossigenazione, rilevati grazie ad analisi in cromatografia liquida

accoppiata a rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi e spettrometria di massa (LC-DAD-MS).

È stato esaminato, inoltre, il metabolismo microsomiale epatico di una piccola batteria (n=6) di nuovi inibitori della polimerizzazione della tubulina, derivati del 7-fenilpirrolochinolinone (7-PPyQ). Particolarmente interessanti, in virtù della stabilità dimostrata in presenza di microsomi epatici umani sia in assenza (metabolismo idrolitico) sia in presenza di NADPH (metabolismo ossidativo), sono risultati gli N-benzoil derivati del 7-PPyQ denominati MG2718 e MG2854. Entrambi i composti sono attualmente in fase di *screening* per l'attività antineoplastica.

Un ulteriore obiettivo dell'attività svolta nell'ambito del Dottorato di Ricerca riguardava la comparazione nelle specie uomo, ratto e topo della stabilità al metabolismo ossidativo citosolico epatico di una piccola batteria di aldeidi aromatiche, rappresentate dall'*o*-vanillina, un inibitore di NFκB dotato di significativa attività antitumorale [Marton *et al.*, *Anticancer Res*, 36:5743, 2016] e alcuni suoi analoghi strutturali. Gli stessi composti sono in fase di *screening* per l'attività antineoplastica presso il *Biological Research Centre* (BRC) dell'Accademia delle Scienze Ungheresi di Szeged e il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Padova. Il progetto ha la finalità di identificare composti con attività biologica sovrapponibile o superiore all'*o*-vanillina e caratterizzati, al tempo stesso, da più elevata stabilità metabolica. I risultati sino ad ora ottenuti indicano un significativo coinvolgimento di aldeidi ossidasi (AOX) murine nel metabolismo citosolico di tutte le aldeidi aromatiche studiate e l'esistenza di profonde differenze interspecie tra l'uomo e il topo nel metabolismo di questi composti.

Infine, in collaborazione con il Centro Ricerche Aptuit di Verona e la *Molecular Modeling Section* del DSF dell'Università di Padova è stato avviato un progetto con l'obiettivo di identificare inibitori selettivi di solfotrasferasi (SULT) umane che consentano l'esecuzione di studi di fenotipizzazione di reazione. Ad oggi, infatti non vi è la disponibilità di un *panel* completo di inibitori selettivi verso singole SULT. Gli studi sino ad ora condotti hanno portato all'identificazione di due potenti inibitori delle principali SULT epatiche coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici ossia SULT1A1 e SULT1B1.

## SUMMARY

Drug metabolism studies play an important role in drug discovery and development [Foti and Dalvie, *Drug Metab Dispos*, 44: 1229, 2016]. A first aim of this work was to evaluate the reactivity of some nitrobenzoxadiazole (NBD) derivatives, namely the experimental antitumor agent 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) and its analogues MC3181 and MC2753, towards the tripeptide glutathione (GSH).

The obtained results showed that, differently from NBDHEX and MC3181, the benzoic acid ester of NBDHEX (MC2753), was stable in the presence of a physiological concentration of GSH [Fulci *et al.*, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32: 240, 2017]. Subsequent experiments, aimed at assessing the stability of MC2753 to esterases, demonstrated its high susceptibility to hydrolysis catalyzed by a human liver microsomal carboxylesterase(s). Substitution of the ester group of MC2753 with an amide group gave compound MC4351, which was stable in the presence of human liver microsomes (HLMs), and quite less reactive than NBDHEX and MC3181 towards GSH.

In the perspective of a possible repositioning of the antiprotozoal drug pyrimethamine (PYR) in the oncological field [Fang, *Cancers (Basel)*, 6:494, 2014], a study was undertaken to improve the knowledge on its metabolic fate. *In vitro* studies were therefore conducted to investigate the possible oxidation and/or glucuronidation of PYR by HLMs or rat liver microsomes (RLMs). PYR was found to be stable in the presence of uridine 5'-diphospho-glucuronic acid (UDPGA)-supplemented HLMs or RLMs. On the other hand, PYR underwent NADPH-dependent metabolism by phenobarbital-induced RLMs, as well as by HLMs from a subject receiving phenobarbital; liquid chromatography coupled to diode array detection and mass spectrometry (LC-DAD-MS) analysis indicated formation of at least three monooxygenated metabolites.

*In vitro* microsomal stability experiments were also conducted on a small panel of derivatives of the experimental tubulin polymerization inhibitor 7-phenylpyrroloquinolinone (7-PPyQ). Among the studied compounds, the N-benzoyl derivatives of 7-PPyQ named MG2718 and MG2854 are of considerable interest, due to their stability in HLMs both in the absence (hydrolytic

metabolism) and in the presence of NADPH (oxidative metabolism). Both compounds are currently being screened for antineoplastic activity.

Further trials analyzed the liver cytosolic stability of a small panel of aromatic aldehydes including *o*-vanillin, an inhibitor of NFκB with significant antitumor activity [Marton *et al.*, *Anticancer Res*, 36: 5743, 2016], and some of its structural analogues. The same compounds are currently being screened for antitumor activity at the Biological Research Center (BRC) of the Hungarian Academy of Sciences (Szeged), and at the Department of Pharmaceutical Sciences (DSF) of Padua University. The aim of the project is to identify *o*-vanillin analogues endowed with a better pharmacological profile, in terms of both anticancer efficacy and metabolic stability. The results obtained indicate a significant involvement of a murine aldehyde oxidase(s) (AOX) in the metabolism of all the studied aldehydes, and the existence of remarkable differences between human and mouse in the rate of liver cytosolic metabolism of these compounds.

Finally, a collaborative project has been recently established with the Aptuit Research Center in Verona and the Molecular Modeling Section of the DSF of Padua University, to identify form-selective inhibitors of the main human sulfotransferases (SULTs) involved in drug metabolism. The studies have led to the identification of two potent inhibitors of two major hepatic SULTs, namely SULT1A1 and SULT1B1.

# 1. INTRODUZIONE GENERALE

## *1.1 La biotrasformazione degli xenobiotici*

### *1.1.1 Generalità e importanza degli studi di biotrasformazione degli xenobiotici*

Gli organismi viventi, nel corso della loro vita, vengono continuamente in contatto con numerose sostanze esogene (quali tossine naturali, inquinanti d'origine industriale, pesticidi e farmaci) definite, nel loro insieme, xenobiotici. Per limitare gli effetti tossici di tali sostanze, cellule specializzate dell'organismo esprimono alti livelli di enzimi in grado di catalizzare la loro conversione in composti più polari e più facilmente escreti dall'organismo stesso. Tale processo si è evoluto come principale meccanismo di difesa verso sostanze estranee pericolose ed è definito biotrasformazione, o metabolismo degli xenobiotici [Kirchmair *et al.*, 2015].

Il fegato rappresenta la sede principale del metabolismo degli xenobiotici nei vertebrati, tuttavia anche in tessuti extraepatici (quali intestino tenue, rene, polmone, cute e cervello) sono presenti enzimi coinvolti in processi di biotrasformazione [Parkinson e Ogilvie, 2010]. Numerosi enzimi metabolizzanti xenobiotici sono localizzati nel doppio strato fosfolipidico delle membrane del reticolo endoplasmatico liscio, struttura largamente rappresentata negli epatociti. Tali membrane, dopo omogeneizzazione del tessuto si riorganizzano in vescicole chiamate "microsomi"; tuttavia proteine coinvolte nella biotrasformazione di xenobiotici sono presenti anche in altri compartimenti subcellulari tra cui, in particolare, il citosol [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010].

Nella maggior parte dei casi le reazioni di biotrasformazione portano alla formazione di prodotti (definiti metaboliti) privi di attività biologica significativa o comunque dotati di minore attività rispetto al composto iniziale; in tal caso si dice che lo xenobiotico è eliminato, almeno in parte, per via metabolica. Non è raro, tuttavia, ritrovare metaboliti attivi e con profilo farmacologico (in termini di potenza, efficacia terapeutica, tossicità) simile o diverso da quello del composto di origine. Infine, è possibile che l'attività di uno xenobiotico introdotto nell'organismo sia strettamente dipendente dalla sua biotrasformazione in uno o più metaboliti attivi. È chiaro, quindi, che nel caso di un composto che venga

introdotto nell'organismo al fine di ottenere un effetto terapeutico, le differenze nell'attività delle proteine coinvolte nel suo metabolismo (ad es. in seguito all'esposizione a induttori/inibitori enzimatici o all'espressione di varianti alleliche con alterata attività metabolizzante) possono essere causa di variabilità tra soggetto e soggetto (variabilità interindividuale) nell'entità della risposta terapeutica e/o nell'incidenza e gravità degli effetti tossici associati alla sua somministrazione. In particolare, nel caso di farmaci caratterizzati da una ristretta "finestra terapeutica" (ristretto intervallo tra minima concentrazione plasmatica efficace e minima concentrazione plasmatica tossica), quali gli antitumorali, piccole variazioni nei livelli plasmatici e tissutali possono tradursi in marcate alterazioni della loro attività terapeutica e/o tossicità verso l'ospite. Da queste premesse è chiaro che l'identificazione del/dei sistema/i enzimatico/i coinvolto/i nel metabolismo di un determinato farmaco e la valutazione dell'attività biologica dei suoi metaboliti è essenziale al fine di predire sia le sue possibili interazioni (in fase di biotrasformazione) con farmaci cosomministrati sia eventuali variazioni nell'entità del suo metabolismo causate dall'esistenza di un polimorfismo genetico [Parkinson e Ogilvie, 2010].

### ***1.1.2 Variabilità interspecie e variabilità legata al sesso***

Le differenze individuali nel metabolismo dei farmaci e nella farmacocinetica contribuiscono alla variabilità tra individuo e individuo che caratterizza le risposte a molti farmaci o, più in generale, a molti xenobiotici. I fattori che concorrono a determinare l'esistenza di differenze interindividuali sia sul piano qualitativo sia sul piano quantitativo nel metabolismo di un farmaco includono l'esistenza di polimorfismi genetici, il sesso, l'età, lo stato nutrizionale, la presenza di patologie, nonché l'esposizione ad altri agenti chimici di varia natura ed origine, inclusi farmaci co-somministrati [Lu e Lin, 1997; Waxman e Holloway, 2009]. In particolare, è stato stimato che i polimorfismi genetici a carico degli enzimi biotrasformanti influenzano, dal 20% al 25%, l'esito clinico di tutte le terapie farmacologiche poiché correlano con una maggiore o minore attività enzimatica. La superfamiglia del citocromo P450 (*cytochrome P450*; CYP) (vedi sezione "*Gli enzimi citocromo P450: classificazione, nomenclatura e ruolo nel metabolismo degli xenobiotici*"), infatti, si caratterizza per la presenza di molti geni polimorfi

con più di 350 varianti alleliche identificate in 57 geni umani noti. Un esempio molto studiato è rappresentato dal gene *CYP2D6*, i cui polimorfismi sono responsabili di una buona parte della variabilità del metabolismo di alcuni antidepressivi, antipsicotici, analgesici e antitumorali [Waxman e Holloway, 2009].

La biotrasformazione di uno xenobiotico può variare, sia in termini qualitativi sia quantitativi, anche in funzione del sesso dell'individuo. Differenze legate al sesso, relative alla farmacocinetica e alla farmacodinamica, sono ben descritte in letteratura e rappresentano un'importante fonte di variabilità nella risposta farmacologica. Per quanto concerne la farmacocinetica tali differenze si riflettono sulla biodisponibilità così come sulla distribuzione, metabolismo e/o escrezione [Mugford e Kedderis, 1998]. Le differenze legate al sesso relative al metabolismo costituiscono la principale componente di diversità nella farmacocinetica dei due sessi [Waxman e Holloway, 2009].

Già nel 1932 è stato osservato, nel ratto adulto, un divario tra maschi e femmine nel metabolismo dei barbiturici; in particolare si osservò che l'esobarbitale, a parità di dose somministrata, ha un effetto ipnotico di durata sensibilmente inferiore nel maschio rispetto alla femmina [Nicholas e Barron, 1932; Shapiro *et al.*, 1995]. E' oggi chiaro che le marcate differenze tra i due sessi osservate nel metabolismo di alcuni xenobiotici nella specie ratto (inclusi i barbiturici) sono dovute ad un diverso profilo di secrezione dell'ormone della crescita (*growth hormone*, GH) nei due sessi; tali differenze si traducono in una differente regolazione dell'espressione genica di alcuni enzimi biotrasformanti [Shapiro *et al.*, 1995; Mugford e Kedderis, 1998; Waxman e Holloway, 2009; Parkinson e Ogilvie, 2010]. Entrando più nello specifico, la secrezione del GH nel ratto presenta un dimorfismo sessuale; nel ratto maschio adulto, il rilascio di GH nel torrente circolatorio mostra un andamento pulsatile con picchi ogni 3,5 ore circa, senza la possibilità di rilevare GH tra un picco e l'altro. Nel ratto femmina adulto, viceversa, la secrezione del GH è più frequente e presenta livelli di ormone sempre dosabili nel plasma [Shapiro *et al.*, 1995; Waxman e Holloway, 2009]. Studi successivi condotti in vari laboratori di ricerca hanno dimostrato che nei ratti sottoposti a ipofisectomia la somministrazione di GH ad intervalli ripetuti (mimando i livelli di GH del ratto maschio) o *in continuum* (paragonabile al

profilo di GH del ratto femmina) è responsabile della diversa espressione di alcuni geni codificanti proteine CYP nei due sessi. È stato visto, inoltre, che la regolazione genica di questi enzimi di biotrasformazione si verifica a livello della trascrizione [Waxman e Holloway, 2009].

Nell'uomo la secrezione di GH è caratterizzata da un *pattern* pulsatile in entrambi i sessi, tuttavia la concentrazione di GH è più alta nel sesso femminile con una maggior frequenza di picchi rispetto agli uomini [Shapiro *et al.*, 1995].

Sebbene differenze significative sono riscontrate frequentemente in tutte le specie animali, uomo compreso, soltanto per alcune specie animali, tra le quali in particolare il ratto e alcuni ceppi di topo, sono state osservate profonde differenze legate al sesso nella velocità di biotrasformazione degli xenobiotici e nell'espressione di alcuni geni che codificano per enzimi di biotrasformazione [Lu e Lin, 1997; Shapiro *et al.*, 1995; Rinn *et al.*, 2004]. È necessario, pertanto, che i dati preclinici ottenuti *in vivo*, per valutare l'efficacia e la sicurezza di un candidato farmaco, siano interpretati sulla base di tali eventuali differenze; queste ultime possono essere messe in luce grazie a opportuni studi comparativi di biotrasformazione *in vitro*.

### ***1.1.3 Biotrasformazione dei farmaci***

Alla luce di quanto già detto, la caratterizzazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo di un nuovo potenziale farmaco, così come la determinazione della sua stabilità metabolica, l'identificazione dei principali *pathway* di biotrasformazione e la valutazione del potenziale di induzione e/o di inibizione di enzimi farmacometabolizzanti, sono di grande importanza [Kirchmair *et al.*, 2015; Foti e Dalvie, 2016]. In particolare, l'identificazione degli enzimi biotrasformanti coinvolti nel metabolismo di una nuova entità chimica aiuta a predire eventuali differenze interindividuali nella risposta legate all'esistenza di polimorfismi genetici e, al tempo stesso, permette di prevedere possibili interazioni (in fase di biotrasformazione) con altri farmaci cosomministrati [Lin e Lu, 1997; Tingle e Helsby, 2006; Kirchmair *et al.*, 2015; Bohnert *et al.*, 2016].

Attualmente, infatti, la statunitense *Food and Drug Administration* (FDA) e l'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) richiedono di valutare *in vitro* le possibili interazioni del candidato farmaco prima che siano condotti *trials* clinici

su larga scala [Bohnert *et al.*, 2016]. Durante lo studio delle eventuali interazioni del composto di interesse con altri agenti, le nuove entità chimiche in sperimentazione vengono classificate come *perpetrators*, ovvero come composti induttori o inibitori della *clearance* di un altro farmaco cosomministrato, il quale viene definito *victim* [Bohnert *et al.*, 2016].

Attualmente lo studio preclinico del metabolismo di un candidato farmaco si basa sull'esecuzione di esperimenti *in vitro* in cui vengono utilizzati materiali di origine umana quali enzimi ricombinanti, frazioni subcellulari (principalmente epatiche), epatociti in coltura o fettine di tessuto epatico. Inoltre, parallelamente, vengono effettuate le stesse analisi *in vitro* con materiale ottenuto dalle specie animali tipicamente usate durante la ricerca preclinica al fine di valutare efficacia e sicurezza dell'entità chimica considerata [Wrighton *et al.*, 1995; Tingle e Helsby, 2006]. Tali esperimenti consentono un confronto qualitativo e quantitativo dello spettro dei metaboliti prodotti nelle diverse specie animali e hanno l'obiettivo di consentire una scelta razionale della specie preclinica più idonea (in quanto caratterizzata idealmente da un profilo metabolico del candidato farmaco sovrapponibile a quella dell'uomo) in cui condurre studi di efficacia e sicurezza [Wrighton *et al.*, 1995; Lin e Lu, 1997; Tingle e Helsby, 2006].

## ***1.2 Classificazione delle reazioni di biotrasformazione***

Le reazioni di biotrasformazione degli xenobiotici, tradizionalmente, sono distinte in reazioni di fase I e di fase II [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010]. Le reazioni di fase I, dette anche di funzionalizzazione, determinano l'introduzione o lo smascheramento nel substrato di gruppi funzionali (es. ossidrilici, tiolici, amminici o carbossilici) che consentano al prodotto di reazione di andare incontro a reazioni di coniugazione (*vide infra*). Le reazioni di fase I sono mediate, principalmente, da enzimi associati alle membrane del reticolo endoplasmatico liscio appartenenti alla superfamiglia CYP. Le reazioni di fase II, dette anche "reazioni di coniugazione", prevedono generalmente la coniugazione dei prodotti di reazione di fase I con composti endogeni quali acido glucuronico, glutatione, solfato ed amminoacidi. I metaboliti ottenuti dalle reazioni di fase II sono generalmente privi di significativa attività biologica e, grazie alla notevole polarità, sono rapidamente escreti per via renale e/o biliare. Tipicamente le

reazioni di fase I precedono quelle di fase II; tuttavia alcuni composti chimici, che presentano opportuni gruppi funzionali, possono andare incontro direttamente a reazioni di fase II [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010].

Alla luce degli studi effettuati in questo lavoro di tesi, sono di seguito descritti solo alcuni fra gli enzimi di biotrasformazione coinvolti nel metabolismo dei farmaci.

### ***1.3 Gli enzimi citocromo P450***

Tra gli enzimi che intervengono nelle biotrasformazioni degli xenobiotici, la superfamiglia del citocromo P450 (CYP) riveste un ruolo di primaria importanza per l'ampio numero di xenobiotici biotrasformati. Le reazioni di fase I più frequenti, infatti, sono reazioni di ossidazione catalizzate da CYP. Questi enzimi, grazie alla presenza di un gruppo prostetico eme (complesso Fe-protoporfirina IX), sono caratterizzati dalla proprietà di formare un addotto con il monossido di carbonio che presenta un massimo assorbimento ad una lunghezza d'onda di ~450 nm (da ciò la denominazione di citocromo P450) [Quintieri 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010].

Nei mammiferi, i CYP coinvolti nella biotrasformazione degli xenobiotici si riscontrano prevalentemente nel reticolo endoplasmatico liscio (microsomi) degli epatociti e degli enterociti del tenue; si tratta, per lo più, di proteine espresse costitutivamente e suscettibili di induzione [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010]. Le reazioni più comunemente catalizzate dagli enzimi CYP sono monoossigenazioni che necessitano di ossigeno molecolare e nicotinammide dinucleotide fosfato ridotto (NADPH) portano all'incorporazione nel substrato di un atomo dell'ossigeno molecolare, mentre il secondo viene ridotto ad acqua. L'attività degli enzimi CYP è strettamente legata alla presenza nella membrana del reticolo endoplasmatico di una flavoproteina, contenente flavin mononucleotide (FMN) e flavin adenin dinucleotide (FAD), denominata NADPH-citocromo P450 reduttasi. Tale flavoproteina è fondamentale per il trasferimento di elettroni dal NADPH al gruppo prostetico eme del CYP [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010].

In base al grado di identità della sequenza amminoacidica, le proteine CYP sono suddivise in famiglie e sottofamiglie; i membri della stessa famiglia

presentano oltre il 40% di identità della sequenza amminoacidica; proteine appartenenti alla stessa sottofamiglia almeno il 55%. Il sistema di nomenclatura delle proteine CYP e dei rispettivi geni codificanti prevede l'utilizzo in sequenza di:

1. l'acronimo CYP (in minuscolo per *Drosophila* e topo);
2. un numero arabo indicante la famiglia di appartenenza;
3. una lettera maiuscola indicante la sottofamiglia (in minuscolo per *Drosophila* e topo);
4. un numero arabo indicante il singolo prodotto genico (in minuscolo per *Drosophila* e topo).

Nei mammiferi (uomo compreso) i CYP principalmente coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici appartengono alle famiglie 1, 2 e 3 [Parkinson e Ogilvie, 2010]. In virtù della loro partecipazione nel metabolismo dei farmaci, alcuni membri della sottofamiglia CYP2C (in particolare CYP2C9 e CYP2C19) e le proteine CYP2D6 e CYP3A4 sono ritenute di particolare importanza (**Fig. 1**). [Bradford, 2005; Quintieri, 2006]. Il CYP3A4, infatti, risulta essere il CYP umano più espresso nel fegato e nell'intestino tenue dell'adulto (rispettivamente circa il 30% e oltre il 70% del CYP totale), ed è coinvolto nel metabolismo di circa il 50% dei farmaci utilizzati in terapia (**Fig. 1**) [Quintieri, 2006]. Il genoma umano codifica, oltre a CYP3A4, altre tre proteine funzionali CYP3A ossia: (a) CYP3A5, espressa a livello epatico solamente nel 20% dei soggetti adulti; (b) CYP3A7, espressa costitutivamente ad alti livelli nel fegato fetale (dove rappresenta circa il 50% del CYP totale) e, a livelli apprezzabili, nel fegato di circa il 20% dei soggetti adulti; (c) CYP3A43, espressa prevalentemente in alcuni tessuti extraepatici tra cui, in particolare, il cervello, dove si ritiene possa concorrere al metabolismo *in situ* di alcuni psicofarmaci [Agarwal *et al.*, 2008].

Nel ratto sono stati identificati cinque geni CYP3A: CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18 e CYP3A23. E' interessante notare come l'espressione epatica di CYP3A2 (uno dei CYP più abbondanti nel fegato di ratto maschio), CYP3A9 e CYP3A18 vari sensibilmente in funzione dell'età e del sesso dell'animale [Kawai *et al.*, 2000]. CYP3A2 è espresso, a livello epatico, negli individui di entrambi i sessi in età prepuberale; la proteina non è, per contro, espressa nelle femmine adulte [Agrawal e Shapiro, 2001].

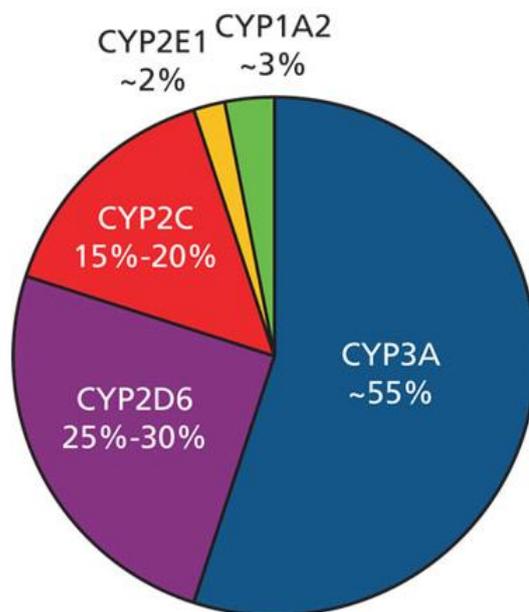


Fig. 1. Contributo relativo dei principali enzimi CYP al metabolismo dei farmaci [Bradford, 2005]

Analogamente a quanto osservato per alcune proteine CYP2C (es. CYP2C11, forma maschio-specifica), il diverso profilo plasmatico della concentrazione di GH (vedi il paragrafo “*Variabilità interspecie e variabilità legata al sesso*”) sembra giocare un ruolo chiave nel determinare la sesso-specificità dell’espressione di CYP3A2. Nello specifico, l’ipofisectomia del ratto maschio adulto provoca un incremento dei livelli della proteina, viceversa l’infusione continua di GH esogeno (al fine di mimare il profilo “femminile” delle concentrazioni plasmatiche dell’ormone) determina un calo notevole dei livelli di CYP3A2 [Shapiro *et al.*, 1995; Agrawal e Shapiro, 2001]. La mancata espressione di CYP3A2 e CYP2C11 nel fegato del ratto femmina adulto concorre a far sì che la biotrasformazione di numerosi xenobiotici avvenga molto più rapidamente negli individui di sesso maschile [Mugford e Kedderis, 1998; Quintieri *et al.*, 2008]. CYP3A9 è espresso (sulla base del rispettivo mRNA) nel fegato degli adulti di entrambi i sessi anche se più abbondantemente nelle femmine [Mahnke *et al.*, 1997]. CYP3A18 è espresso, sulla base del rispettivo mRNA, a livelli relativamente bassi nel fegato degli individui di entrambi i sessi, ma più abbondantemente nei maschi (espressione “maschio-predominante”).

Analogamente a quanto osservato con CYP3A2, nei maschi adulti l'infusione continua di GH e l'ipofisectomia determinano una riduzione dei livelli epatici dell'mRNA di *CYP3A18* [Kawai *et al.*, 2000].

Nel topo, sono stati individuati otto geni *Cyp3a*: *Cyp3a11*, *Cyp3a13*, *Cyp3a16*, *Cyp3a25*, *Cyp3a41*, *Cyp3a44*, *Cyp3a57* e *Cyp3a59* [Nelson *et al.*, 2004]. *Cyp3a11* è il gene *CYP3A* più espresso nel fegato di topo adulto di entrambe i sessi [Sakuma *et al.*, 2000]. *Cyp3a13* è espresso costitutivamente a livelli relativamente bassi nel fegato degli individui adulti di entrambi i sessi [Sakuma *et al.*, 2000 e referenze citate] e sembra essere il gene *Cyp3a* murino più espresso (sulla base del rispettivo mRNA) in organi extraepatici, incluso l'intestino tenue [Sakuma *et al.*, 2000 e referenze citate]. L'mRNA di *Cyp3a16* è espresso a livello epatico durante la vita fetale e nel periodo prepuberale, tuttavia non è più rilevabile negli individui di sesso maschile dopo la quinta settimana d'età, mostrando un'espressione specifica nella femmina adulta [Sakuma *et al.*, 2000; Renaud *et al.*, 2011]. L'mRNA di *Cyp3a25* è espresso in entrambi i sessi in diversi organi tra cui, in particolare, fegato (massimi livelli d'espressione) ed intestino tenue [Dai *et al.*, 2001]. *Cyp3a41* e *Cyp3a44* sono espressi a livello epatico prevalentemente negli individui adulti di sesso femminile [Sakuma *et al.*, 2002; Renaud *et al.*, 2011]; è interessante notare come prima della pubertà gli mRNA di *Cyp3a41* e *Cyp3a44* siano rilevabili a livelli relativamente bassi e comparabili nei due sessi [Sakuma *et al.*, 2002]. Anche in questo caso, come più volte sottolineato, il dimorfismo sessuale nell'espressione di *Cyp3a41* e *Cyp3a44* è determinato dal profilo di secrezione di GH che risulta, analogamente a quanto si osserva nel ratto, differente nei due sessi. Nel topo la secrezione di GH risulta fortemente pulsatile in entrambi i sessi; l'intervallo tra i pulsati di concentrazione plasmatica è più breve nelle femmine che nei maschi [Shapiro *et al.*, 1995].

#### ***1.4 Gli enzimi alcol deidrogenasi e aldeide deidrogenasi***

Enzimi responsabili di reazioni di ossidazione sono presenti, oltre che nella frazione microsomiale, anche nel citosol e nei mitocondri di vari tessuti. Tra gli enzimi coinvolti in reazioni di ossidazione non microsomiale, le alcol deidrogenasi (ADH) e le aldeidi deidrogenasi (ALDH) rivestono particolare

importanza nell'ossidazione di alcoli e aldeidi nei corrispondenti acidi carbossilici.

Le ADH sono enzimi contenenti zinco presenti prevalentemente nel citosol epatico, tuttavia, in minor misura, si ritrovano anche in altri tessuti in particolare rene, polmone e mucosa gastrica. Nell'uomo sono state individuate 7 ADH, appartenenti a 5 classi (I – V); gli enzimi ADH di classe I (espressi in elevate quantità nel fegato e nelle ghiandole surrenali) sono caratterizzati da una elevata affinità (bassa  $K_m$ ) per l'etanolo e intervengono nell'ossidazione di alcoli alifatici a basso peso molecolare [Parkinson e Ogilvie, 2010; Quintieri, 2006]. Le ADH di classe I umane presentano un'identità di sequenza compresa tra l'80% e l'88% con enzimi della stessa classe appartenenti a specie diverse [Edenberg e Bosron, 2010]. Le ADH di classe III mostrano il più alto grado di conservazione della sequenza amminoacidica con una identità di sequenza del 95% tra l'uomo e altre specie quali il cane, il cavallo e il coniglio, e il 93% di identità con il topo [Edenberg e Bosron, 2010]. Nonostante i meccanismi non siano ancora chiari, i dati riportati in letteratura mostrano la presenza nel ratto di un dimorfismo sessuale nell'attività ADH; in particolare, nella femmina è stata osservata un'attività enzimatica superiore almeno del 68% rispetto al maschio [Simon *et al.*, 2002; Quintanilla *et al.*, 2007]. Tale dimorfismo sessuale sembrerebbe dovuto, anche in questo caso, al diverso profilo di secrezione dell'ormone GH nei due sessi [Simon *et al.*, 2002].

Nell'uomo sono stati identificati almeno 19 diversi geni codificanti per le aldeidi deidrogenasi (ALDH), tuttavia il numero di geni *ALDH* noti varia in base alla specie da 14 (nel pollo) a 25 (in Zebrafish) [Jackson *et al.*, 2011]. Generalmente, questi enzimi svolgono un ruolo di detossificazione attraverso l'ossidazione di aldeidi aromatiche e alifatiche nei rispettivi acidi carbossilici, con l'utilizzo di  $NAD(P)^+$  come cofattore. Le ALDH umane sono raggruppate in famiglie e sottofamiglie sulla base dell'identità di sequenza; membri della stessa famiglia presentano almeno il 40% di identità di sequenza, membri appartenenti alla stessa sottofamiglia almeno il 60% [Jackson *et al.*, 2011; Koppaka *et al.*, 2012]. Nei mammiferi le ALDH sono presenti in tutti i distretti subcellulari incluso il citosol, i mitocondri, il reticolo endoplasmatico e il nucleo [Marchitti *et al.*, 2008] con elevati livelli di attività enzimatica nel fegato, seguito da rene, utero

e cervello [Koppaka *et al.*, 2012 e referenze citate]. L'espressione delle singole ALDH, nei tessuti, varia da specie a specie. Studi condotti nel ratto dimostrano come l'mRNA di ALDH1A1 sia espresso principalmente nei polmoni, nel fegato, nel rene, nel muscolo scheletrico e nel testicolo e, solo in minor misura nel cuore e nel cervello. Nel topo, invece, l'espressione proteica ALDH1A1 risulta molto elevata in testicoli, polmone, stomaco e utero e non è rilevabile in cervello, cuore e rene [Alnouti e Klaassen, 2008]. È interessante sottolineare come vi sia una marcata differenza nell'espressione di questa proteina tra ratto e topo, principalmente a livello del rene, in cui si registra un'alta espressione di ALDH1A1 nel ratto vs. assenza di proteina nel topo.

Nel fegato di ratto l'attività ALDH non è rilevabile fino a 10 giorni prima della nascita e gradualmente aumenta fino al 49° giorno di vita. Anche nel topo, come nel ratto, è stata riscontrata un'attività ALDH molto bassa nei fegati di feto con aumento graduale dopo la nascita, raggiungendo elevati livelli tra i 15 e i 45 giorni di vita [Alnouti e Klaassen, 2008].

### ***1.5 Le aldeidi ossidasi: una classe di enzimi emergente***

Le aldeidi ossidasi (*aldehyde oxidase*, AOX) sono dei molibdo-flavoenzimi citosolici che per svolgere la loro attività catalitica hanno bisogno di flavina adenina dinucleotide (FAD) e molibdoterina (*molybdenum cofactor*, MoCo) [Parkinson e Ogilvie, 2010]. Nonostante il nome possa trarre in inganno, questi enzimi sono in grado di metabolizzare un elevato numero di substrati che non si limita a composti organici contenenti una funzione aldeidica. Essi, infatti, oltre a ossidare composti aldeidici nei corrispondenti acidi carbossilici, sono in grado di catalizzare la riduzione di N-ossidi, solfossidi, nitrocomposti ed eterocicli azotati [Pryde *et al.*, 2010; Terao *et al.*, 2016].

Negli ultimi anni è aumentata l'importanza data alle AOX in quanto, nel tentativo di sviluppare composti organici che non siano substrato dei P450, sono state disegnate molecole caratterizzate da una struttura chimica con alta probabilità di essere metabolizzate da AOX [Pryde *et al.*, 2010; Garattini e Terao, 2013; Sanoh *et al.*, 2015; Terao *et al.*, 2016]. Una strategia comune per ridurre la densità elettronica di atomi di carbonio facenti parte di anelli aromatici e, di

conseguenza, sfavorirne l'ossidazione mediata da CYP, prevede la sostituzione di uno o più atomi di carbonio dell'anello aromatico con un azoto. Tuttavia, questo modo di procedere rende suscettibili gli atomi di carbonio dell'anello ad un attacco nucleofilo da parte delle AOX, principalmente in corrispondenza dei residui adiacenti all'azoto eterociclico [Garattini e Terao, 2013].

Nonostante la funzione fisiologica delle AOX nei mammiferi sia ancora relativamente oscura, gli studi condotti negli ultimi anni hanno messo in luce l'evoluzione e la struttura di questo gruppo di enzimi. Nei mammiferi le AOX sono distribuite nella maggior parte dei tessuti; in tutte le specie (uomo incluso), il fegato rappresenta il sito in cui si registra la più alta espressione e la maggiore attività catalitica [Pryde *et al.*, 2010]. I mammiferi sono caratterizzati dalla presenza di massimo 4 geni AOX che codificano per altrettanti enzimi; i due estremi sono rappresentati dall'uomo, che esprime solo AOX1, e dai roditori (ratto e topo) che ne sintetizzano 4: AOX1, AOX2 (anche conosciuta come AOX311), AOX3 e AOX4 [Garattini e Terao, 2013; Terao *et al.*, 2016]. I geni murini *Aox1*, *Aox3*, *Aox4* e *Aox311* presentano un alto grado di conservazione di esoni e introni; questa peculiarità lascia spazio all'ipotesi che questi geni abbiano avuto origine da un precursore AOX comune attraverso un processo di duplicazione genica asincrona [Garattini e Terao, 2013]. Secondo questa ipotesi, la storia dell'evoluzione di AOX nei vertebrati vedrebbe una prima fase in cui vi è un incremento specie-specifico nel numero di enzimi AOX; evento che potrebbe essere associato alla necessità di acquisire nuove funzioni fisiologiche. Seguirebbe, quindi, una seconda fase con una progressiva inattivazione specie-specifica di una o più AOX [Terao *et al.*, 2016]. La pseudogenizzazione/delezione del gene AOX3 è un evento frequente osservato in modo indipendente in varie linee di mammiferi, portando all'assenza della rispettiva proteina in molte specie. I roditori, tranne alcune eccezioni che includono la cavia, sono gli unici a possedere il gene AOX3 attivo [Garattini e Terao, 2013; Sanoh *et al.*, 2015]. Ad oggi non è ancora chiaro il motivo per il quale alcune specie siano dotate di più forme AOX attive dal punto di vista catalitico, mentre alcuni primati e l'uomo abbiano un'unica AOX. Il calo numerico di enzimi attivi potrebbe essere il risultato di una progressiva inattivazione/delezione del gene determinata dalla mancata necessità funzionale dell'enzima. Allo stesso tempo è possibile che, la

funzione esplicata nei roditori da AOX1, AOX2, AOX3 e AOX4, nell'uomo sia condensata in AOX1, come risultato di un cambiamento evolutivo. È ugualmente possibile, tuttavia, che AOX2, AOX3 e AOX4 esplicino delle funzioni specializzate in organi e tessuti dei roditori, non più utili all'uomo [Terao *et al.*, 2016].

Le informazioni disponibili sono molto ridotte per l'enzima umano AOX1 che, *bona fide*, rappresenterebbe l'ortologo del corrispondente enzima nel topo. La maggior parte di AOX1 umana è presente a livello epatico, nonostante livelli significativi di enzima siano presenti in altri distretti, quali la corticale del surrene, la ghiandola mammaria e il tessuto adiposo [Garattini e Terao, 2013; Terao *et al.*, 2016].

Nell'uomo l'espressione delle AOX è influenzata da vari fattori tra cui l'età; i neonati, infatti, (da 13 giorni fino a 4 mesi di vita) presentano un'attività epatica AOX1 molto scarsa. A partire dal 4° mese i livelli enzimatici aumentano progressivamente fino ai due anni di vita [Tayama *et al.*, 2012].

I dati relativi all'espressione proteica in funzione dell'età nel fegato di ratto e topo sono limitati; tuttavia in uno studio condotto sul ratto non è rilevabile attività enzimatica, se non a bassissimi livelli, fino alla seconda settimana dopo la nascita. Successivamente, a partire dal 14° giorno, si osserva un rapido incremento dell'attività AOX che arriva a *plateau* a 4 settimane [Tayama *et al.*, 2007]. I profili di espressione epatica di AOX1 e AOX3, correlati all'età, sono diversi in quanto esperimenti condotti sul topo dimostrano che l'espressione epatica AOX3 è più precoce. Gli embrioni di topo sono privi di mRNA AOX1 e AOX3; tuttavia, l'mRNA AOX3, e la relativa proteina, sono già presenti nell'animale al momento della nascita raggiungendo un *plateau* a 5 giorni. AOX1, invece, è presente solo negli animali adulti [Terao *et al.*, 2016].

È interessante notare come l'attività AOX nell'uomo aumenti rapidamente nel corso dei primi 2 anni di vita, mentre l'attività AOX nel ratto subisca un incremento dopo 2-3 settimane dalla nascita; questi cambiamenti sembrano coincidere in entrambe le specie con lo svezzamento. Dunque, l'assunzione di cibo solido potrebbe promuovere l'incremento dell'attività di questi enzimi, ma al momento rimane solo un'ipotesi [Tayama *et al.*, 2012].

Un altro fattore che influenza l'espressione di AOX è il sesso dell'animale; studi condotti sul topo dimostrano che il maschio ha una maggiore attività enzimatica rispetto alla femmina [Yoshinara e Tatsumi, 1997; Pryde *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2013; Terao *et al.*, 2016]. La castrazione del topo maschio provoca una riduzione di attività AOX, che viene recuperata dopo somministrazione di testosterone. La somministrazione di testosterone nei topi femmina incrementa l'attività epatica di questi enzimi, viceversa l'assunzione di estrogeni nei maschi provoca l'effetto opposto. Alla luce di questi risultati è possibile affermare che gli androgeni e gli estrogeni influenzano l'attività AOX. Ad oggi non è noto il meccanismo attraverso il quale gli ormoni sessuali siano in grado di modificare l'attività di questo gruppo di enzimi [Pryde *et al.*, 2010]. Studi condotti sull'uomo mostrano una maggiore attività enzimatica AOX1 nel maschio, tuttavia questa differenza non è risultata significativa dal punto di vista statistico [Fu *et al.*, 2013].

Nonostante l'attività di questi enzimi vari a seconda del substrato preso in esame [Pryde *et al.*, 2010], sono state riscontrate delle notevoli differenze non solo tra specie diverse, ma anche tra ceppi appartenenti alla stessa specie [Yoshinara e Tatsumi, 1997; Pryde *et al.*, 2010]. La letteratura riporta marcate differenze di attività AOX in 12 differenti ceppi di ratto; gli *Sea:SD* sono caratterizzati dalla più alta attività tra i ceppi considerati, mentre la più bassa è stata attribuita ai *WKA/Sea*. Di pari passo, sono state evidenziate differenze significative tra topi *Sprague-Dawley* e *Wistar*, così come tra *C129/C57* e *CB57BI/6J* [Pryde *et al.*, 2010].

Come già precedentemente accennato, la caratterizzazione delle varianti genetiche dell'enzima è fondamentale ai fini della valutazione dell'efficacia e della sicurezza di un nuovo farmaco. Nella popolazione umana la maggiore fonte di variabilità per l'attività di AOX1 è rappresentata dall'esistenza di varianti alleliche caratterizzate da polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) che comportano un aumento o una riduzione dell'attività catalitica dell'enzima [Romão *et al.*, 2017].

L'identificazione di un modello animale in cui condurre lo studio preclinico *in vivo* di un nuovo farmaco è uno *step* critico; per le molecole che vanno incontro a ossidazione mediata da AOX è molto difficile individuare la specie animale più

consona. È bene ribadire, infatti, che nel fegato umano è presente un unico enzima, AOX1; di contro nella maggior parte degli animali modello (topo, ratto, coniglio) le forme AOX epatiche sono due, AOX1 e AOX3. La AOX3, inoltre, rappresenta l'enzima predominante nella maggior parte dei ceppi di ratto e di topo [Garattini e Terao, 2013].

Alla luce delle conoscenze attuali le specie animali che risultano più rappresentative del profilo metabolico umano sono la cavia, la scimmia *Rhesus* e il maiale. Tutte e tre le specie sono accomunate dal possedere il gene *AOX1* attivo, e il gene *AOX3* inattivo (maiale e scimmia *Rhesus*) o deleto (cavia); sulla base di considerazioni pratiche (facilità di stabulazione) ed etiche (livello di sviluppo neurologico), idealmente, secondo Garattini e Terao, la specie animale migliore in cui condurre studi di efficacia e sicurezza *in vivo* (nel caso di composti metabolizzati principalmente via AOX) sembrerebbe essere la cavia [Garattini e Terao, 2013]. In alternativa gli stessi Autori suggeriscono di optare, come seconda scelta, per l'impiego di alcuni ceppi specifici di topo, come il *DBA2* e il *CBA*, che presentano un silenziamento epigenetico di *Aox3* [Garattini e Terao, 2013].

## 1.6 Le solfotrasferasi

Xenobiotici e loro metaboliti a struttura alcolica, fenolica e più raramente amminica possono andare incontro, oltre che a coniugazione con acido glucuronico, anche a reazioni di solfonazione (o solfoconiugazione) che implicano il trasferimento al substrato di un gruppo solfonato ( $\text{SO}_3^-$ ) (**Fig. 2**) [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010]. Tali reazioni sono catalizzate da enzimi citosolici appartenenti alla superfamiglia delle solfotrasferasi (*sulfotransferase*, *SULT*) e richiedono il cofattore 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato (3'-*phosphoadenosine 5'-phosphosulfate*; *PAPS*) [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010].

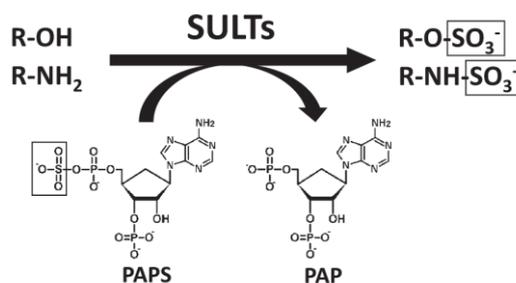


Fig. 2. Schema generale di una reazione di solfonazione mediata da SULT.

Nei vertebrati la biosintesi del PAPS si realizza nel citosol a partire da ATP e anione solfato ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) grazie all'intervento dell'enzima PAPS sintetasi (PAPSS) [Venkatachalam, 2003] che possiede sia attività ATP-solforilasi sia attività APS-fosfochinasi [Coughtrie, 2016]. La prima dimostrazione di una reazione di solfonazione in un sistema biologico risale al 1876, anno in cui il chimico tedesco Eugen Baumann riuscì a dimostrare la presenza di fenolo solfato nelle urine di un paziente a cui era stato somministrato l'acido carbolico (fenolo) come antisettico [Gamage *et al.*, 2006; Ma e Schrag, 2012; Suiko *et al.*, 2017]. Generalmente le reazioni di solfonazione portano alla formazione di metaboliti privi di significativa attività biologica e caratterizzati da una elevata idrosolubilità, caratteristica, quest'ultima, che ne consente una rapida escrezione urinaria e/o biliare. Esistono, tuttavia, alcuni esempi di metaboliti di xenobiotici frutto di reazione di solfonazione dotati di una significativa attività biologica; in particolare numerose ammine aromatiche danno origine a solfoconiugati instabili dalla cui decomposizione si ottengono specie elettrofile altamente reattive, mutagene e cancerogene [Gamage *et al.*, 2006; Coughtrie, 2016]. Come già accennato, le SULT coinvolte nel metabolismo di xenobiotici e sostanze endogene a basso peso molecolare hanno localizzazione citosolica. È nota, inoltre, l'esistenza di SULT associate alle membrane dell'apparato di Golgi responsabili della solfonazione di macromolecole endogene rappresentate da peptidi, proteine, lipidi e peptidoglicani [Gamage *et al.*, 2006; Suiko *et al.*, 2017].

In passato le SULT erano suddivise in 3 categorie sulla base della specificità di substrato: (1) le fenolo-SULT (SULT1A1/2/3; SULT1B1; SULT1C1/2) che metabolizzano principalmente fenoli endogeni (catecolammine) o esogeni (es. paracetamolo, naftolo); (2) le estrogeno-SULT (SULT1E1) coinvolte, fra l'altro, nel metabolismo di ormoni steroidei; (3) le idrossisteroide-SULT (SULT2A1, SULT2B1) coinvolte, oltre che nel metabolismo di xenobiotici, anche nella biotrasformazione di ormoni steroidei e acidi biliari [Dunn e Klaassen, 1998]. Tuttavia, questa classificazione poteva creare confusione a causa della mancanza di una stretta specificità di substrato [Dunn e Klaassen, 1998 e referenze citate]. Pertanto, in analogia ai CYP e alle UGT, le SULT citosoliche sono state successivamente distinte in famiglie e sottofamiglie sulla base del grado di identità della sequenza amminoacidica. I membri di una stessa famiglia

presentano un'identità di sequenza almeno del 45%, mentre enzimi appartenenti alla stessa sottofamiglia oltre il 60% [Blanchard *et al.*, 2004; Gamage *et al.*, 2006].

Il sistema di nomenclatura adottato per tali enzimi prevede l'utilizzo dell'acronimo SULT seguito da un numero arabo indicante la famiglia di appartenenza; una lettera maiuscola indicante la sottofamiglia e un numero arabo indicante il singolo prodotto genico [Blanchard *et al.*, 2004]. Nell'uomo, ad oggi, sono state identificate 14 SULT citosoliche ripartite in quattro famiglie: SULT1, SULT2, SULT4 e SULT6 [Martó *et al.*, 2017]; è noto che questi enzimi sono caratterizzati da una elevata variabilità relativamente al *pattern* di espressione nei diversi tessuti e in relazione all'età considerata [Riches *et al.*, 2009]. Sulla base delle attuali conoscenze, le SULT più frequentemente coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici sono SULT1A1, SULT1A3, SULT1B1, SULT1E1 e SULT2A1 [Riches *et al.*, 2009; Martó *et al.*, 2017].

Nell'uomo gli organi caratterizzati da livelli più elevati di SULT sono il fegato, l'intestino tenue, il rene e il polmone. Come mostrato in **Fig. 3**, SULT1A1 presenta la maggiore concentrazione a livello epatico (53% del quantitativo totale SULT), seguita da SULT2A1 (27%), 1B1 (14%) e 1E1 (6%) [Riches *et al.*, 2009; James e Ambadapadi, 2013]. E' interessante notare la mancata espressione di SULT1E1 a livello renale e della SULT1A3 a livello epatico.

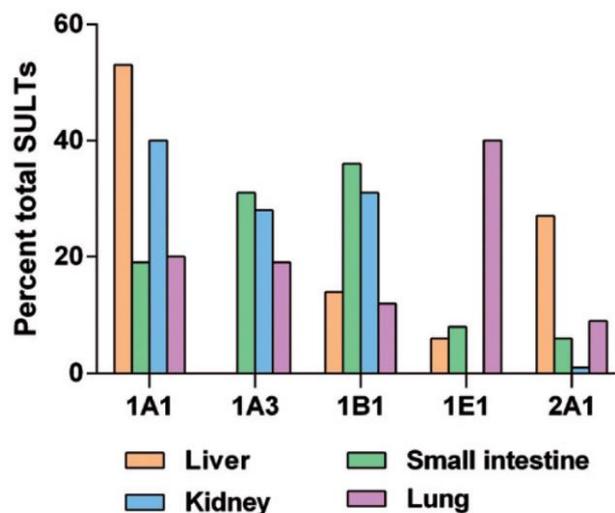


Fig. 3. Distribuzione tessutale delle principali SULT citosoliche umane [James e Ambadapadi, 2013].

Nell'uomo non sono state trovate differenze significative nell'espressione enzimatica SULT né tra citosol provenienti dai donatori dei due sessi né correlate all'età [Riches *et al.*, 2009].

Visto il coinvolgimento delle SULT nel metabolismo di vari xenobiotici, è utile identificare l'esistenza di eventuali differenze interspecie e in relazione al sesso nell'attività di questi enzimi [Coughtrie, 2016]. A questo riguardo è oggi chiaro che nei roditori da laboratorio, a differenza di quanto accade nell'uomo, gli enzimi SULT maggiormente espressi a livello epatico sono SULT1B1 e membri della sottofamiglia SULT1C. Questi ultimi intervengono, nel ratto, nel metabolismo di numerosi procancerogeni noti (es. idrossilammine aromatiche) conferendo a questa specie un'attività solfotrasferasica (nei confronti dei substrati citati) notevolmente più alta di quella osservata nell'uomo [Meerman *et al.*, 1994; Coughtrie, 2016]. Nel ratto, inoltre, l'espressione della maggior parte delle SULT nei tessuti extraepatici, incluso l'intestino tenue (tessuto che nell'uomo esprime livelli relativamente elevati di SULT), è estremamente bassa [Dunn e Klaassen, 1998; Coughtrie, 2016]. E' altresì noto che nel ratto maschio l'espressione epatica degli enzimi di SULT1A1 e SULT1C1 è nettamente superiore che nella femmina (rispettivamente circa due e dieci volte) [Coughtrie, 2016].

A differenza di quanto accade per le UDP-glucuronosiltrasferasi (UGT) che sono espresse in modo modesto nel fegato fetale nei primi giorni di vita extrauterina, le SULT sono presenti già ad elevati livelli nelle prime ore di vita extrauterina [Suiko *et al.*, 2017] e costituiscono gli enzimi primari per la protezione dell'organismo dalla tossicità di xenobiotici provenienti dal sangue materno durante lo sviluppo fetale e nella fase neonatale [Duanmu *et al.*, 2006; Suiko *et al.*, 2017]. È interessante notare come la SULT1B1 sia molto espressa sia nell'intestino fetale sia nell'intestino dell'adulto; viceversa alla modesta espressione epatica dell'enzima nel feto, si contrappone un elevato livello della proteina nel fegato adulto. Di contro, alcuni membri della sottofamiglia SULT1C (es. SULT1C2, SULT1C4) presentano una maggiore espressione nel feto rispetto all'adulto in vari distretti (es. intestino, rene, polmone) [Suiko *et al.*, 2017].

Diversi studi hanno dimostrato che sostanze frequentemente ingerite con la dieta inibiscono l'attività di alcune SULT; è noto, infatti, che numerosi polifenoli naturali contenuti in molti cibi e bevande (es. vino, cioccolato, alcune verdure e

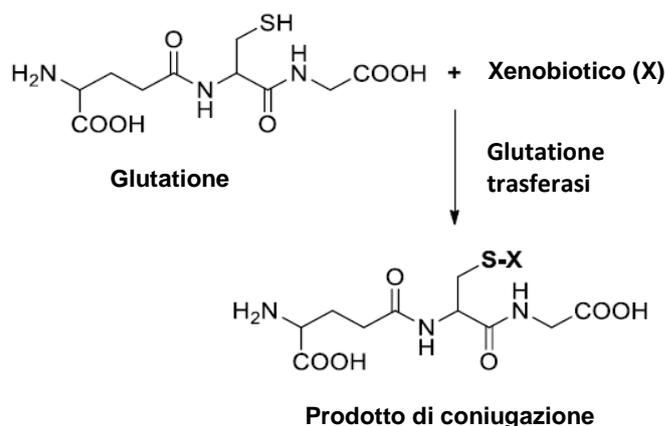
determinati succhi di frutta) sono inibitori potenti di SULT1A1 e SULT1A3 [James e Ambadapadi, 2013 e referenze citate]. Al pari dei CYP e delle UGT, anche le SULT presentano alterazioni dell'attività enzimatica, legati alla presenza di SNPs [Hebbring *et al.*, 2007; Nagar *et al.*, 2006]. I polimorfismi di SULT maggiormente studiati sono quelli del gene *SULT1A1* di cui sono note tre varianti alleliche, *SULT1A1\*1* (*wild type*), \*2 e \*3 [Nagar *et al.*, 2006; Marto *et al.*, 2017]. L'allele *SULT1A1\*2*, variante più comune dopo l'allele *wild type*, presenta una mutazione puntiforme (G→A) nella regione codificante, in corrispondenza del nucleotide 638, associata ad una riduzione dell'attività enzimatica [Nagar *et al.*, 2006; Ma e Schrag, 2012]. La frequenza allelica di *SULT1A1\*1* e *SULT1A1\*2* nella popolazione caucasica e africana è simile [Ma e Schrag, 2012; Marto *et al.*, 2017]; di contro, la variante \*3 (A667G) è comune nella popolazione afro-americana ma rara nei caucasici e praticamente assente in altre etnie [Ma e Schrag, 2012]. Nonostante questi SNP siano stati associati ad una significativa riduzione dell'attività enzimatica *in vitro*, questi risultati non sempre vengono confermati *in vivo*. Tale apparente incongruenza tra dati *in vitro* e *in vivo* è giustificata dalla presenza nella popolazione afro-americana di variazioni nel numero di copie del gene *SULT1A1*, fenomeno noto come *Copy Number Variation* (CNV) [Hebbring *et al.*, 2007; Marto *et al.*, 2017]. Lo studio condotto da Hebbring nel 2007 mostra come ben il 63% degli afro-americani, contro il solo 26% dei caucasici, possieda più di due alleli del gene in questione [Hebbring *et al.*, 2007; Marto *et al.*, 2017].

### ***1.7 Le glutazione trasferasi: generalità e ruolo in ambito oncologico***

La superfamiglia delle glutazione trasferasi, note anche come glutazione S-trasferasi (da cui l'acronimo, ancor oggi ampiamente usato, GST), è espressa nella maggior parte degli organismi viventi. Questi enzimi sono noti principalmente per il loro ruolo nella biotrasformazione e detossificazione di numerosi xenobiotici e sostanze endogene, mediante la loro coniugazione con il tripeptide glutazione ridotto (GSH) (**Fig. 4**). I substrati delle GST sono, principalmente, composti idrofobici caratterizzati dalla presenza di un atomo elettrofilo in grado di subire un attacco nucleofilo da parte dell'anione tiolato derivante dalla ionizzazione gruppo sulfidrilico del GSH [Ruzza *et al.*, 2009; Allocati *et al.*, 2018].

Sulla base della localizzazione subcellulare, le GST eucariotiche sono suddivise in citosoliche (le più abbondanti), mitocondriali e microsomiali. Le GST citosoliche e mitocondriali sono proteine solubili caratterizzate da un'evidente somiglianza nella struttura tridimensionale; queste catalizzano la maggior parte delle reazioni di coniugazione con GSH. Le GST microsomiali (note come MAPEG, *membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*), viceversa, sono coinvolte principalmente nella biosintesi e nel metabolismo di prostanoidi e leucotrieni [Ruzza *et al.*, 2009]. Nei mammiferi le GST citosoliche sono state suddivise in sette classi in virtù di vari criteri, tra cui il grado d'identità della sequenza amminoacidica, la specificità di substrato e l'immunoreattività. Tali classi vengono indicate dalle lettere greche  $\alpha$  (alfa),  $\mu$  (mu),  $\pi$  (pi),  $\sigma$  (sigma),  $\theta$  (theta),  $\omega$  (omega) e  $\zeta$  (zeta) e abbreviate con le lettere dell'alfabeto romano: A, M, P, S, T, O e Z. Altre classi di GST citosoliche quali B (beta), D (delta), L (lambda), F (Phi) e T (tau) sono state identificate in specie diverse dai mammiferi, inclusi piante e batteri. Membri della stessa classe presentano un'identità della sequenza amminoacidica maggiore del 60%, membri di classi diverse meno del 30%.

Il sistema di nomenclatura attuale prevede l'uso dell'acronimo GST seguito da una lettera dell'alfabeto romano (corrispondente alla classe di appartenenza) e da un numero arabo indicante la composizione in subunità [Ruzza *et al.*, 2009; Laborde, 2010].



**Fig. 4. Reazione di coniugazione catalizzata da glutathione trasferasi** [modificata da Townsend e Tew, 2003].

Di recente, grazie alla cristallografia a raggi X, è stata risolta la struttura tridimensionale di varie GST solubili. Ogni GST contiene un sito attivo in grado

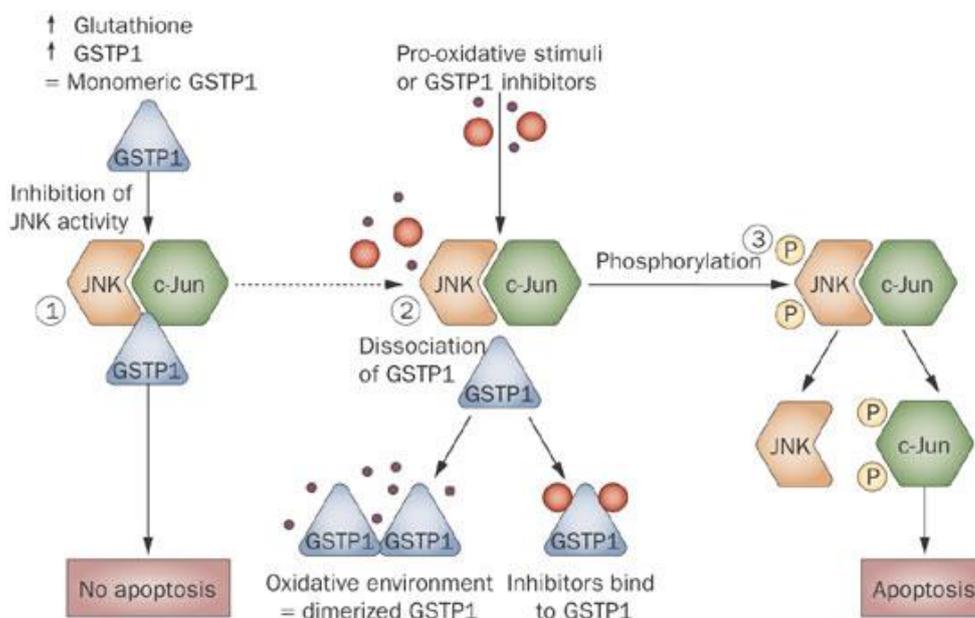
di legare il GSH (sito G) e un sito di legame per i substrati (sito H). Inoltre, ogni subunità è composta da un dominio N-terminale, che comprende gran parte del sito G ed è abbastanza conservato tra le diverse classi, e da un dominio C-terminale (variabile tra le classi) che forma gran parte del sito H [Ruzza *et al.*, 2009].

Come accennato in precedenza, le GST agiscono come enzimi di detossificazione e i prodotti delle reazioni di coniugazione con GSH sono, nella maggior parte dei casi, meno reattivi dei composti di partenza. Generalmente, i prodotti di coniugazione con GSH sono estrusi dalla cellula mediante l'intervento di trasportatori di efflusso della superfamiglia ABC, in particolare dalle proteine *multidrug resistance-related protein* (MRP)1 e MRP2 [Hayes e Pulford, 1995; Hayes *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009; Keppler, 1999]. Una volta estrusi nei fluidi extracellulari, i coniugati del GSH sono generalmente metabolizzati attraverso la via degli acidi mercapturici che conduce alla formazione di metaboliti (acidi mercapturici) escreti con le urine e la bile. La coniugazione con GSH rappresenta il primo *step* nella sintesi degli acidi mercapturici (coniugati della N-acetil cisteina), a seguire vi è l'intervento in sequenza degli ectoenzimi  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasi ( $\gamma$ -GT), cisteinil-glicinasi (di peptidasi) e di N-acetiltrasferasi intracellulari [Hayes e Pulford, 1995; Hayes *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009].

Studi recenti hanno dimostrato come alcune GST, in particolare la GSTM1-1 e la GSTP1-1, siano coinvolte nella regolazione dell'apoptosi mediante l'interazione con le *mitogen activated protein* (MAP) chinasi. In particolare GSTP1-1 rappresenta un modulatore dell'attività della proteina *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK), con la quale forma un complesso cataliticamente inattivo. JNK, membro della famiglia delle *mitogen activated protein kinases* (MAPK), è coinvolta nella regolazione di vari processi cellulari, fra cui l'apoptosi, in risposta a stimoli che determinano una condizione di *stress* ossidativo (**Fig. 5**) [Adler *et al.*, 1999; Ruzza *et al.*, 2009; Laborde, 2010; Allocati *et al.*, 2018]. In assenza di stimoli legati allo *stress*, JNK esercita un'attività basale modesta; viceversa, l'esposizione a radiazioni ultraviolette, o ad agenti chimici che causino *stress* ossidativo, provoca un aumento dell'attività di JNK, conseguente alla dissociazione del complesso con GSTP1 [Adler *et al.*, 1999; Ruzza *et al.*, 2009;

Laborde, 2010; Allocati *et al.*, 2018]. Vi sono pareri contrastanti riguardo la forma, se monomeric [Adler *et al.*, 1999] o dimerica [Gildenhuis *et al.*, 2010], interagente con JNK.

Recentemente è stata dimostrata l'associazione di GSTP1-1 con il *tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 2 (TRAF2)*, proteina adattatrice responsabile della trasduzione del segnale del recettore TNF-1. Tale associazione inibisce l'interazione di TRAF2 con la MAP chinasi chinasi *apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)* e, di conseguenza, la morte cellulare innescata dalla stimolazione di TNF-1 [De Luca *et al.*, 2015]. E' stata osservata, inoltre, anche un'interazione di GSTM1-1 con la MAP chinasi ASK1, con inibizione dell'attività della chinasi [Ruzza *et al.*, 2009].



**Fig. 5. Ruolo della proteina GSTP1 nel controllo dell'apoptosi.** Livelli intracellulari elevati di GSH e l'assenza di *stress* ossidativo promuovono l'esistenza della GSTP in forma monomeric, la quale lega il complesso JNK-c-Jun, inibendo la sua funzione pro-apoptotica (1). In condizioni di *stress* ossidativo o in presenza di inibitori della GSTP1, quest'ultima è rilasciata dal complesso JNK-c-Jun (2); ciò consente la fosforilazione di JNK (3) e la successiva fosforilazione, da parte di quest'ultima, di c-Jun, evento che conduce all'apoptosi [Simic *et al.*, 2009].

Numerosi studi hanno dimostrato come varie linee cellulari tumorali umane selezionate *in vitro* per la resistenza a vari farmaci citotossici, sovraesprimano alcune GST tra cui, in particolare, la GSTP1-1; un'elevata espressione di tale proteina è stata inoltre riscontrata in biopsie tumorali ottenute da pazienti non

sottoposti a trattamento chemioterapico [Ruzza *et al.*, 2009; Allocati *et al.*, 2018] La sovraespressione di GSTP1-1 è considerata oggi un *marker* di sviluppo tumorale ed è stata associata a resistenza ad agenti antitumorali [Ruzza *et al.*, 2009; Laborde, 2010; Sau *et al.*, 2010, e referenze ivi contenute]. Elevati livelli cellulari di GSTP1-1, infatti, sono stati associati ad un aumento della proliferazione cellulare [Aliya *et al.*, 2003]. Inoltre è stato osservato che anche alcuni trasportatori di efflusso appartenenti alla superfamiglia *ATP-binding cassette* (ABC), responsabili dell'estrusione di numerosi farmaci citotossici dalla cellula, sono spesso sovraespressi nei tumori, ed alcuni studi hanno dimostrato l'esistenza di una cooperazione tra enzimi di fase II (tra cui le GST) e tali trasportatori nel conferimento della resistenza a molteplici agenti antitumorali [Ruzza *et al.*, 2009].

La sovraespressione di GST può indurre resistenza a farmaci citotossici tramite: a) la coniugazione di tali farmaci (qualora essi siano substrato di GST) con GSH, con conseguente inattivazione ed allontanamento dalla cellula tramite trasportatori di efflusso della superfamiglia ABC, in particolare MRP1 e MRP2; b) l'inibizione, come descritto in precedenza, di MAPK (in particolare JNK) e del *signaling* apoptotico mediato da queste [Ruzza *et al.*, 2009; Laborde, 2010].



## 2. CONTESTO E SCOPO DEL LAVORO

L'attività svolta nel corso del Dottorato di Ricerca è stata incentrata sulla valutazione della stabilità metabolica e sulla caratterizzazione preclinica *in vitro* di *lead* e candidati farmaci antitumorali. L'identificazione del sistema enzimatico coinvolto nel metabolismo di un determinato farmaco, nonché l'individuazione dei metaboliti, sono essenziali al fine di predire sia le possibili interazioni con farmaci cosomministrati, sia eventuali variazioni nell'entità del metabolismo causate dall'esistenza di un polimorfismo genetico. Differenze significative nella biotrasformazione dei farmaci sono frequentemente riscontrate tra specie animali diverse, ed è dunque necessario che i risultati di studi preclinici di efficacia e sicurezza *in vivo* siano interpretati precocemente alla luce di tali eventuali differenze, evidenziate da opportuni studi comparativi di biotrasformazione *in vitro*.

In particolare, l'attività di ricerca, basata su studi *in vitro*, si proponeva di:

- 1) completare lo studio del destino metabolico del 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esano (NBDHEX) e del suo analogo strutturale MC3181. NBDHEX e MC3181 sono candidati farmaci ad attività antitumorale progettati e sintetizzati dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Anna Maria Caccuri (Università di Roma "Tor Vergata");
- 2) approfondire il metabolismo epatico di un noto farmaco ad attività antiprotozoaria, la pirimetamina (PYR), il cui impiego, sulla base di recenti studi potrebbe essere allargato al trattamento di alcune neoplasie;
- 3) ottenere informazioni circa la stabilità al metabolismo ossidativo microsomiale epatico di alcuni derivati del fenil pirrolo chinolinone (PPyQ). Alcuni membri di tale classe di composti, progettati e sintetizzati dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Ferlin (DSF, Università di Padova) presentano in modelli *in vitro* e *in vivo* una spiccata attività antineoplastica;
- 4) valutare la stabilità metabolica (con particolare attenzione al metabolismo ossidativo citosolico) di alcune aldeidi aromatiche rappresentate dalla *o*-vanillina, un inibitore dell'attività NFkB dotato di

significativa attività antitumorale, studiato recentemente nel nostro laboratorio in collaborazione con il gruppo di ricerca diretto dal Dott. Csaba Vizler (Biological Research Centre, Szèged, Ungheria) [Marton *et al.*, 2016] e da alcuni suoi analoghi strutturali. Si tratta di composti la cui attività antineoplastica e antinfiammatoria è oggetto di studio nei laboratori dei Proff. Nicola Ferri e Morena Zusso (DSF, Università di Padova).

Nel corso del mio internato di Dottorato di Ricerca sono stata inoltre coinvolta in uno studio, svolto in collaborazione con ricercatori del Centro Ricerche Aptuit Srl di Verona e con il gruppo di ricerca diretto dal Prof. Stefano Moro (DSF, Università di Padova), il cui obiettivo è l'identificazione di inibitori selettivi di SULT umane; si tratta di composti che potrebbero rivelarsi utili *tools* per l'identificazione delle SULT coinvolte nel metabolismo di entità chimiche di interesse farmacologico o tossicologico.

## 3. NBDHEX E IL SUO ANALOGO STRUTTURALE MC3181

### 3.1 INTRODUZIONE

#### 3.1.1 Inibitori di GSTP1-1

Alla luce di quanto detto (si veda il paragrafo “*Le glutatione trasferasi: generalità e ruolo in ambito oncologico*”), le GST rappresentano un promettente bersaglio farmacologico per il trattamento di tumori farmacoresistenti. In particolare una delle strategie potenzialmente adottabili potrebbe essere rappresentata dalla cosomministrazione di inibitori dell’attività coniugativa di GST con farmaci antineoplastici convenzionali, inattivati tramite coniugazione con GSH, così da aumentarne l’efficacia. D’altra parte l’alternativa potrebbe essere l’uso, anche in monoterapia, di composti in grado di bloccare l’interazione tra GST e proteine del *pathway* delle MAP chinasi, al fine di innescare uno stimolo apoptotico. Infine, ma non da ultimo, si potrebbe trarre beneficio dalla sovraespressione di alcune GST (in particolare la GSTP1-1) nelle cellule tumorali attraverso l’impiego di profarmaci, substrato di GST, metabolizzati in prodotti citotossici [Ruzza *et al.*, 2009].

Nel corso degli anni sono stati identificati e studiati diversi inibitori di GST; molti di essi sono analoghi strutturali del GSH (generalmente indicati come “analoghi peptidomimetici”) in grado di competere con quest’ultimo per il legame al sito G [Ruzza *et al.*, 2009; Laborde, 2010]. Un importante limite riscontrato nella maggior parte degli inibitori sino ad ora studiati è rappresentato dalla loro rapida estrusione dalla cellula mediante l’intervento di trasportatori della superfamiglia ABC, evento che contribuisce a limitarne l’interazione con le proteine bersaglio (GST) e quindi l’efficacia terapeutica [Keppler *et al.*, 1999].

Gli analoghi peptidomimetici del GSH non costituiscono l’unica tipologia di inibitori di GST; l’attività delle GST, infatti, può essere inibita anche da composti che interagiscono con regioni della proteina distinti dal sito G. Un esempio in tal senso è rappresentato dall’acido etacrinico (EA), registrato per uso clinico come diuretico. EA riduce l’attività coniugativa delle GST di classe A, M e P legandosi covalentemente al sito H. Diversi studi hanno dimostrato che EA è in grado di

potenziare gli effetti citotossici del clorambucile in linee cellulari umane di carcinoma del colon e di potenziare l'efficacia del melfalan in topi portatori di carcinoma del colon umano. Nonostante questi risultati, nella pratica clinica l'utilizzo dell'EA come chemiosensibilizzante, è limitato a causa delle sue marcate proprietà diuretiche e per la mancata specificità d'azione su determinate forme GST [Ruzza *et al.*, 2009; Sau *et al.*, 2010]. Tra i gruppi di ricerca coinvolti nello sviluppo di nuovi inibitori di GSTP1-1 vi è quello coordinato dalla Prof.ssa Anna Maria Caccuri (Università di Roma "Tor Vergata"), a cui si deve il disegno e la preparazione di inibitori non peptidomimetici derivati dal 7-nitro-2,1,3-benzossadiazolo (NBD) [Ricci *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009; Dalzoppo *et al.*, 2017]. Il 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esano (NBDHEX) ed il suo analogo MC3181, oggetto di questo lavoro di tesi, sono entrambi in fase avanzata di valutazione preclinica come possibili farmaci antitumorali.

### 3.1.2 NBDHEX e MC3181

Verso la metà degli anni '90 il gruppo di ricerca guidato dalla Prof.ssa A. M. Caccuri ha progettato e sintetizzato una piccola batteria di derivati dell'NBD, a partire dal 4-cloro-7-nitrobenzofurazano [Caccuri *et al.*, 1996; Ricci *et al.*, 2005]. Quattro dei cinque composti sintetizzati si sono rivelati, *in vitro*, potenti inibitori dell'attività coniugativa delle GST, con valori di IC<sub>50</sub> nel *range* del nanomolare per GSTM2-2 e nel *range* del micromolare per GSTP1-1 e GSTA1-1. Tra tutti i composti presi in esame, l'NBDHEX (ottenuto per sostituzione del cloro, in posizione 4 del 4-cloro-7-nitrobenzofurazano, con una catena alifatica mercaptoesanolica) (**Fig. 6**) è stato indicato come il composto più interessante. Esso, infatti, mostra, tra i cinque composti studiati, la più elevata capacità inibitoria nei confronti della GSTP1-1 che, come già ribadito, è sovraespressa nella maggior parte dei tumori umani. L'NBDHEX si caratterizza per una selettività d'azione per la GSTM2-2 (IC<sub>50</sub> ≤ 0,01 μM) e, in minor misura, per GSTP1-1 (IC<sub>50</sub> = 0,8 μM) vs. GSTA1-1 (IC<sub>50</sub> pari a circa 25 μM) [Ricci *et al.*, 2005]. L'alta affinità dell'NBDHEX per alcune GST è attribuibile alla presenza dell'atomo di zolfo (legato al C4) e alla sua catena esanolica. A conferma di quanto detto, infatti, la sostituzione dell'atomo di zolfo con un atomo di azoto

comporta una riduzione significativa dell'attività inibitoria nei confronti dell'attività GST [Ricci *et al.*, 2005].

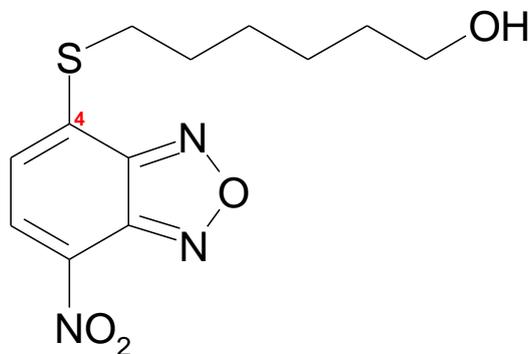
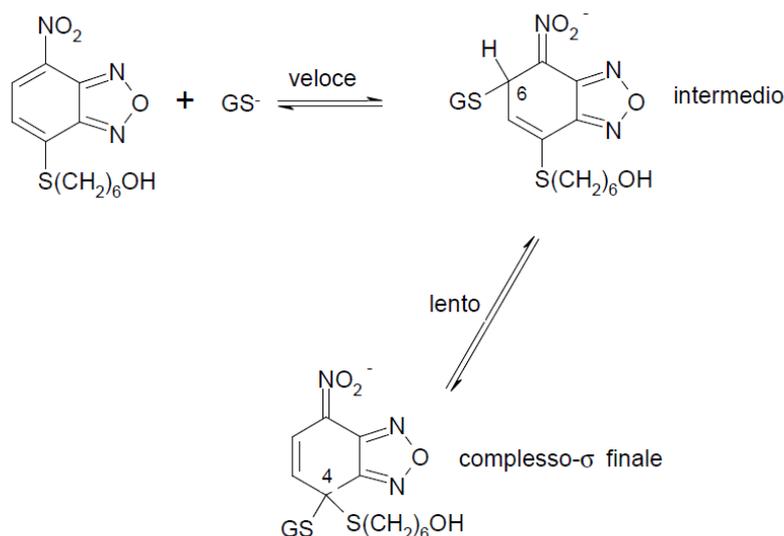


Fig. 6. Formula di struttura del 6-(7-nitro-2,1,3-benzosadiazol-4-iltio)esanoles.

Studi relativi al meccanismo d'azione hanno dimostrato come l'NBDHEX agisca da *mechanism-based inhibitor* di GST. Esso si lega infatti al sito H delle GST, subisce l'attacco nucleofilo da parte del GSH in corrispondenza del C4 dell'anello benzosadiazolico, e forma un intermedio di reazione chiamato "complesso  $\sigma$ " (o complesso di Meisenheimer). Tale complesso è stabilizzato nel sito attivo dell'enzima da parte di entrambi i siti (G e H), e si ritiene costituisca la vera specie inibente l'attività catalitica. Il meccanismo proposto per la formazione del complesso  $\sigma$  nel sito attivo della GSTP1-1 è riportato in **Fig. 7** [Ricci *et al.*, 2005; Federici *et al.*, 2009]. Analisi riguardanti il meccanismo di morte cellulare indotta da NBDHEX hanno evidenziato come tale composto, legandosi alla GSTP1-1, provochi la dissociazione dell'enzima da JNK, con conseguente attivazione del *pathway* apoptotico controllato dalla chinasi stessa (vedi: "*Le glutatione trasferasi: generalità e ruolo in ambito oncologico*") [Ricci *et al.*, 2005]. L'NBDHEX, a concentrazioni nell'intervallo submicromolare/basso micromolare dimostra citotossicità nei confronti di linee cellulari tumorali di varia origine [Pasello *et al.*, 2011], tra cui linee sovraespressanti trasportatori di membrana della superfamiglia ABC (glicoproteina P e MRP1) [Turella *et al.*, 2006; Filomeni *et al.*, 2008; Ascione *et al.*, 2009]. Inoltre, l'NBDHEX si è dimostrato, a dosi non tossiche, un agente antitumorale efficace in vari modelli murini di tumore umano [Pasello *et al.*, 2011].

L’NBDHEX è un composto a basso peso molecolare (297 Da) caratterizzato da elevata idrofobicità. Tale caratteristica ne agevola l’ingresso nella cellula ma, al tempo stesso, ne ostacola la solubilità in veicoli acquosi rendendo più complessa, da un punto di vista formulativo, la somministrazione *in vivo*.



**Fig. 7. Meccanismo di formazione del complesso  $\sigma$  nel sito attivo della GSTP1-1: rapida formazione di un pre-complesso con lo zolfo del GSH legato al C6 del benzossadiazolo dell’NBDHEX, quindi lenta evoluzione verso il complesso  $\sigma$  finale con lo zolfo legato al C4 del benzossadiazolo [modificata da Federici *et al.*, 2009].**

Nel tentativo di superare questo limite, il gruppo di ricerca della Prof.ssa Caccuri ha recentemente sintetizzato alcuni analoghi strutturali dell’NBDHEX, caratterizzati da una maggiore idrosolubilità. Uno di questi è l’MC3181 che, a differenza dell’NBDHEX, presenta due atomi di ossigeno inseriti nella catena idrossiesilica laterale (**Fig. 8**). L’MC3181 è un inibitore potente dell’attività coniugativa di GSTM2-2 e GSTP1-1 ( $IC_{50}$  pari rispettivamente a 0,081 e 2,6  $\mu M$ ) e al tempo stesso, rispetto all’NBDHEX, è ancor più selettivo per la GSTP1-1.

L’MC3181, come l’NBDHEX, possiede una significativa attività antitumorale sia *in vitro* (valori di  $IC_{50}$  nel range del basso micromolare), sia in topi portatori di melanoma umano, dopo somministrazione per via orale o endovenosa in veicolo completamente acquoso [De Luca A. *et al.*, 2015]. Sulla base delle considerazioni

sopra esposte, l’NBDHEX ed il suo analogo strutturale MC3181 rappresentano dei promettenti agenti per il trattamento dei tumori umani.

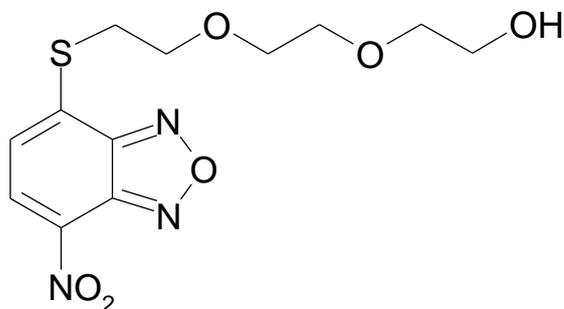


Fig. 8. Formula di struttura di MC3181.

Ad oggi sono in corso studi sia per la valutazione della potenziale attività terapeutica e tossicità di tali composti sia per la caratterizzazione della farmacocinetica, con particolare attenzione alla loro possibile biotrasformazione. L’analisi della stabilità metabolica di un nuovo candidato farmaco è una fase importante, dal momento che tale fattore può condizionarne la biodisponibilità ed i profili di attività biologica e di tossicità, così come può consentire di valutare il potenziale di interazione dell’entità chimica studiata con altri composti eventualmente cosomministrati (vedi “*La biotrasformazione degli xenobiotici*”).



## 3.2 MATERIALI E METODI

### 3.2.1 Reagenti

L'acqua ultrapura con cui sono stati preparati tutti i tamponi e le soluzioni acquose utilizzate nel presente lavoro di tesi è stata ottenuta tramite un apparecchio *PureLab Option-Q* (Elga LabWater, High Wycombe, UK).

I composti 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esano (NBDHEX), MC3181, MC2753 e MC4351 sono stati forniti dalla Prof.ssa Anna Maria Caccuri (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata").

Il prodotto di coniugazione dell'NBDHEX e dell'MC3181 con GSH, denominato GS-NBD, è stato sintetizzato dal Dott. Daniele Dalzoppo (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Padova).

Acido cloridrico e acido acetico sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagenti S.p.A. (Milano).

Il citosol di fegato umano (*pool* da 50 donatori di entrambi i sessi), di ratto Sprague-Dawley (*pool* da individui di solo sesso maschile o femminile) e di topo CD-1 (*pool* da individui di solo sesso maschile o femminile), sono stati ottenuti dalla Xenotech LLC (Lenexa, Kansas, USA).

L'omogeneizzato di rene di ratto maschio Sprague-Dawley è stato preparato in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 M – KCl 0,15 M (pH 7,4) a partire da ~ 1 g di tessuto mediante l'impiego di un omogenizzatore di Potter-Elvehjem utilizzando 3 mL di tampone/g di tessuto.

Tutti gli altri reagenti utilizzati per il progetto di ricerca in questione, compresi l'acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), il glutatione (GSH), il 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato (PAPS) e l'acido tricloroacetico (TCA), sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich S.r.l. (Milano).

### ***3.2.2 Valutazione della stabilità metabolica di NBDHEX e suoi analoghi***

#### ***Incubazione di NBDHEX e suoi analoghi con glutatione (GSH)***

Al fine di valutarne la reattività spontanea nei confronti del GSH, NBDHEX MC3181, MC2753, MC4351 sono stati incubati (concentrazione finale, 10  $\mu$ M), in un mezzo a pH 7,4 o 6,5 (volume finale, 0,2 mL) contenente 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 1 mM GSH. Le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta di GSH alla miscela dei rimanenti componenti del mezzo preincubata per 3 min (25°C o 37°C), condotte a 25°C o 37°C per diversi tempi, ed infine arrestate mediante l'aggiunta di 10  $\mu$ L di acido perclorico ( $\text{HClO}_4$ ) 20% (p/v) e 100  $\mu$ L di  $\text{CH}_3\text{CN}$  mantenuto in ghiaccio. Campioni "tempo 0" sono stati preparati aggiungendo tutti i componenti della miscela di reazione (volume finale: 0,2 mL) a provette mantenute in ghiaccio e contenenti 0,1 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  e 10  $\mu$ L  $\text{HClO}_4$  20% (p/v).

I campioni sono stati quindi centrifugati a 20.000g per 10 min a 4°C al fine di allontanare il precipitato di perclorato di potassio. Aliquote dei surnatanti così ottenuti sono state trasferite in fialette da autocampionatore e successivamente analizzate mediante cromatografia liquida ad elevate prestazioni (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) con rivelazione UV-visibile a 433 nm (vedi "Analisi HPLC"), o, grazie alla stretta collaborazione del Dott. Daniele Dalzoppo (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Padova) mediante cromatografia liquida (*Liquid Chromatography*, LC) accoppiata a rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (*Diode Array Detector*, DAD) e spettrometria di massa tandem (*Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS; vedi "Analisi LC-DAD-MS/MS").

#### ***Incubazione di NBDHEX e di MC3181 con citosol epatico umano, di ratto e di topo, in presenza di GSH***

Nell'intento di valutare il possibile contributo di GST citosoliche alla coniugazione di NBDHEX e MC3181 con GSH, ciascuno dei due derivati dell'NBD è stato incubato alla concentrazione finale 10  $\mu$ M in un mezzo di reazione (volume finale: 0.2 mL) contenente 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4 o 6,5), 1 mM

GSH, e 0,5 mg/mL di citosol epatico umano, di ratto o di topo. Le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta del GSH alle miscele degli altri componenti del mezzo di reazione (precedentemente incubate per 3 min a 37°C o 25°C), condotte a 37°C o 25°C, e infine arrestate dopo intervalli di tempo prestabiliti mediante l'aggiunta di 10 µL di HClO<sub>4</sub> 20% (p/v) con 100 µL di CH<sub>3</sub>CN mantenuto in ghiaccio. Campioni "tempo 0" sono stati preparati aggiungendo tutti i componenti tipici della miscela di reazione (volume finale: 0,2 mL) a provette mantenute in ghiaccio e contenenti 10 µL di HClO<sub>4</sub> 20% (p/v) e 100 µL di CH<sub>3</sub>CN. I campioni così ottenuti sono stati agitati tramite agitatore a vortice, posti in ghiaccio e centrifugati a 20.000g, per 10 min a 4°C, per allontanare le proteine denaturate. Aliquote dei surnatanti sono state quindi trasferite in fiale da autocampionatore e successivamente analizzate mediante HPLC con rivelazione UV-visibile (vedi "Analisi HPLC").

#### ***Incubazione di GS-NBD con omogeneizzato di rene di ratto***

Al fine di ottenere informazioni preliminari circa la possibile biotrasformazione, il prodotto di coniugazione dell'NBDHEX e dell'MC3181 con GSH (GS-NBD) è stato incubato alla concentrazione finale di 50 µM, in un mezzo di reazione (volume finale: 0,2 mL) contenente 0,15 M KCl, 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) e lo 0,5% (v/v) di omogeneizzato di rene di ratto [Gunnarsdottir e Elfarra, 1999]. Le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta del GS-NBD alle miscele degli altri componenti del mezzo di reazione (precedentemente incubate per 3 min a 37°C), condotte a 37°C, e infine arrestate a intervalli di tempo prestabiliti mediante l'aggiunta di 15 µL di TCA 50% (p/v) mantenuto in ghiaccio. Campioni "0 min" sono stati preparati aggiungendo tutti i componenti della miscela di reazione (volume finale: 0,2 mL) a provette mantenute in ghiaccio, contenenti 15 µL di TCA 50% (p/v). I campioni ottenuti sono stati quindi agitati tramite agitatore a vortice, centrifugati a 20.000g per 10 min a 4°C, per allontanare le proteine denaturate. Aliquote dei surnatanti così ottenuti sono state trasferite in fiale da autocampionatore e analizzate mediante HPLC con rivelazione UV-visibile (vedi "Analisi HPLC").

Successivamente, nell'intento di ottenere maggiori informazioni sulla natura dei metaboliti prodotti, i medesimi campioni sperimentali sono stati analizzati con LC-DAD-MS/MS (vedi "Analisi LC-DAD-MS/MS").

#### ***Incubazione di GS-NBD con microsomi epatici umani e di ratto maschio***

Il GS-NBD (concentrazione finale: 50  $\mu$ M) è stato incubato in una miscela di reazione (volume finale: 0.2 mL) contenente 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,15 M KCl (pH 7.4) e 0,5 mg proteina/mL di microsomi epatici umani (*pool* da individui di entrambi i sessi) o di ratto maschio. Le reazioni sono state condotte a 37°C e arrestate dopo intervalli di tempo prestabiliti mediante l'aggiunta di 15  $\mu$ L TCA 50% (p/v). I campioni così ottenuti sono stati agitati tramite agitatore a vortice, posti in ghiaccio e centrifugati a 20.000g, per 10 min a 4°C, per allontanare le proteine denaturate. Aliquote dei surnatanti sono state quindi trasferite in fiale da autocampionatore e successivamente analizzate mediante HPLC con rivelazioni UV-visibile (vedi "Analisi HPLC").

#### ***Incubazione di MC2753 e MC4351 con microsomi epatici umani***

Nell'intento di valutare il possibile coinvolgimento di enzimi microsomiali epatici non dipendenti da NADPH nella biotrasformazione di MC2753 e MC4351, ciascun composto è stato incubato, alla concentrazione finale 10  $\mu$ M, in un mezzo (volume finale, 0,2 mL) contenente microsomi epatici umani (0,05 mg di proteina/mL; HLMs) e 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4). Le singole reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta dei microsomi epatici agli altri componenti del mezzo (preincubati per 3 min in a 37°C), condotte a 37°C per diversi tempi (0, 1, 2, 5, e 10 min per MC2753; 0, 10, 15, 20, e 30 min per MC4351), e infine arrestate mediante l'aggiunta di 0,1 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  freddo (0°C). I campioni "tempo 0" sono stati preparati aggiungendo tutti i componenti della miscela di reazione a provette mantenute in ghiaccio e contenenti 0,1 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Incubazioni di controllo sono state condotte in assenza di microsomi ("buffer"). I campioni così ottenuti sono stati posti in agitazione con l'ausilio di un agitatore a vortice e centrifugati a 20.000g per 10 min a 4°C. Aliquote dei surnatanti sono state quindi trasferite in fiale da autocampionatore e successivamente analizzate mediante HPLC-DAD. Il possibile coinvolgimento di esterasi nel metabolismo microsomiale epatico di MC2753 è stato studiato incubando il composto, alla

concentrazione finale 10  $\mu\text{M}$ , con microsomi epatici umani (0,05 mg di proteina/mL) in 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), sia in presenza sia in assenza dell'inibitore di carbossilesterasi benzil (concentrazione finale, 50  $\mu\text{M}$ ); il volume finale del mezzo di incubazione era pari a 0,2 mL. Le singole reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta dei microsomi epatici ai rimanenti componenti del mezzo di incubazione (preincubati per 3 min in a 37°C), condotte a 37°C, e infine arrestate dopo 10 min mediante l'aggiunta di 0,1 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  freddo (0°C). I campioni sono stati quindi centrifugati a 20.000g per 10 min a 4°C. Aliquote dei surnatanti così ottenuti sono state trasferite in fiale da autocampionatore e analizzate mediante HPLC-DAD.

### ***Incubazione di NBDHEX e MC3181 con citosol di fegato umano, di ratto e di topo, in presenza di PAPS***

NBDHEX e MC3181 (concentrazione finale 10  $\mu\text{M}$ ) sono stati incubati in un mezzo di reazione (volume finale: 0,2 mL) contenente 0,05 M Tris (pH 7.4), 0,2 mg/mL di citosol di fegato umano (*pool* da individui di entrambi i sessi), di ratto o di topo. Le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta del cofattore PAPS (50  $\mu\text{M}$ ) agli altri componenti del mezzo di reazione (precedentemente incubati per 3 min a 37°C), condotte per 60 min a 37°C e, infine, arrestate aggiungendo 0,1 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  mantenuto in ghiaccio. Campioni “tempo 0” sono stati preparati aggiungendo tutti i componenti della miscela di reazione a provette mantenute in ghiaccio e contenenti 0,1 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Reazioni di controllo sono state condotte, inoltre, in assenza del cofattore PAPS. I campioni così ottenuti sono stati centrifugati a 20.000g per 10 min a 4°C, per allontanare le proteine denaturate. Aliquote dei surnatanti sono state quindi trasferite in fiale da autocampionatore e successivamente analizzate mediante HPLC con rivelazione UV-visibile (vedi “*Analisi HPLC*”) o mediante LC-DAD-MS/MS (grazie alla stretta collaborazione del Dott. Daniele Dalzoppo).

### ***3.2.3 Analisi HPLC***

L'analisi dei surnatanti di reazione mediante HPLC con rivelazione UV-visibile è stata condotta utilizzando un sistema cromatografico Agilent serie 1100 (Agilent Technologies GMBH, Germany) costituito da una pompa quaternaria, un

degasatore per i componenti della fase mobile, un autocampionatore termostato, un comparto colonna termostato, un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a lunghezza d'onda variabile, e un rivelatore DAD. L'apparecchiatura era controllata da un Personal Computer, dotato di uno specifico software (Chemstation for LC, Hewlett-Packard, USA) attraverso cui è stato possibile acquisire ed elaborare i dati.

La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (3 x 150 mm, 5  $\mu$ m), termostata a 28°C.

Il volume del campione iniettato era di 30  $\mu$ L.

La fase mobile utilizzata era composta da:

- un “solvente A” costituito da 10 mM bicarbonato di ammonio (pH 6,8) /CH<sub>3</sub>CN (90:10, v/v);
- un “solvente B” costituito da CH<sub>3</sub>CN

Il programma di eluizione prevedeva un'eluizione isocratica con 100% di “solvente A” per i primi 2 min, seguita da un'eluizione a gradiente da 0 a 70% di “solvente B” nei successivi 8 min, e da un'ultima eluizione isocratica con 70% di “solvente B” fino al termine della corsa cromatografica (15 min). Il flusso della fase mobile, mantenuto costante per tutta la durata della corsa, era di 0,4 mL/min.

Nelle suddette condizioni cromatografiche, i tempi di ritenzione ( $t_R$ ) dell'NBDHEX e dell'MC3181 erano, rispettivamente, di 13,2 e di 11,4 min.

Le concentrazioni di substrato utilizzate nelle varie sessioni sperimentali (10  $\mu$ M o 50  $\mu$ M) sono state scelte sulla base dell'intensità del segnale analitico, al fine di garantire una facile integrazione del picco cromatografico anche in presenza di una possibile deplezione dell'analita pari al 90% del quantitativo iniziale (tempo 0).

### **3.2.4 Analisi LC-DAD-MS/MS**

L'analisi dello standard GS-NBD, mediante LC-DAD-MS/MS, è stata condotta utilizzando un sistema cromatografico UHPLC Agilent 1290 Infinity (comprendente una pompa binaria, un degasatore per i componenti della fase mobile, un autocampionatore, un comparto colonna termostato ed un rivelatore

DAD) accoppiato ad uno spettrometro di massa XEVO G2S (Waters) a ionizzazione *electrospray* (ESI)/quadrupolo(Q)/tempo di volo (TOF).

La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 HD (2.1 x 50 mm, 1.7  $\mu$ m), termostata a 28°C. Il volume del campione iniettato era di 1-5  $\mu$ L.

La fase mobile utilizzata era composta da:

- un “solvente A” costituito da 5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (portato a pH 6,8 con acido acetico)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (90:10, v/v);
- un “solvente B” costituito da  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (75:25, v/v)

Il programma di eluizione prevedeva un’eluizione a gradiente da 0 al 100% di “solvente B” nei primi 1,5 min, seguita da un’eluizione isocratica con 100% di “solvente B” per 1 min, da un’ulteriore eluizione a gradiente da 100 a 0% di “solvente B” nei successivi 30 secondi, e infine da un’eluizione isocratica con 100% di “solvente A” della durata di 1 min.

Il flusso della fase mobile, mantenuto costante per tutta la durata della corsa, era di 0,200 mL/min. Il rivelatore DAD era impostato alle lunghezze d’onda di 254 e 433 nm, con frequenza di campionamento di 20 Hz.

Lo spettrometro di massa XEVO G2S operava nelle seguenti condizioni: ionizzazione elettrospray negativa (ES-); voltaggio del capillare, 2.5 kV; voltaggio del cono, 15 V; flusso del gas azoto dal cono, 20 L/ora; temperatura della sorgente, 100°C; temperatura del gas di desolvatazione, 350°C; flusso del gas di desolvatazione, 400 L/ora; energia di collisione, 6 V (analisi MS) e *steps* 10-15-20 V (analisi MS/MS). I dati spettrometrici sono stati acquisiti in modalità full scan in un intervallo di m/z (rapporto massa atomica su carica dello ione) compreso tra 50 e 1200 e con tempo di campionamento di 1 secondo. Per la calibrazione continua dello spettrometro (segnale di *lock*) è stato usato il piccolo prodotto in ione negativo dalla Leu-encefalina (m/z = 554.2615) infusa con flusso costante di 5  $\mu$ L/min. L’analisi degli spettri in modalità MS e in modalità MS/MS è stata effettuata con il *software* MassLynx v.4.1 (Waters).

Per quanto riguarda l’analisi dei surnatanti di reazione di GS-NBD con l’omogeneizzato di rene di ratto, il programma di eluizione prevedeva un’eluizione isocratica con 0% di “solvente B” per 2 min, seguito da un’ulteriore

eluizione a gradiente lineare da 0% al 30% di “solvente B” nei successivi 4 min, quindi un gradiente, sempre lineare, dal 30% al 70% di “B” in 0,5 min seguito dal ritorno lineare allo 0% di “B” in 0,5 min ed infine uno stadio di 2 min allo 0% di “B”.

Il flusso della fase mobile, mantenuto costante per tutta la durata della corsa, era di 0,200 mL/min. Il rivelatore DAD era impostato alle lunghezze d’onda di 330, 420 e 460 nm, con frequenza di campionamento di 20 Hz.

Lo spettrometro di massa XEVO G2S operava nelle seguenti condizioni: ionizzazione *elettrospray* negativa (ES-); voltaggio del capillare, 2.5 kV; voltaggio del cono, 30 V; flusso del gas azoto dal cono, 20 L/ora; temperatura della sorgente, 100°C; temperatura del gas di desolvatazione, 450°C; flusso del gas di desolvatazione, 600 L/ora; energia di collisione, 6 V (analisi MS) o rampa 6-20 V (analisi MS/MS). Per la calibrazione continua dello spettrometro (segnale di *lock*) è stato usato il picco prodotto in ione negativo dalla Leu-encefalina ( $m/z=554.2615$ ) infusa con flusso costante di 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

I dati spettrometrici sono stati acquisiti in modalità *full scan* in un intervallo di  $m/z$  (rapporto massa atomica su carica dello ione) compreso tra 50 e 1200 in modalità MS e tra 50 e 1000 in modalità MSMS con tempo di campionamento di 1 secondo in modalità MS e di 0,5 secondi in modalità MSMS. L’analisi degli spettri in modalità MS e in modalità MS/MS è stata effettuata con il *software* MassLynx v.4.1 (Waters).

L’analisi mediante spettrometria di massa del picco cromatografico denominato “NBDHEX-SO<sub>3</sub>” è stata effettuata mediante infusione diretta di 1-2  $\mu\text{L}$  della corrispondente frazione nella sorgente ESI dello spettrometro di massa (XEVO G2S) tramite un flusso di liquido di trasporto, costituito da acqua/CH<sub>3</sub>CN 1:1 contenente 0,1% acido formico (v/v), di 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Lo strumento operava nelle seguenti condizioni: ionizzazione *electrospray* negativa (ES-); voltaggio del capillare, 1.5 kV; voltaggio del cono, 40 V; flusso del gas azoto dal cono, 10 L/ora; temperatura della sorgente, 100°C; temperatura del gas di desolvatazione, 350°C; flusso del gas di desolvatazione, 800 L/ora; energia di collisione 6 V per gli spettri MS e *steps* a 6, 10, 15, 20 e 30 V per gli spettri MSMS. Tempo di acquisizione dello spettro di 1 secondo nell’intervallo di rapporto  $m/z$  50-800. Per

la calibrazione continua dello spettrometro (segnale di *lock*) è stato usato il picco prodotto in ione negativo dalla Leu-encefalina ( $m/z = 554.2615$ ) infusa con flusso costante di 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

### ***3.2.5 Analisi dei dati***

I dati riguardanti la valutazione dei livelli relativi di NBDHEX, MC3181, MC2753 e MC4351 (valutati in termini di area del rispettivo picco cromatografico) sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni effettuate in esperimenti distinti.

L'emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) dei composti studiati, nelle diverse condizioni sperimentali, è stata calcolata utilizzando la seguente equazione (cinetica di primo ordine):

$$t_{1/2} = 0.693 / k$$

dove  $k$  rappresenta la pendenza della retta ottenuta mediante regressione lineare dei dati ricavati diagrammando il logaritmo naturale della quantità relativa (%) di substrato rimanente nel mezzo di reazione (valutata in termini di area del rispettivo picco cromatografico), in funzione del tempo di incubazione (min).



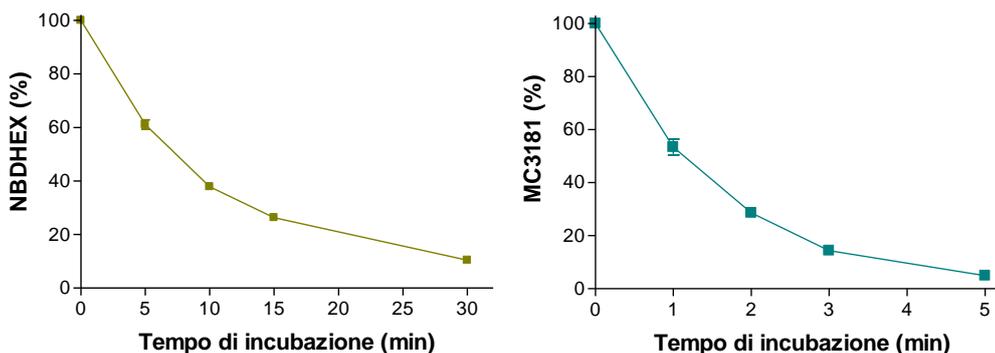
## 3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.3.1 Reattività di NBDHEX e MC3181 nei confronti del GSH

I substrati delle GST sono, generalmente, dei composti elettrofili relativamente idrofobici in grado di reagire con GSH anche spontaneamente [Ruzza *et al.*, 2009]; per questa ragione i primi esperimenti condotti si proponevano di studiare la reattività spontanea di NBDHEX e MC3181 nei confronti del GSH. Tale reattività può infatti compromettere l'efficacia di tali composti riducendone la quota in grado di interagire con la proteina bersaglio GSTP1-1. La potente attività anti-GST di NBDHEX e MC3181 si basa, infatti, sulla loro interazione con il sito H della proteina GST, e sulla successiva formazione di un complesso sigma (complesso di Meisenheimer) con il tripeptide GSH nel contesto dell'enzima stesso. [Ricci *et al.*, 2005; Dalzoppo *et al.*, 2017]. Poiché le reazioni di coniugazione spontanea con GSH sono sensibilmente influenzate dalla temperatura e dal pH [Habig *et al.*, 1974; Ruzza *et al.*, 2009], le incubazioni sono state effettuate in due diverse condizioni di temperatura (37°C e 25°C) e pH (7,4 e 6,5). Precisamente, ciascuno dei due derivati dell'NBD (10 µM) è stato incubato a 37°C o 25°C e per diversi intervalli di tempo, con 1 mM GSH in un tampone fosfato di potassio 0,1 M a pH 6,5 o 7,4. Dopo arresto della reazione mediante acidificazione del campione con acido perclorico e successiva centrifugazione (al fine di allontanare il precipitato di perclorato di potassio), i surnatanti ottenuti sono stati analizzati mediante HPLC con rivelazione spettrofotometrica a 433 nm.

Come atteso, la reattività di NBDHEX e MC3181 nei confronti del GSH risultava influenzata sia dalla temperatura sia dal pH; quest'ultimo dato supporta il coinvolgimento nella reazione di uno o più gruppi ionizzabili. In particolare, com'è noto, le reazioni di glutationilazione coinvolgono l'anione tiolato derivante dalla ionizzazione del gruppo -SH ( $pK_a \approx 9$ ) della cisteina presente nel contesto del GSH e sono pertanto influenzate sensibilmente dal pH [Ruzza *et al.*, 2009]. Nelle condizioni sperimentali adottate la velocità di scomparsa dei due derivati dell'NBD è risultata essere relativamente bassa a 25°C e pH 6,5 (oltre l'80% di NBDHEX e oltre il 20% di MC3181 ancora presenti nel mezzo di incubazione

dopo 30 min), mentre risultava essere nettamente più elevata a 37°C e pH 7,4 (meno del 12% di NBDHEX e meno dell'1,5% di MC3181 presenti dopo 30 min). In particolare, in queste ultime condizioni, l'emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) di NBDHEX e MC3181 era pari rispettivamente a 9,3 min e 1,1 min (**Fig. 9**).

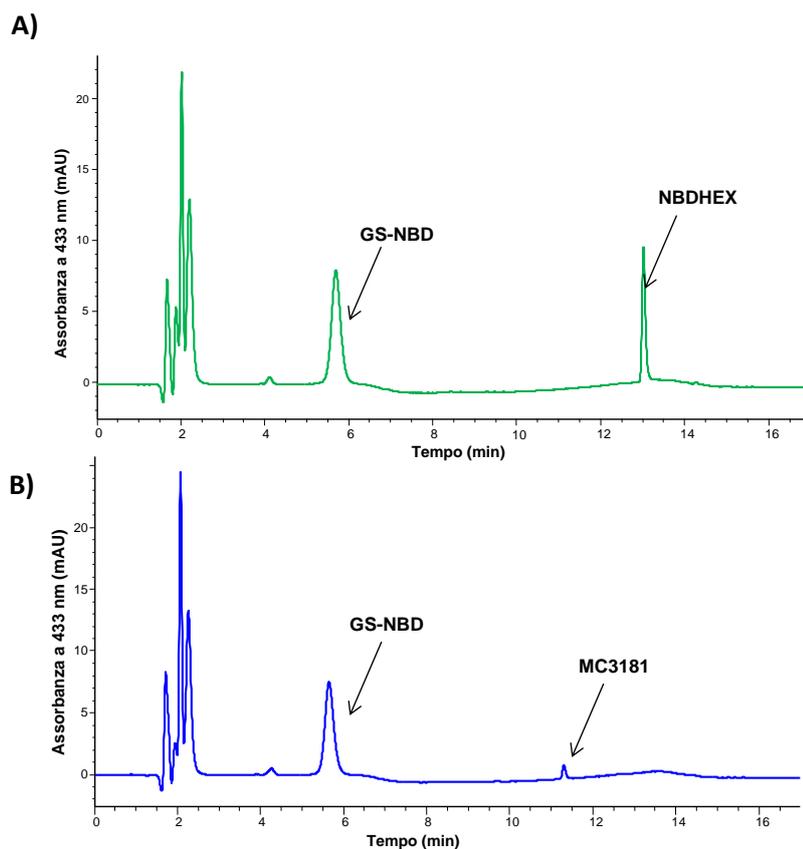


**Fig. 9. Valutazione della stabilità di NBDHEX e MC3181 in presenza di GSH.**

*NBDHEX (10  $\mu$ M) e MC3181 (10  $\mu$ M) sono stati incubati a 37°C con GSH (1 mM) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) per 0, 5, 10, 15 e 30 min. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I dati sono espressi come percentuale di composto presente nel mezzo di incubazione a ciascun tempo rispetto al quantitativo presente al tempo 0 min, e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti. In alcuni casi le barre degli errori non risultano visibili in quanto di dimensioni inferiori a quelle del simbolo.*

Entrambi i cromatogrammi della **Fig. 10** sono caratterizzati dalla presenza, oltre che del picco tipico del substrato (NBDHEX, tempo di ritenzione,  $t_R = 13,3$  min; MC3181,  $t_R = 11,4$  min) da un secondo picco con più breve  $t_R$  (5,9 min).

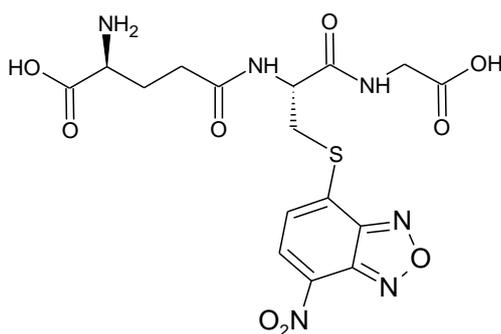
L'identificazione del prodotto di reazione, rappresentato sia nel caso dell'NBDHEX sia nel caso del MC3181 dal glutationil nitrobenzossadiaziolo (GS-NBD; **Fig. 11**), è stata possibile grazie alla stretta collaborazione con il Dott. Dalzoppo (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Padova), il quale ha provveduto alla sintesi del GS-NBD a partire dal 7-cloro-4-nitrobenzofurazano (NBD cloruro). Il GS-NBD preparato dal Dott. Dalzoppo ha infatti mostrato, all'analisi HPLC-DAD,  $t_R$  e spettro di assorbimento UV-visibile identici al prodotto di reazione di NBDHEX e MC3181 con GSH.



**Fig. 10. Cromatogrammi relativi all'analisi HPLC-DAD (rivelazione a 433 nm) di miscele di incubazione di NBDHEX e MC3181 con GSH.**

*NBDHEX (10  $\mu$ M; A) e MC3181 (10  $\mu$ M; B) sono stati incubati a 37°C con GSH (1 mM) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) per 30 min. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi".*

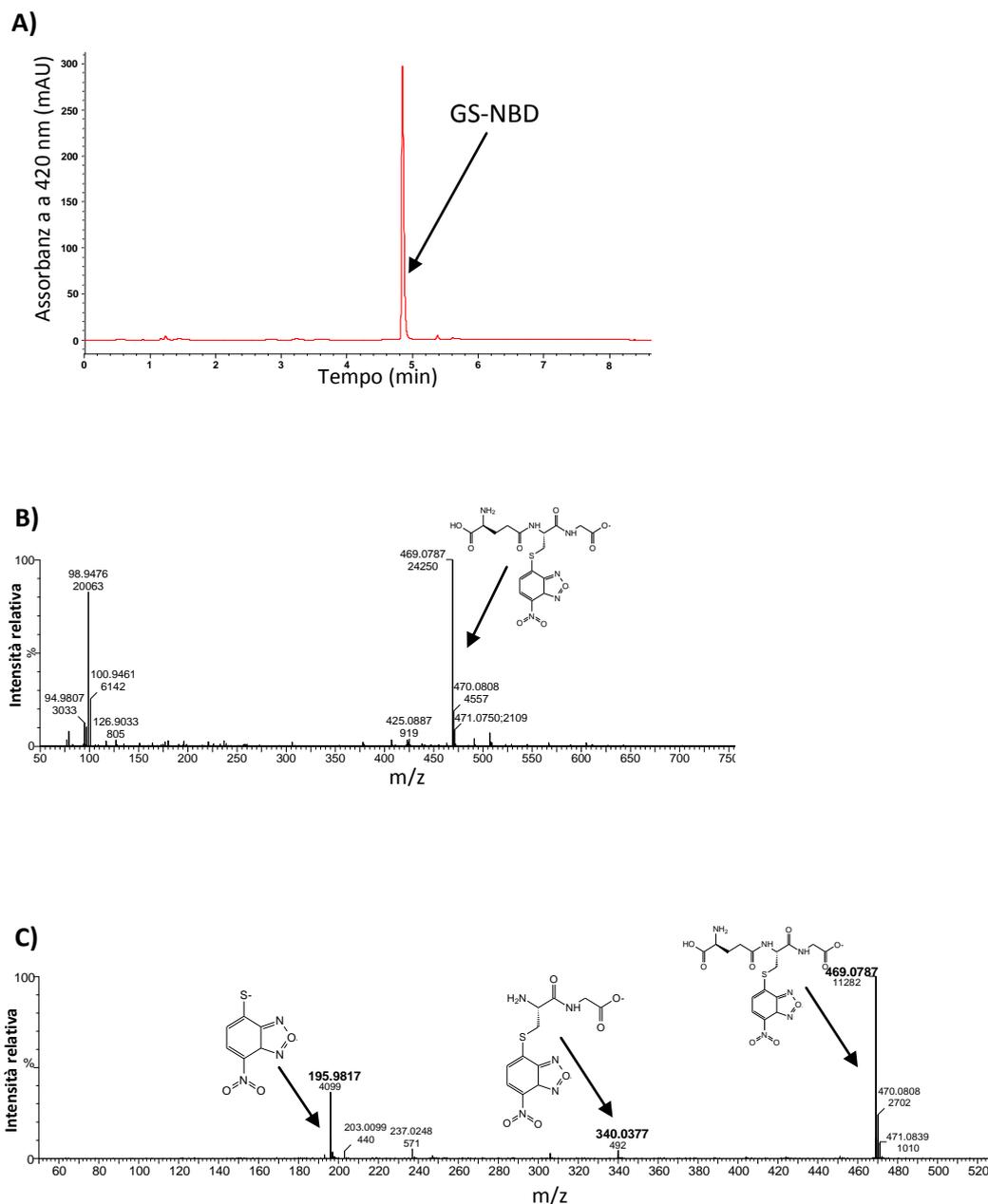
*GS-NBD: glutationil nitrobenzossadiazolo.*



**Fig. 11. Formula di struttura del GS-NBD.**

Quest'ultimo ha inoltre dimostrato, all'analisi LC-DAD-MS/MS effettuata dal Dott. Dalzoppo, spettro di massa e spettro massa-massa identici a quelli del GS-

NBD sintetico (**Fig. 12**). Nelle condizioni cromatografiche adottate per le analisi LC-DAD-MS/MS, il  $t_R$  di GS-NBD era pari a 4,8 min.

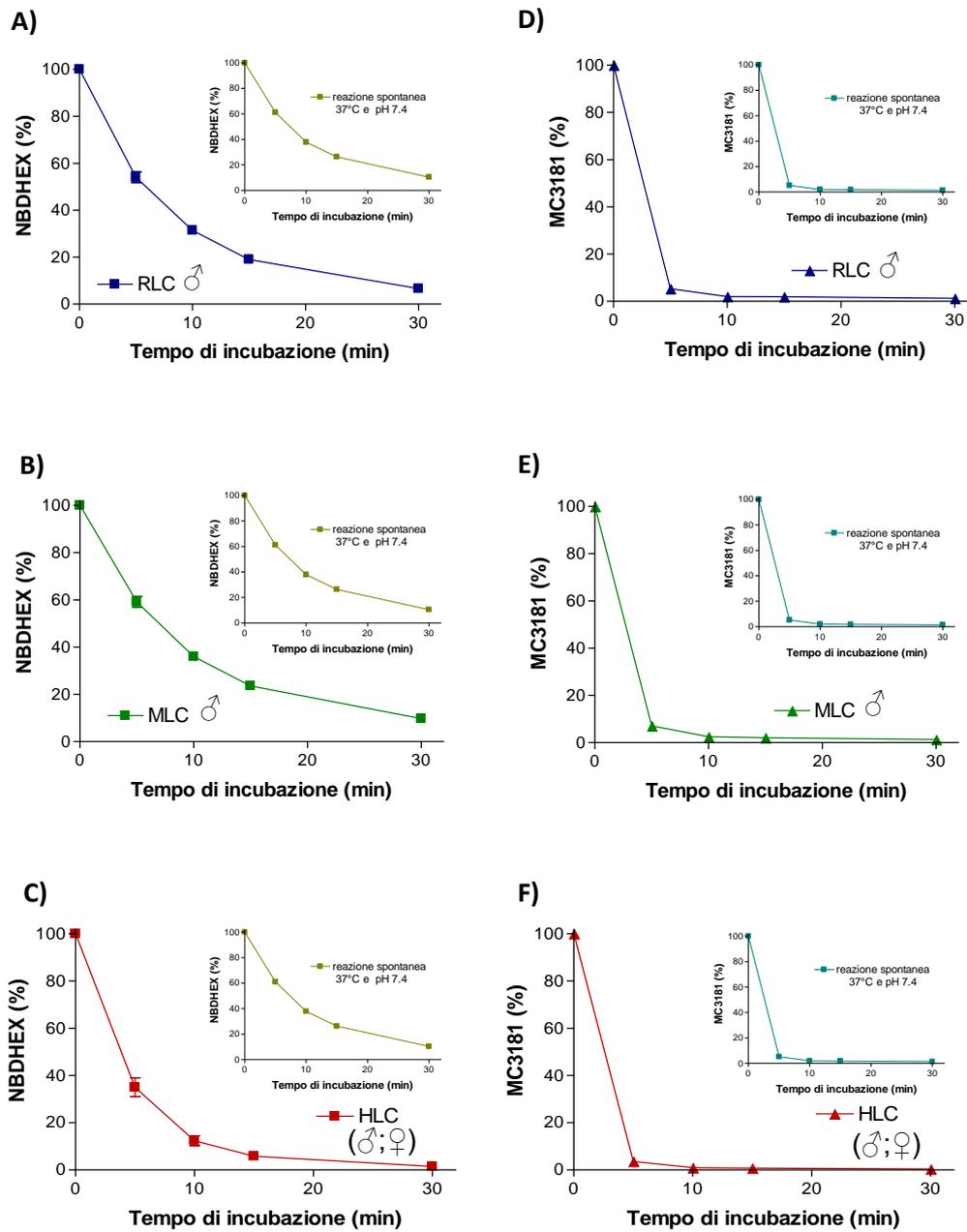


**Fig. 12.** Analisi LC-DAD-MS/MS di una soluzione acquosa standard di GS-NBD 10  $\mu$ M.

A) Cromatogramma relativo all'analisi LC-DAD con rivelazione a 420 nm; B) spettro di massa relativo al picco cromatografico GS-NBD; C) spettro massa - massa (MS/MS) relativo al picco cromatografico GS-NBD. Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di analisi cromatografica e spettrometrica sono riportati nella sezione "Materiali e metodi".

Una seconda serie di esperimenti è stata condotta al fine di valutare se il citosol di fegato delle tre specie animali considerate (uomo, ratto e topo)

esprimesse GST in grado di catalizzare la coniugazione con GSH dei due derivati dell’NBD (Fig. 13).



**Fig. 13.** Stabilità di NBDHEX e MC3181 in miscele di incubazione contenenti citosol epatico di ratto (A e D), di topo (B ed E) o umano (C ed F) e GSH.

NBDHEX e MC3181 (10  $\mu$ M) sono stati incubati a 37°C con citosol di fegato (0,5 mg di proteina/mL) di ratto, di topo o umano, in presenza di GSH (1 mM). Nell’inserito di ciascun pannello è riportata la curva di scomparsa dell’analita ottenuta in assenza di frazione citosolica epatica (reazione spontanea). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC-DAD come descritto nella sezione “Materiali e metodi”. I dati sono espressi come percentuale di analita presente nel mezzo di incubazione a ciascun tempo rispetto al quantitativo presente al tempo 0 min e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti. In alcuni casi le barre degli errori non sono visibili perché di dimensioni inferiori a quelle del simbolo.

Ciascuno dei due composti è stato quindi incubato a 37°C in tampone fosfato di potassio 0,1 M (pH 7,4) per diversi tempi con citosol epatico di diversa origine (0,5 mg di proteina/mL) in presenza di GSH (1 mM). Anche in questo caso, come nei precedenti esperimenti, i surnatanti ottenuti dopo acidificazione e successiva centrifugazione, sono stati analizzati mediante HPLC con rivelazione a 433 nm. I grafici riportati in **Fig. 13** suggeriscono la presenza nelle frazioni citosoliche di fegato umano, ma non di fegato murino o di ratto, di una o più GST in grado di accelerare ulteriormente, nelle condizioni sperimentali adottate (37°C; pH 7,4; [GSH], 1 mM; [NBDHEX], 10 µM), la reazione di NBDHEX con GSH. Il mancato incremento della velocità di glutationilazione di MC3181 da parte di tutte le frazioni citosoliche epatiche considerate non esclude tuttavia un possibile ruolo di GST in presenza di più basse concentrazioni di substrato elettrofilo (MC3181). Le stesse considerazioni possono essere estese alla possibile catalisi della coniugazione con GSH di NBDHEX da parte di GST citosoliche epatiche murine e di ratto.

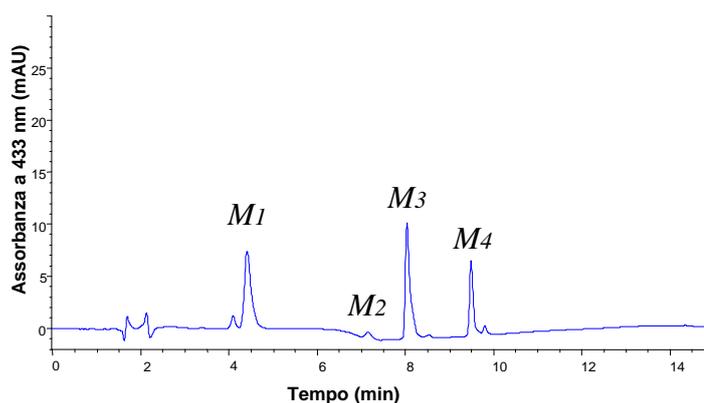
### ***3.3.2 Stabilità metabolica del glutationil-NBD***

Un possibile destino dei coniugati del GSH è rappresentato dal metabolismo attraverso la cosiddetta via degli acidi mercapturici, con formazione, in sequenza, di S-coniugati della cisteinilglicina, della cisteina e della N-acetilcisteina (acidi mercapturici); si tratta, in tutti e tre i casi di metaboliti generalmente inattivi e rapidamente escreti con le urine e con la bile [Parkinson e Ogilvie, 2010].

Al fine di valutarne la stabilità metabolica, il GS-NBD (50 µM) è stato incubato a 37°C per diversi tempi (0-30 min) con un omogeneizzato non frazionato di rene di ratto maschio. La scelta del rene di ratto quale sorgente di enzimi è giustificata dall'elevata espressione, da parte di quest'organo, di  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasi ( $\gamma$ -GT) [Hinchman e Ballatori, 1990], primo enzima della via degli acidi mercapturici. In particolare, la  $\gamma$ -GT è una glicoproteina eterodimerica associata alla membrana plasmatica in grado di convertire coniugati del GSH, presenti nel contesto dei fluidi extracellulari, nei rispettivi S-coniugati della cisteinil glicina [Hinchman *et al.*, 1991 e referenze citate].

Con la sola eccezione del campione "tempo 0", i profili cromatografici a 433 nm ottenuti grazie all'analisi HPLC-DAD delle miscele di incubazione allestite come

sopra descritto, si caratterizzavano per l'assenza del picco GS-NBD ( $t_R = 5,9$  min) e per la presenza, per contro, di 4 picchi ( $M_1$ ,  $t_R = 4,5$  min;  $M_2$ ,  $t_R = 7,3$  min;  $M_3$ ,  $t_R = 8,3$  min;  $M_4$ ,  $t_R = 9,6$  min), la cui area risultava variare sensibilmente in funzione del tempo di incubazione. A titolo di esempio, la **Fig. 14** riporta il profilo cromatografico ottenuto grazie all'analisi del campione sottoposto ad incubazione per 20 min.



**Fig. 14.** Cromatogramma relativo all'analisi HPLC-DAD (rivelazione a 433 nm) del surnatante di una miscela di incubazione contenente GS-NBD e omogeneizzato di rene di ratto.

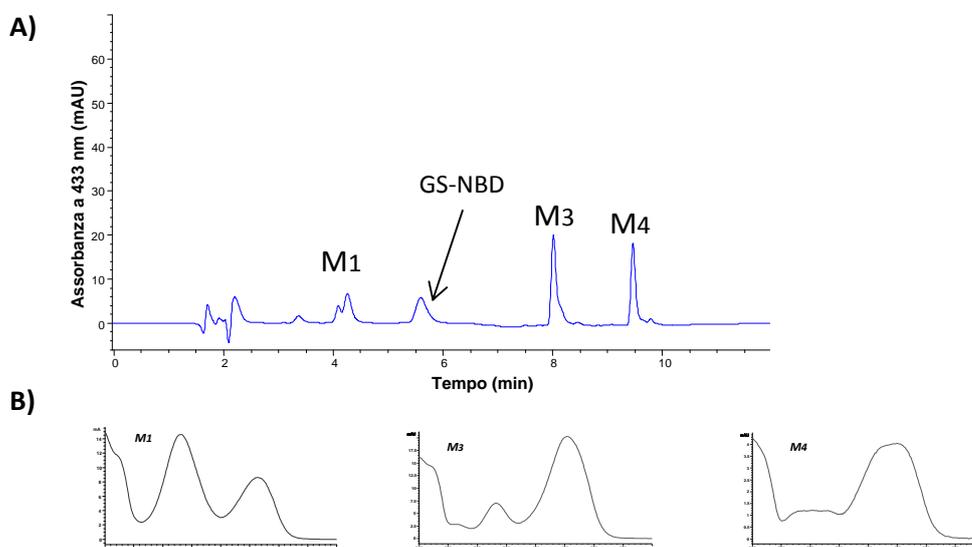
*GS-NBD (50  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C per 20 min con 0,5% (v/v) di un omogeneizzato di rene di ratto in 0,15 M KCl/0,05 M  $KH_2PO_4$  (pH 7.4). Al termine del periodo di incubazione il campione è stato processato e analizzato mediante HPLC-DAD come descritto nella sezione "Materiali e metodi".*

In particolare, mentre l'area dei picchi  $M_2$  e  $M_3$  risultava aumentare progressivamente in funzione del tempo, l'area del picco  $M_1$  e  $M_4$  aumentava fino a 10 min per poi decrescere, dato che suggerisce una possibile instabilità metabolica e/o chimica (non enzimatica) dei prodotti  $M_1$  e  $M_4$ .

In successivi esperimenti, GS-NBD (50  $\mu$ M) è stato incubato, per diversi tempi (0-60 min), con microsomi epatici (0,5 mg di proteina/mL) umani (un *pool* di microsomi preparati da fegato di individui di entrambi i sessi) o di ratto maschio. Com'è noto la frazione microsomiale dell'omogeneizzato di un tessuto comprende anche vescicole derivanti dalla membrana plasmatica [Becker *et al.*, 2011], sito di espressione, oltre che di  $\gamma$ -GT, anche di dipeptidasi (cisteinil glicinasi) in grado di catalizzare la seconda tappa della via degli acidi mercapturici (conversione di S-coniugati della cisteinil glicina in S-coniugati della cisteina) [Hinchman *et al.*, 1991]. È interessante notare come nei profili HPLC

(433 nm) relativi agli incubati contenenti GS-NBD e microsomi di ratto non siano presenti picchi distinti da quello del GS-NBD stesso ( $t_R = 5,9$  min), la cui area è risultata sostanzialmente invariata in funzione del tempo di incubazione (dati non mostrati).

Il risultato ottenuto (stabilità di GS-NBD in presenza di microsomi epatici di ratto) non è sorprendente alla luce della documentata ridottissima espressione di  $\gamma$ -GT a livello epatico nella specie ratto [Hinchman *et al.*, 1990; Hinchman *et al.*, 1991]. Di contro, i profili cromatografici a 433 nm relativi ai campioni contenenti microsomi epatici umani, con la sola eccezione del campione “tempo 0”, si caratterizzavano per la presenza, oltre che del picco GS-NBD, di tre nuovi picchi con  $t_R$  e spettro di assorbimento UV-visibile (vedi **Fig. 15B**) identico a quello dei metaboliti M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> ed M<sub>4</sub> osservati nei surnatanti di incubazione del coniugato con omogeneizzato di rene di ratto. La **Fig. 15A** riporta, a titolo di esempio, il profilo cromatografico relativo all’analisi del campione sottoposto ad incubazione per 60 min.



**Fig. 15. Cromatogramma relativo all’analisi HPLC (rivelazione a 433 nm) del surnatante di incubazione di GS-NBD con microsomi epatici umani (A); spettri di assorbimento dei metaboliti M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub> (B).**

GS-NBD (50  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C per 60 min con microsomi epatici umani (0,5 mg proteina/mL) in 0,15 M KCl, 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione “Materiali e metodi”.

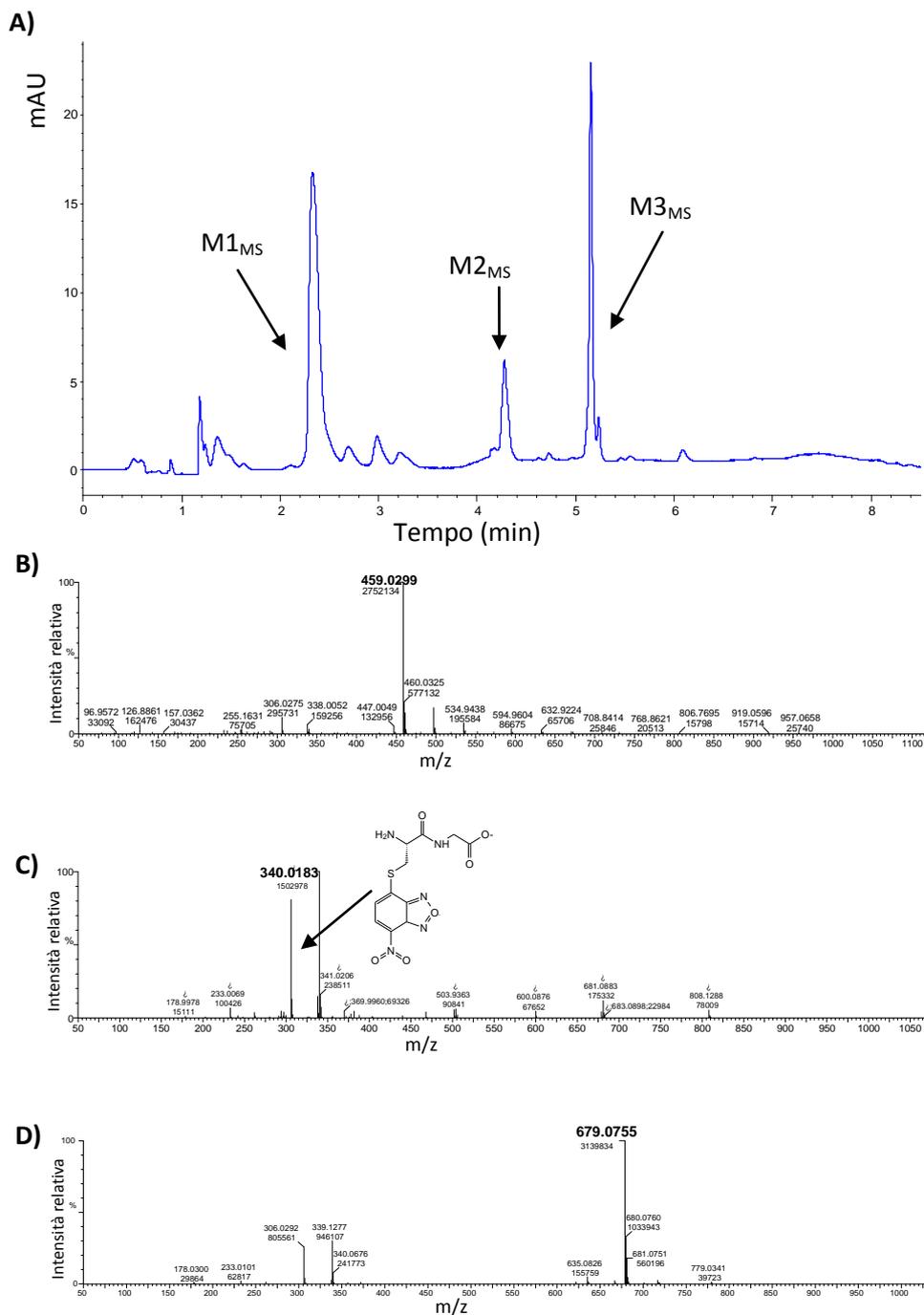
L’instabilità di GS-NBD osservata in presenza di microsomi epatici umani può essere giustificata dalla significativa attività  $\gamma$ -GT del fegato umano [Hinchman *et*

*al.*, 1990]. Nel loro complesso i risultati ottenuti indicano l'esistenza, sia nel ratto sia nell'uomo, di enzimi in grado di convertire GS-NBD in diversi metaboliti. Inoltre, la stabilità di GS-NBD osservata in presenza di microsomi epatici di ratto, ma non umani, suggerisce il coinvolgimento di  $\gamma$ -GT nella biotrasformazione del coniugato stesso.

Successive analisi LC-DAD-MS sono state condotte, in collaborazione con il Dott. D. Dalzoppo, nel tentativo di ottenere informazioni preliminari circa la natura dei metaboliti prodotti. In **Fig. 16** sono riportati i risultati relativi all'analisi LC-DAD-MS di un campione ottenuto incubando GS-NBD (50  $\mu$ M) a 37°C per 10 min con omogeneizzato di rene di ratto. Il profilo LC-DAD a 420 nm, ottenuto nelle condizioni cromatografiche adottate (**Fig. 16A**), si caratterizza per la presenza di tre picchi principali con  $t_R$  distinto da quello del GS-NBD e denominati M1<sub>MS</sub>, M2<sub>MS</sub> e M3<sub>MS</sub>.

E' interessante notare come lo spettro di massa relativo al picco M2<sub>MS</sub> si caratterizzi per la presenza di uno ione negativo con  $m/z$  pari a 340. Il composto che dà origine al picco M2<sub>MS</sub> è pertanto una specie chimica con massa molecolare pari a 341 Da rappresentata, probabilmente, dall'S-coniugato della cisteinilglicina con NBD (massa molecolare pari a 341 Da) prodotto dall'azione di  $\gamma$ -GT sul GS-NBD.

Inoltre, il cromatogramma ione estratto (*Extracted Ion Chromatogram*; EIC) relativo alla ricerca nel *data set* dello ione negativo con  $m/z = 283$  ha confermato la presenza nel campione analizzato di una specie con massa molecolare pari a 284 Da (ossia massa identica a quella dell'S-coniugato della cisteina con NBD) con  $t_R$  pari a 4,8 min (**Fig. 17**). I dati dell'analisi LC-DAD-MS supportano quindi l'esistenza di un metabolismo di GS-NBD attraverso la via degli acidi mercapturici. Futuri esperimenti, basati sull'impiego dell'inibitore di  $\gamma$ -GT acivicina, saranno diretti a confermare il ruolo di tale enzima nel metabolismo di GS-NBD, oltre che alla conferma dell'esistenza dello stesso *pathway* metabolico nella specie topo.

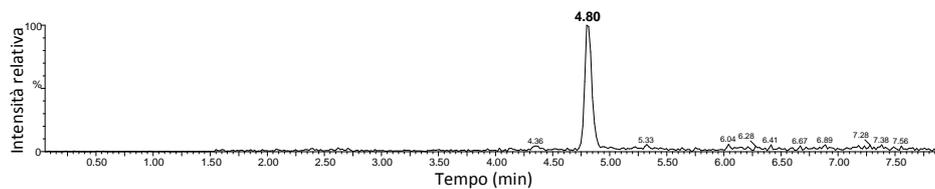


**Fig. 16. Analisi LC–DAD–MS del surnatante di una miscela di incubazione contenente GS-NBD e omogeneizzato di rene di ratto.**

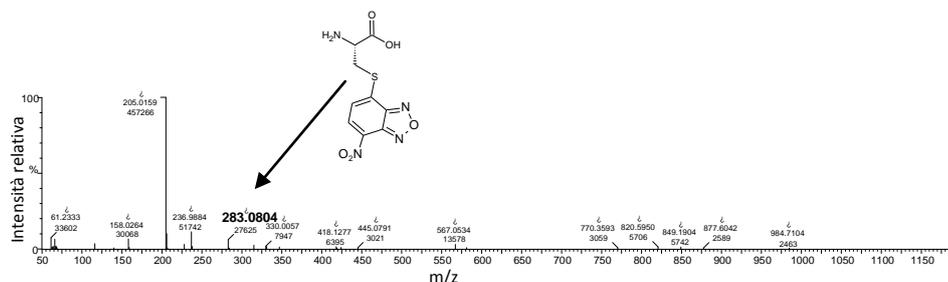
*GS-NBD (50  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C per 10 min con 0,5% (v/v) di un omogeneizzato di rene di ratto in 0,15 M KCl/0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4). Al termine del periodo di incubazione il campione è stato processato e analizzato mediante LC-DAD-MS come descritto nella sezione “Materiali e metodi”.*

*A) Cromatogramma relativo all’analisi LC–DAD con rivelazione a 420 nm; B) spettro di massa relativo al picco cromatografico di  $M1_{MS}$ ; C) spettro di massa relativo al picco cromatografico di  $M2_{MS}$ ; D) spettro di massa relativo al picco cromatografico di  $M3_{MS}$ .*

A)



B)



**Fig. 17.** EIC per  $m/z$  283 relativo all'analisi LC-DAD-MS del surnatante di una miscela di incubazione contenente GS-NBD e omogeneizzato di rene di ratto (A); spettro di massa relativo al picco cromatografico con  $t_R$  4,8 min (B).

Le condizioni di incubazione sono descritte nella didascalia di Fig. 16.

### 3.3.3 Reattività di MC2753 e MC4351 nei confronti del GSH

Come già riportato, nel tentativo di migliorare le proprietà farmacologiche di NBDHEX (in termini di idrosolubilità, selettività nei confronti della GST *target* e stabilità), il gruppo di Ricerca del Prof. A. Mai (Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università di Roma “La Sapienza”) ha recentemente sintetizzato numerosi nuovi analoghi, fra i quali si annoverano l'estere benzoico dell'NBDHEX, chiamato MC2753 (**Fig. 18A**), e la corrispondente ammido MC4351 (**Fig. 18B**), entrambi in corso di caratterizzazione per l'attività antitumorale da parte del gruppo di ricerca della Prof.ssa A. M. Caccuri (Dipartimento di Medicina sperimentale e Chirurgia, Università di Roma “Tor Vergata”) e per alcune proprietà cinetiche (*in primis* reattività vs. GSH e stabilità metabolica) nel nostro Laboratorio (**Fig. 18**).

È interessante evidenziare come studi recenti abbiano dimostrato che il composto MC2753 presenti un meccanismo di inibizione dell'attività enzimatica GSTP1-1 diverso da NBDHEX (cooperatività negativa), oltre a possedere la peculiare proprietà di scindere il complesso tra GSTP1 e TRAF2 anche in assenza di GSH [Fulci *et al.*, 2017].

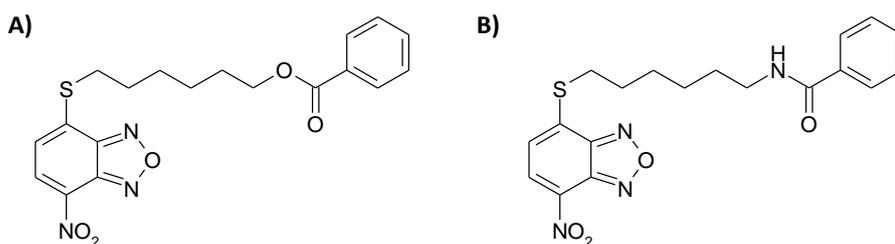
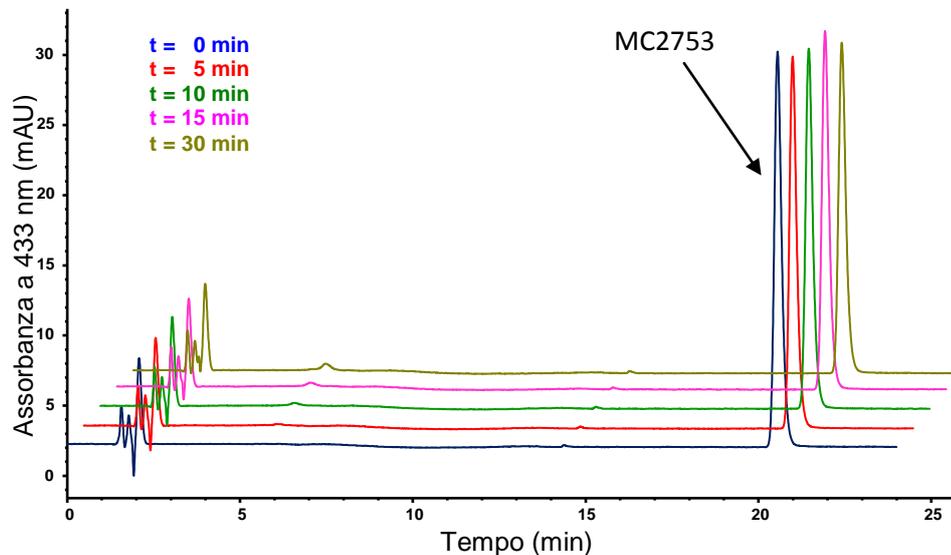


Fig. 18. Formula di struttura di MC2753 (A) e di MC4351 (B).

Al fine di valutarne la reattività spontanea nei confronti del tripeptide GSH, MC2753 (10  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C per tempi diversi (fino a 30 min) con GSH (1 mM) in un tampone fosfato di potassio 0.1 M (pH 7,4). La **Fig. 19** riporta una sovrapposizione dei profili cromatografici relativi all'analisi HPLC-DAD (rivelazione a 433 nm) dei surnatanti ottenuti dopo acidificazione e centrifugazione di campioni incubati per 0, 5, 10, 15, e 30 min. Come si può notare, tutti i cromatogrammi si caratterizzano per la presenza di un unico picco di altezza/area sostanzialmente invariato in funzione del tempo (**Fig. 19**) e con  $t_R$  identico a quello di una soluzione acquosa *standard* di MC2753 ( $t_R = 20,5$  min). A differenza di NBDHEX e MC3181, MC2753 non mostra quindi, in condizioni fisiologiche di pH, temperatura e concentrazione del tripeptide, reattività nei confronti del GSH e potrebbe pertanto rappresentare un *lead* per lo sviluppo di nuovi analoghi caratterizzati da maggiore stabilità.

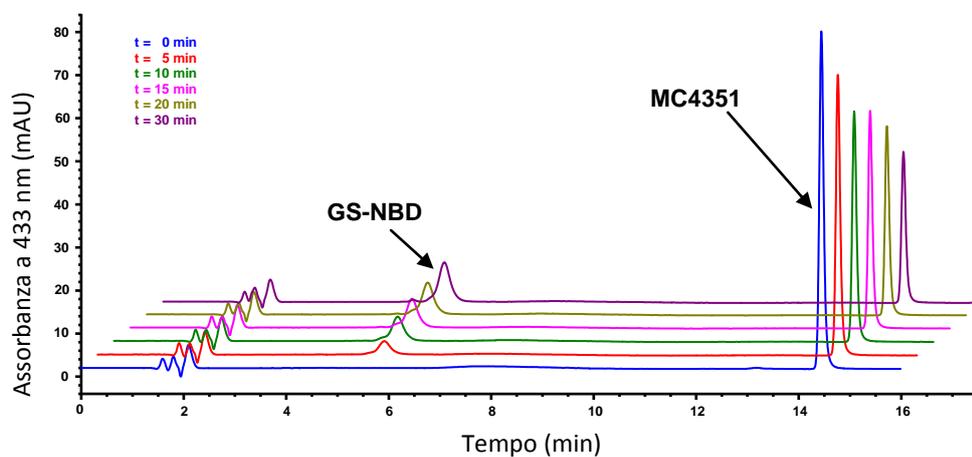
Un'ulteriore serie di esperimenti si proponeva di ottenere informazioni circa la reattività spontanea *vs.* GSH dell'analogo ammidico MC4351. A tal fine MC4351 (concentrazione finale 10  $\mu$ M) è stato incubato per tempi diversi (0, 10, 15 e 30 min) con 1 mM GSH in tampone fosfato di potassio 0,1 M (pH 7,4). Dopo acidificazione e centrifugazione, i surnatanti ottenuti sono stati analizzati mediante HPLC-DAD con rivelazione a 433 nm.

Con la sola eccezione del profilo "t= 0 min", i cromatogrammi riportati in **Fig. 20** si caratterizzano per la presenza, oltre al picco tipico di MC4351 ( $t_R$  14,4 min), di un secondo picco, la cui area viene ad aumentare progressivamente in funzione del tempo di incubazione e con  $t_R$  (5,9 min) e spettro UV-visibile (non mostrato) identici a quelli del GS-NBD ottenuto per sintesi dal Dott. Dalzoppo (vedi sezione 3.3.1). Come atteso, la formazione del prodotto con  $t_R = 5,9$  min si accompagna alla progressiva scomparsa di MC4351 dal mezzo di incubazione.



**Fig. 19. Cromatogrammi relativi all'analisi HPLC-DAD (rivelazione a 433 nm) di miscele di incubazione di MC2753 con GSH.**

MC2753 (10  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C con GSH (1mM) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) per 0,5, 10, 15, 30 min. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi".

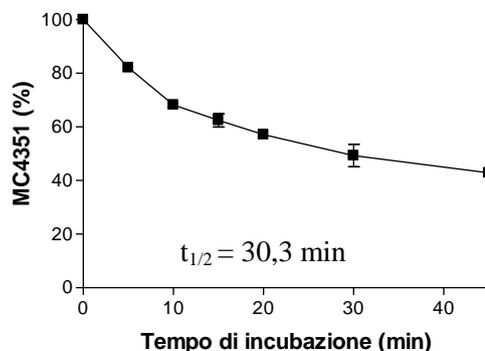


**Fig. 20. Cromatogrammi relativi all'analisi HPLC (rivelazione a 433 nm) di miscele di incubazione di MC4351 con GSH.**

MC4351 (10  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C con GSH (1 mM) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) per 0, 5, 10, 15, 20 e 30 min. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi".

GS-NBD: glutationil nitrobenzossadiazolo.

In particolare, MC4351 è risultato notevolmente più stabile in presenza di GSH ( $t_{1/2} = 30,3$  min a  $37^\circ\text{C}$  e pH 7,4; **Fig. 21**), rispetto sia a NBDHEX che a MC3181 (vedi **Fig. 9**).



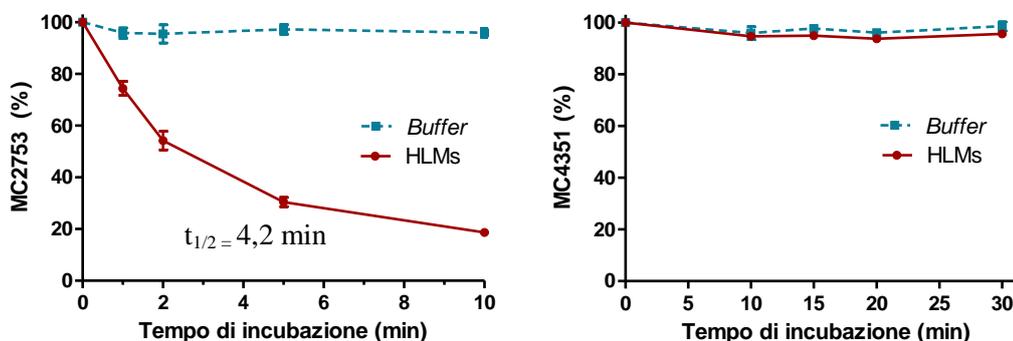
**Fig. 21. Valutazione della stabilità di MC4351 in presenza di GSH.**

MC4351 ( $10\ \mu\text{M}$ ) è stato incubato a  $37^\circ\text{C}$  con GSH ( $1\ \text{mM}$ ) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,1\ \text{M}$  (pH 7,4) per 0, 5, 10, 15, 20, 30 e 45 min. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi". I dati sono espressi come percentuale di composto presente nel mezzo di incubazione a ciascun tempo rispetto al quantitativo presente al tempo 0 min, e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti. In alcuni casi le barre degli errori non risultano visibili in quanto di dimensioni inferiori a quelle del simbolo.

Al fine di valutarne la stabilità all'azione idrolitica delle carbossilesterasi microsomiali, MC2753 e MC4351 ( $10\ \mu\text{M}$ ) sono stati incubati a  $37^\circ\text{C}$  per 10 min in presenza di microsomi epatici umani ( $0,05\ \text{mg proteina/mL}$ ) in tampone fosfato di potassio  $0,1\ \text{M}$  a pH 7,4; incubazioni di controllo sono state condotte parallelamente in assenza di microsomi (incubazioni "buffer"). Dopo deproteinizzazione con  $\text{CH}_3\text{CN}$  e centrifugazione, i surnatanti ottenuti da ciascun campione sono stati analizzati mediante HPLC-DAD. In queste condizioni sperimentali abbiamo osservato un significativo calo dell'area del picco cromatografico di MC2753 (area  $< 20\%$  vs. campione "tempo 0") associato alla comparsa di un picco con  $t_R$  pari a 13,0 min indicativo (sulla base del valore di  $t_R$  e dello spettro di assorbimento UV-visibile) della formazione di NBDHEX (dati non mostrati); viceversa il composto a struttura ammidica MC4351 è risultato relativamente stabile.

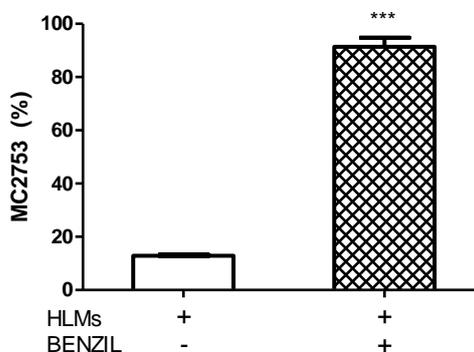
In **Fig. 22** sono riportati i risultati ottenuti incubando entrambi i composti a  $37^\circ\text{C}$  per diversi tempi, con microsomi epatici umani (HLMs;  $0,05\ \text{mg di proteina/mL}$ ) o in solo tampone a pH 7,4 (buffer). In presenza di microsomi epatici, l'ammide MC4351 è risultata stabile per almeno 30 min, a differenza

dell'estere MC2753 che mostra, nelle stesse condizioni, un'emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) di 4,2 min.



**Fig. 22. Stabilità di MC2753 e MC4351 in presenza di microsomi epatici umani.** MC2753 e MC4351 sono stati incubati a 37°C (concentrazione finale 10  $\mu$ M), per diversi intervalli di tempo, in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4), sia in assenza ("buffer") sia in presenza di microsomi epatici umani (HLM; 0,05 mg di proteina/mL). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi". I dati sono espressi come percentuale di composto presente nel mezzo di incubazione a ciascun tempo rispetto al quantitativo presente al tempo 0, e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti. In alcuni casi le barre degli errori non risultano visibili in quanto di dimensioni inferiori a quelle del simbolo.

Il ruolo di carbossilesterasi microsomiali nella scissione idrolitica di MC2753 è stato successivamente confermato mediante incubazione del composto (10  $\mu$ M) con microsomi umani (0,05 mg di proteina/mL) a 37°C per 10 min, in presenza e in assenza di 50  $\mu$ M benzil, un *pan* inibitore di carbossilesterasi [Ross *et al.*, 2012]. Sia la scomparsa del substrato MC2753 dal mezzo di reazione (**Fig. 23**) sia la formazione dell'NBDHEX sono risultati essere inibiti nettamente dalla presenza del benzil. In presenza di benzil, infatti, la quantità di MC2753 residua dopo 10 min di incubazione era pari a circa il 91% del quantitativo iniziale (**Fig. 23**).



**Fig. 23. Effetto dell'inibitore di carbossilesterasi benzil sull'idrolisi di MC2753 catalizzata da microsomi epatici umani.**

MC2753 (10  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C con microsomi epatici umani (0,05 mg di proteina/mL) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) per 0 e 10 min, sia in assenza sia in presenza di benzil (50  $\mu$ M). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi". I dati sono espressi come percentuale di composto residuo nel mezzo di incubazione dopo 10 min e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti.

\*\*\* $p < 0,0001$  (t-test).

L'analogo amidico MC4351, pur mantenendo un certo grado di reattività nei confronti del GSH, rappresenta, in virtù dell'elevata stabilità all'azione idrolitica delle CES microsomiali epatiche e all'elevata citotossicità dimostrata recentemente dal gruppo di lavoro della Prof.ssa A. M. Caccuri (A.M. Caccuri, comunicazione personale), un composto meritevole di ulteriori indagini.

Di seguito è riportata una tabella riepilogativa in cui sono riassunti i risultati ottenuti (**Tab. 1**).

Condizioni di incubazione	NBDHEX	MC3181	MC2753	MC4351
<b>0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> (37°C; pH 7,4)	stabile	stabile	stabile	stabile
<b>1 mM GSH,</b> <b>0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> (37°C; pH 7,4)	t <sub>1/2</sub> = 1,1 min	t <sub>1/2</sub> = 9,3 min	stabile	t <sub>1/2</sub> = 30,3 min
<b>HLMs (0,05 mg/mL)</b> <b>0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> (37°C; pH 7,4)	—	—	t <sub>1/2</sub> = 4,2 min	stabile

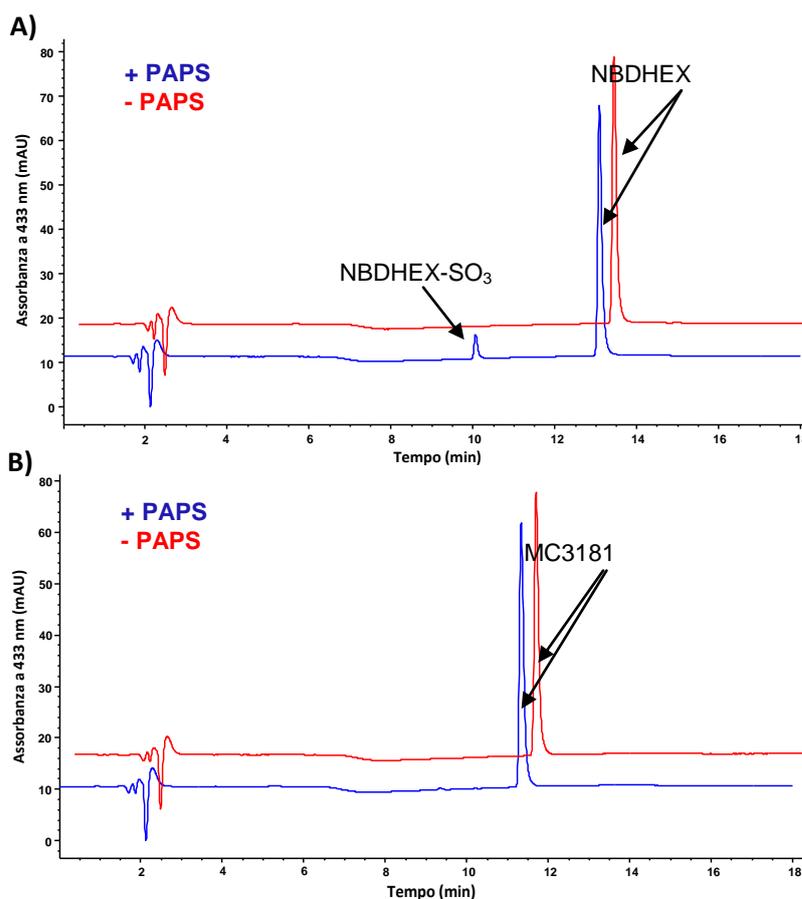
Tab. 1 Stabilità dei derivati dell'NBD NBDHEX, MC3181, MC2753 e MC4351 in diverse condizioni.

### ***3.3.4 Valutazione della possibile solfonazione di NBDHEX e MC3181 da parte di solfotrasferasi epatiche umane, murine e di ratto***

Precedenti studi condotti nel nostro Laboratorio hanno dimostrato come NBDHEX e MC3181, in virtù della presenza di una funzione alcolica nella catena laterale, vadano incontro a glucuronoconiugazione [Calderan, 2015]. Poiché la funzione alcolica rappresenta anche un potenziale sito di solfonazione, sono stati condotti esperimenti *in vitro* al fine di valutare la possibile solfoconiugazione di NBDHEX e MC3181, sia nell'uomo sia nelle due specie animali sino ad ora utilizzate per la caratterizzazione del profilo di attività e sicurezza dei due

composti, ossia il topo e il ratto. In tali esperimenti ciascun substrato (NBDHEX o MC3181; concentrazione finale 10  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C per 60 min con citosol di fegato di diversa origine in presenza e assenza del cofattore 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato (PAPS; 50  $\mu$ M). La **Fig. 24** riporta, a titolo di esempio, una sovrapposizione dei profili cromatografici relativi all'analisi HPLC dei surnatanti ottenuti dopo incubazione di NBDHEX (**Fig. 24A**) o MC3181 (**Fig. 24B**) per 60 min con citosol di fegato di ratto femmina, in assenza e presenza del cofattore PAPS.

È interessante notare come solo i cromatogrammi relativi all'analisi dei campioni contenenti NBDHEX, PAPS e citosol di fegato di ratto femmina, siano caratterizzati dalla presenza, oltre che dal picco tipico del substrato (NBDHEX,  $t_R = 13,3$  min; MC3181  $t_R = 11,4$  min), da un secondo picco con più breve  $t_R$  (10,1 min).



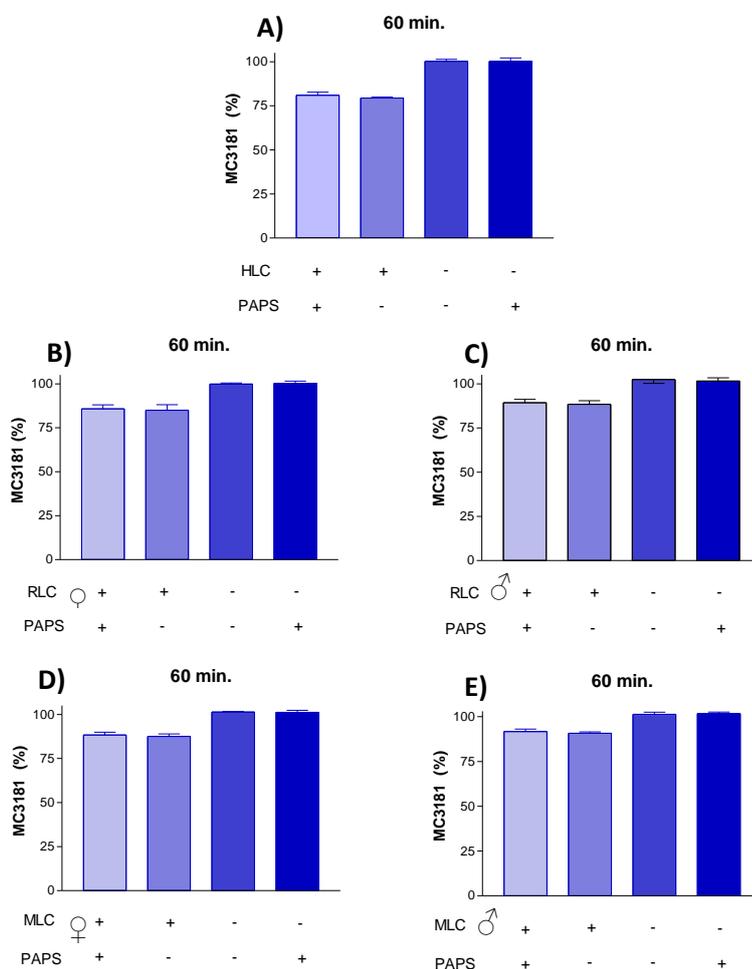
**Fig. 24. Cromatogrammi relativi all'analisi HPLC (rivelazione a 433 nm) di miscele di incubazione di NBDHEX e MC3181 con citosol di fegato di ratto femmina in presenza e in assenza di PAPS.**

*NBDHEX (10  $\mu$ M; A) e di MC3181 (10  $\mu$ M; B) sono stati incubati a 37°C per 60 min con citosol di fegato di ratto femmina (0,2 mg proteina/mL) in Tris 0,05 M (pH 7,4), in assenza e in presenza di PAPS (50  $\mu$ M). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi".*

*NBDHEX-SO<sub>3</sub>: prodotto di solfonazione di NBDHEX.*

Tale picco è, per contro, assente nei cromatogrammi relativi a campioni ottenuti incubando NBDHEX con citosol di fegato di ratto maschio, citosol di fegato di topo maschio o femmina o citosol di fegato umano, sia in assenza sia in presenza di PAPS (non mostrato). E' altresì interessante notare come una lieve scomparsa del substrato dal mezzo di incubazione sia stata osservata quando NBDHEX è stato incubato per 60 min con citosol di fegato, indipendentemente dall'origine della frazione (ratto, topo o uomo) e dall'eventuale presenza del cofattore PAPS (dati non mostrati); tale riduzione è probabilmente riconducibile ad un legame del composto a componenti proteiche delle frazioni citosoliche.

I grafici riportati in **Fig. 25** riassumono i risultati relativi all'analisi della possibile solfonazione di MC3181.



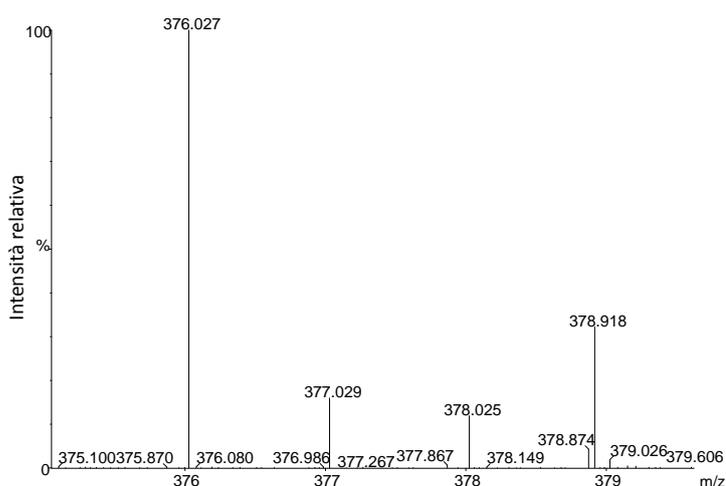
**Fig. 25. Stabilità di MC3181 in presenza di citosol di fegato umano, di ratto e di topo in assenza e presenza di PAPS.**

MC3181 (10  $\mu$ M) è stato incubato per 60 min a 37°C in Tris 0,05 M (pH 7,4) in assenza e presenza di citosol di fegato (0,2 mg di proteina/mL) umano (A), di ratto maschio o femmina (B e C), di topo maschio o femmina (D ed E) sia in assenza sia in presenza di PAPS (50  $\mu$ M). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiale e metodi". I dati sono espressi come percentuale di MC3181 residuo nel mezzo di incubazione dopo 60 min rispetto al quantitativo presente al tempo 0 min, e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti.

Anche in questo caso è stata osservata una lieve riduzione dei livelli del composto studiato (MC3181) in tutti gli incubati (60 min) contenenti citosol di fegato, indipendentemente dalla natura della frazione citosolica e dalla presenza nel mezzo di PAPS; tale riduzione non è risultata però mai accompagnata dalla comparsa di un nuovo picco cromatografico indicativo della presenza di un possibile prodotto di solfonazione.

Al fine di ottenere maggiori informazioni circa la natura del metabolita che si viene a formare previa incubazione di NBDHEX con citosol di ratto femmina e PAPS, alcuni incubati sono stati riuniti e sottoposti a separazione cromatografica (HPLC) raccogliendo l'eluato con  $t_R$  pari a 10,1 min (picco "NBDHEX-SO<sub>3</sub>"). Le frazioni raccolte sono state successivamente analizzate mediante spettrometria di massa in infusione diretta (Dott. D. Dalzoppo).

Come atteso, lo spettro di massa relativo al picco cromatografico NBDHEX-SO<sub>3</sub> si caratterizza per la presenza di un picco con  $m/z$  pari a 376 (**Fig. 26**) indicativo di uno ione negativo con massa molecolare superiore di 80 unità rispetto allo ione negativo derivante dalla ionizzazione dell'NBDHEX ( $m/z = 296$ ; spettro non mostrato). Tale incremento di massa (80 Da) è tipico delle reazioni di solfonazione (introduzione nel substrato di un gruppo SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) [Parkinson e Ogilvie, 2010].



**Fig. 26.** Spettro MS dell'eluato con  $t_R$  10,0 min (NBDHEX-SO<sub>3</sub>).

NBDHEX-SO<sub>3</sub> è stato ottenuto incubando NBDHEX (10  $\mu$ M) a 37°C per 60 min con citosol di fegato di ratto femmina (0,2 mg proteina/mL) in Tris 0,05 M (pH 7,4) in presenza di PAPS (50  $\mu$ M).

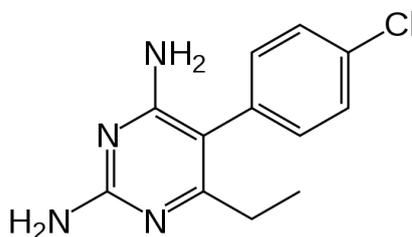
I dati dell'analisi LC-DAD-MS supportano quindi la presenza nel fegato di ratto femmina di una o più SULT citosoliche in grado di catalizzare la solfonazione di NBDHEX.

## 4. LA PIRIMETAMINA

### 4.1 INTRODUZIONE

#### 4.1.1 La pirimetamina come agente antitumorale

La pirimetamina (Daraprim<sup>®</sup>, **Fig. 27**) è un derivato pirimidinico, inibitore competitivo della diidrofolato reduttasi (DHFR), noto per la sua attività antiprotozoaria [Ferone, 1970]. Gli inibitori della diidrofolato reduttasi (enzima essenziale per la sintesi dell'acido folico) sono stati studiati per alcuni anni come agenti antitumorali poiché mostrano elevata tossicità nei confronti di cellule in rapida divisione, caratteristica tipica delle cellule tumorali [Tommasino *et al.*, 2016]. Studi recenti, inoltre, hanno evidenziato come la pirimetamina (*Pyrimethamine*, PYR) si comporti da inibitore del *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) [Nelson *et al.*, 2011; Fang, 2014], impedendone la fosforilazione [Fang, 2014].



**Fig. 27.** Formula di struttura della pirimetamina (PYR).

In condizioni fisiologiche, STAT3 viene attivata rapidamente e in modo transitorio; per contro, in molti tumori umani le proteine STAT (soprattutto STAT3 e STAT5) sono costitutivamente attive [Nelson *et al.*, 2011]. In particolare, STAT3 viene attivata in risposta a citochine e fattori di crescita attraverso la fosforilazione della tirosina in posizione 705 (Y705) da parte di Janus chinasi (JAK). Quindi, i dimeri fosforilati di STAT3 traslocano nel nucleo della cellula e promuovono la trascrizione di geni responsabili della proliferazione e sopravvivenza cellulare [Khan *et al.*, 2018]. Poiché la fosforilazione della proteina STAT3 contribuisce alla trasformazione e progressione neoplastica, essa è considerata un possibile *target* per la terapia antitumorale [Wang *et al.*, 2012].

Da queste evidenze è possibile comprendere come l'impiego di PYR potrebbe essere allargato al trattamento di alcuni tumori umani. PYR mostra una significativa attività citotossica *in vitro* nei confronti di cellule tumorali caratterizzate dall'attivazione costitutiva di STAT3 [Fang, 2014; Nelson *et al.*, 2011]. Studi recenti dimostrano che PYR inibisce la proliferazione delle cellule TM40D-MB di tumore mammario metastatico sia *in vitro* che *in vivo* in modo dose-dipendente. Inoltre, dallo stesso Gruppo di Ricerca è stata osservata una riduzione nel numero di proteine STAT3 fosforilate nelle cellule del tumore, così come nella milza di topi portatori di xenotrapianti di cellule di carcinoma mammario murino TUBO [Khan *et al.*, 2018]. Questi risultati sono coerenti con ricerche precedenti condotte su linee cellulari umane di melanoma metastatico. PYR, a opportune concentrazioni (160-320  $\mu\text{mol/L}$ ), induce apoptosi mediante attivazione della catepsina B e la cascata delle caspasi (caspasi-8 e caspasi-9) e successiva depolarizzazione mitocondriale [Giammarioli *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2018]. PYR, inoltre, provoca arresto del ciclo cellulare in fase S e inibisce la crescita cellulare. Esperimenti condotti in topi immunodeficienti (SCID) portatori di melanoma umano, hanno mostrato come il trattamento con PYR comporti inibizione della crescita tumorale [Giammarioli *et al.*, 2008]. Non da ultimo, è bene sottolineare come l'azione antinfiammatoria del farmaco preso in esame rappresenta un ulteriore contributo per l'effetto antitumorale [Khan *et al.*, 2018].

Attualmente PYR è oggetto di uno studio clinico di fase I/II in pazienti affetti da leucemia linfocitica cronica e linfoma a piccoli linfociti (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01066663>), ma nonostante i promettenti risultati ottenuti le informazioni relative al metabolismo di tale composto sono, sorprendentemente, limitate essenzialmente all'osservazione della presenza nell'urina di ratti trattati con PYR radiomarcata di almeno 16 metaboliti, 3 dei quali identificati e rappresentati da due prodotti di monossigenazione (PYR 1-ossido e PYR 3-ossido) e da un prodotto di diossigenazione (PYR 3-ossido idrossilata in posizione  $\alpha$  della catena etilica) [Hubbell *et al.*, 1978]. Alla luce del possibile riposizionamento della PYR in ambito oncologico e quindi di un notevole ampliamento dell'impiego del farmaco, il nostro Laboratorio si è proposto di ampliare le conoscenze sulla biotrasformazione del composto

avviando un progetto di ricerca i cui risultati preliminari sono riportati in questo lavoro di Tesi.



## 4.2 MATERIALI E METODI

### 4.2.1 Reagenti

L'acqua ultrapura con cui sono stati preparati tutti i tamponi e le soluzioni acquose utilizzate nel presente lavoro è stata ottenuta tramite un apparecchio PureLab Option-Q (Elga LabWater, High Wycombe, UK).

I microsomi epatici umani (un *pool* di microsomi isolati dal fegato di 50 donatori di entrambi i sessi), di ratto Sprague-Dawley (*pool* da individui di solo sesso maschile) e di ratto pretrattato con fenobarbital (PB-RLM) sono stati ottenuti dalla Xenotech LLC (Lenexa, Kansas, USA); mentre i microsomi di donatore singolo trattato con fenobarbital (codice H112) sono stati ottenuti dalla Gentest (Tewksbury MA, USA).

Il nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH) e il peptide alameticina sono stati ottenuti dalla Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA). Soluzioni *stock* di alameticina alla concentrazione finale di 5 mg/mL sono state preparate in dimetilsolfossido (DMSO), aliquotate e conservate a -20°C.

Tutti gli altri reagenti utilizzati per il progetto di ricerca in questione, compresi l'acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN), l'acido UDP-glucuronico (UDPGA), l'acido formico (HCOOH) e il metanolo (MeOH) sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich S.r.l. (Milano).

### 4.2.2 Incubazione di PYR con microsomi epatici umani e di ratto, in presenza di NADPH

Nell'intento di valutarne la possibile ossidazione da parte di enzimi microsomiali epatici dipendenti da NADPH, PYR (concentrazione finale 50 µM) è stata incubata in un mezzo di reazione (volume finale: 0,2 mL) contenente 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4), 2 mM NADPH, e 1 mg/mL di microsomi epatici di diversa origine (umani, donatore H112; ratto, PB-RLM). Le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta dei microsomi epatici agli altri componenti del mezzo di reazione (precedentemente preincubati per 3 min a 37°C), condotte a 37°C, e infine arrestate dopo intervalli di tempo prestabiliti mediante l'aggiunta di 0,1 mL di CH<sub>3</sub>CN mantenuto in ghiaccio. Campioni "tempo 0" sono stati preparati

aggiungendo tutti i componenti tipici della miscela di reazione a provette mantenute in ghiaccio e contenenti 0.1 mL di CH<sub>3</sub>CN. Reazioni di controllo sono state condotte, inoltre, in assenza del cofattore NADPH. I campioni così ottenuti sono stati agitati tramite vortex, posti in ghiaccio e centrifugati a 20.000g, per 10 min a 4°C. Aliquote dei surnatanti sono state quindi trasferite in fialette da autocampionatore e successivamente analizzate mediante HPLC con rivelazione UV-visibile (vedi “*Analisi HPLC*”).

Successivamente, nell'intento di ottenere informazioni preliminari circa la natura dei metaboliti prodotti, i medesimi campioni sperimentali sono stati analizzati mediante LC-DAD-MS.

#### ***4.2.3 Incubazione di PYR con microsomi epatici di ratto, in presenza di UDPGA***

Al fine di valutare la possibile glucuronidazione di PYR, microsomi epatici di ratto maschio trattato con PB (PB-RLM) sono stati incubati in ghiaccio per 15 min in provette di polipropilene contenenti tampone TRIS (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub>, PYR e il peptide formante pori alameticina. Dopo trasferimento delle suddette miscele per 3 min in bagnetto termostato a 37°C (equilibratura termica), si è proceduto ad avviare le reazioni mediante l'aggiunta del cofattore UDPGA. La composizione finale delle miscele di reazione così ottenute (volume finale: 0,2 mL) era la seguente: 0,1 M TRIS (pH 7,5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µM PYR, 1 mg/mL di PB-RLM, 25 µg/mL di alameticina, 5 mM UDPGA. Inoltre, al fine di valutare la possibile coniugazione con acido glucuronico dei prodotti di ossidazione NADPH-dipendente di PYR è stata condotta la reazione indicata in sezione 4.2.2 utilizzando PB-RLM (1 mg di proteina/mL) e supplementando il mezzo di incubazione con 2 mM UDPGA. Tutte le reazioni sono state condotte a 37°C e arrestate, dopo tempi prestabiliti (60 o 120 min), mediante l'aggiunta a ciascun campione di 0,1 mL di CH<sub>3</sub>CN mantenuto in ghiaccio, agitazione al vortex e trasferimento in ghiaccio. Campioni “tempo 0” sono stati preparati aggiungendo tutti i componenti tipici della miscela di reazione (volume finale: 0,2 mL) a provette mantenute in ghiaccio e contenenti 0,1 mL di CH<sub>3</sub>CN. Reazioni di controllo sono state condotte, inoltre, in assenza del cofattore UDPGA. I campioni sono stati quindi centrifugati a 20.000g per 10 min a 4°C, al fine di allontanare le

proteine denaturate. Aliquote dei surnatanti così ottenuti sono state trasferite in fiale da autocampionatore e successivamente analizzate mediante cromatografia liquida ad elevate prestazioni (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) con rivelazione UV-visibile a 275 nm (vedi “*Analisi HPLC*”).

#### **4.2.4 Analisi HPLC**

L’analisi dei surnatanti di reazione mediante HPLC con rivelazione UV-visibile è stata condotta utilizzando un cromatografo Hewlett-Packard/Agilent serie 1100 (Agilent Technologies GMBH, Germany) costituito da una pompa quaternaria, un degasatore per i componenti della fase mobile, un autocampionatore termostato, un comparto colonna termostato, un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a lunghezza d’onda variabile, e un rivelatore DAD. L’apparecchiatura era controllata da un Personal Computer, dotato di uno specifico *software* (Chemstation for LC, Hewlett-Packard, USA) attraverso cui è stato possibile acquisire ed elaborare i dati. Per la separazione cromatografia di PYR è stata utilizzata una colonna PHENOMENEX Inertsil Ph-3,5 $\mu$ m (2,1 x 150 mm) termostata a 30°C. Il volume del campione iniettato era di 20 $\mu$ L.

La fase mobile utilizzata era composta da:

- “solvente A”: 0,1% Acido formico
- “solvente B”: 0,1% Acido formico in metanolo.

Il programma di eluizione prevedeva un gradiente dal 20% al 40% di “solvente B” nei primi 5 min, un gradiente dal 40% al 60% di “solvente B” nei successivi 5 min e, infine, un’eluizione isocratica con 60% di “solvente B” fino a fine corsa cromatografia (21,0 min). Il flusso della fase mobile, costante per tutta la corsa cromatografia, è di 0,4 mL/min e il  $t_R$  della PYR era di 15,6 min.

La concentrazione di substrato (10  $\mu$ M) utilizzata nelle varie sessioni sperimentali è stata scelta sulla base dell’intensità del segnale analitico, al fine di garantire una facile integrazione del picco cromatografico anche in presenza di una possibile deplezione dell’analita pari al 90% del quantitativo iniziale (tempo 0).

#### 4.2.5 Analisi LC-DAD-MS

L'analisi dei surnatanti di reazione mediante LC-DAD-MS è stata condotta utilizzando un sistema cromatografico Agilent 1290 Infinity (comprendente una pompa binaria, un degasatore per i componenti della fase mobile, un autocampionatore, un comparto colonna termostato e un rivelatore DAD) accoppiato ad uno spettrometro di massa XEVO G2S (Waters) a ionizzazione *elettrospray* (ESI)/quadrupolo(Q)/tempo di volo (TOF).

La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 HD (2.1 x 50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ), termostata a 35°C. Il volume del campione iniettato era di 10  $\mu\text{L}$ .

La fase mobile utilizzata era composta da:

- un "solvente A" costituito da 0,1% acido formico in acqua
- un "solvente B" costituito da 0,1% acido formico in metanolo.

Il programma di eluizione prevedeva un'eluizione isocratica con l'80% del "solvente A" nei primi 3 min, un gradiente dal 20% al 40% di "solvente B" per 5 min, seguito da un gradiente dal 40% al 60% di "solvente B" nei successivi 12 min. Il flusso della fase mobile, mantenuto costante per tutta la durata della corsa, era di 0,2 mL/min. Il rivelatore DAD era impostato alle lunghezze d'onda di 220 e 450 nm.

Nelle suddette condizioni cromatografiche, il  $t_R$  della pirimetamina era di 12,8 min.

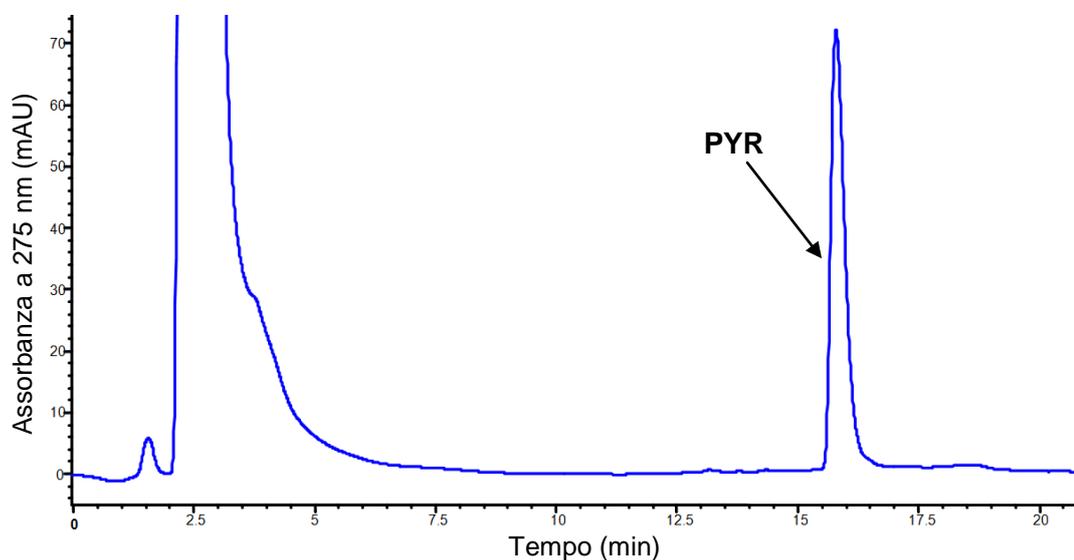
Lo spettrometro di massa XEVO G2S operava nelle seguenti condizioni: ionizzazione *elettrospray* in modalità ioni positivi; voltaggio del capillare, 1.5 kV; voltaggio del cono, 40 V; temperatura della sorgente, 100°C; temperatura del gas azoto di desolvatazione, 350°C; flusso del gas di desolvatazione 800 L/ora; energia di collisione, 6 V (analisi MS). I dati spettrometrici sono stati acquisiti in modalità *full scan* in un intervallo di  $m/z$  (rapporto massa atomica su carica dello ione) compreso tra 50 e 1200 e con tempo di campionamento di 1 secondo.

Per la calibrazione continua dello spettrometro (segnale di *lock*) è stato usato il picco fornito in ione positivo dalla Leu-encefalina ( $m/z = 556.2772$ ) infusa con flusso costante di  $\mu\text{L}/\text{min}$ . L'analisi degli spettri in modalità MS è stata effettuata con il *software* MassLynx v.4.1 (Waters).

## 4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.3.1 Valutazione della stabilità metabolica di PYR

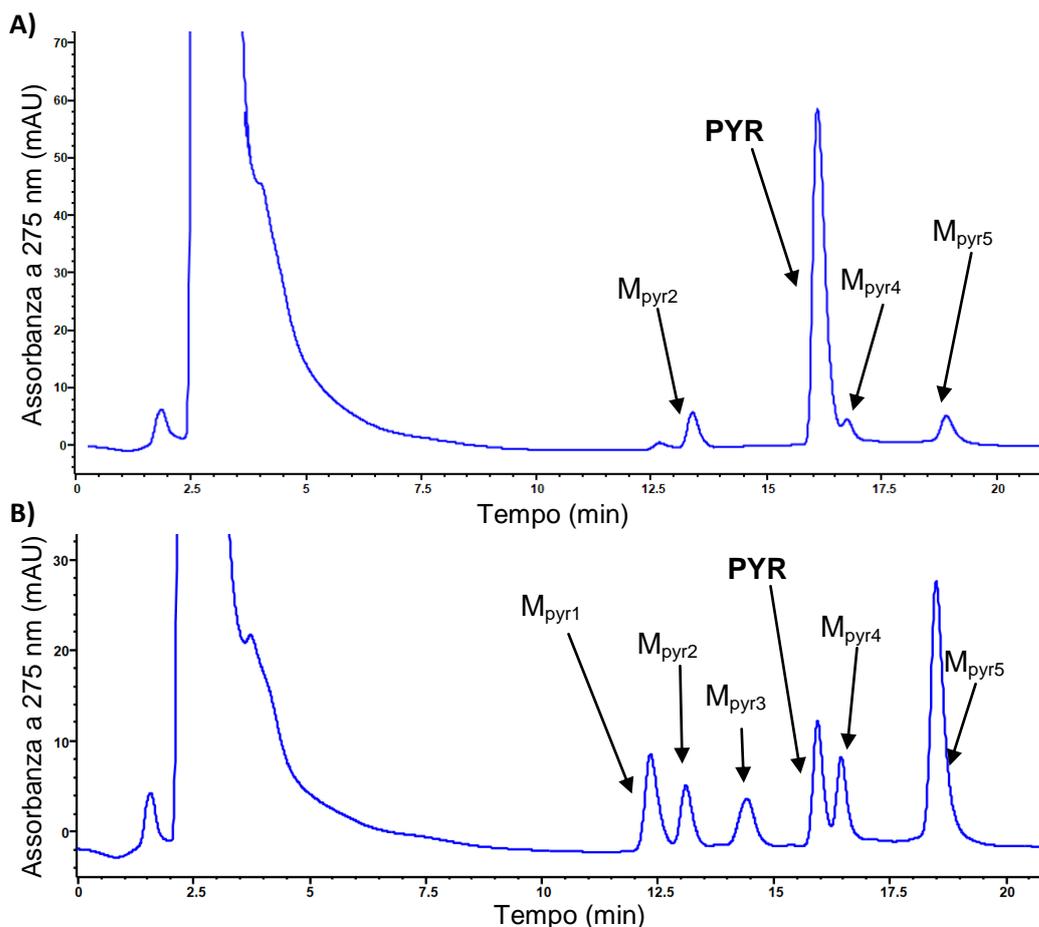
Come anticipato nella sezione “*Introduzione*”, le informazioni relative al destino metabolico della pirimetamina (PYR) sono molto scarse, nonostante il suo impiego in terapia come agente antiprotozario, da oltre 60 anni. La necessità di una valutazione relativa alla stabilità metabolica di PYR risulta ancora più critica qualora il farmaco trovi impiego nel trattamento di neoplasie con espressione costitutiva di STAT3 (vedi “*Introduzione*”). A tal fine, una prima serie di esperimenti si proponeva di valutare la possibile ossidazione della PYR da parte di enzimi microsomiali epatici NADPH-dipendenti. Il composto è stato incubato a per diversi tempi con microsomi epatici di diversa origine sia in assenza sia in presenza del cofattore NADPH; tale cofattore è essenziale ai fini delle ossidazioni mediate da alcuni enzimi microsomiali, *in primis* i citocromi P450 (CYP). Il farmaco è risultato essere relativamente stabile in presenza di un *pool* di microsomi umani da donatori di entrambi i sessi (**Fig. 28**).



**Fig. 28. Cromatogramma relativo all'analisi HPLC di miscele di incubazione di PYR con microsomi epatici umani in presenza di NADPH.**

PYR (50  $\mu$ M) è stata incubata a 37°C per 120 min con microsomi epatici umani pool di entrambi i sessi (1 mg proteina/mL) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) in presenza di NADPH (2 mM). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione “*Materiali e metodi*”.

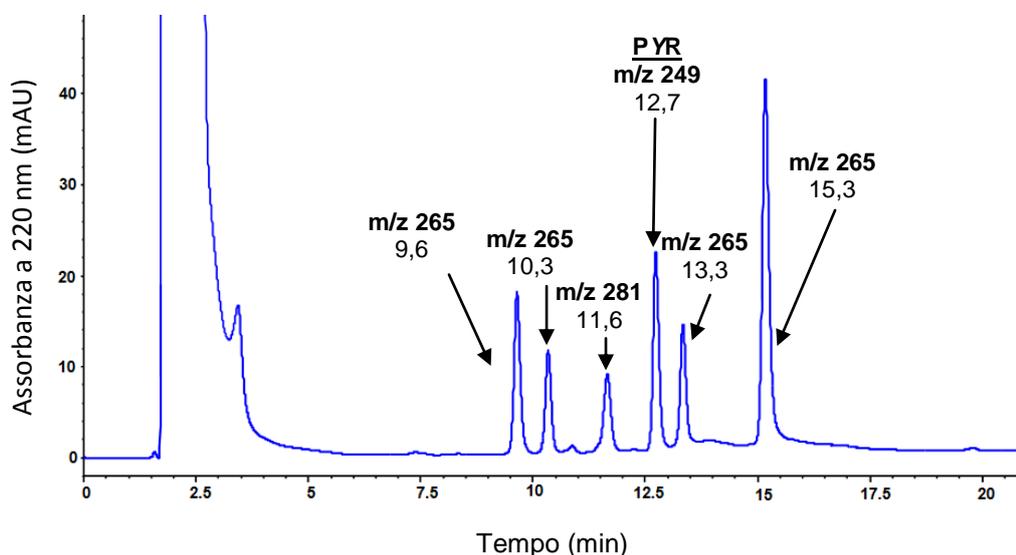
Per contro PYR va incontro a biotrasformazione in almeno tre metaboliti quando incubata con microsomi epatici di ratto maschio in presenza di NADPH (**Fig. 29A**). Questi risultati non sorprendono se si tiene conto quanto riportato in letteratura relativamente all'emivita plasmatica del farmaco preso in esame. PYR, infatti, presenta un  $t_{1/2}$  nell'uomo pari a circa 85 h, a differenza di quanto osservato nel ratto ( $t_{1/2}$  pari a circa 8 h) [Cavallito *et al.*, 1978]. La biotrasformazione microsomiale epatica della PYR è risultata, inoltre, più rapida in presenza di microsomi di ratto maschio pretrattato con fenobarbital (PB-RLMs), noto induttore in questa specie animale di alcuni enzimi CYP tra cui CYP3A1, CYP3A2 e CYP2B1 [Kishida *et al.*, 2008]. In particolare, l'incubazione di PYR con PB-RLMs conduce alla formazione di almeno 5 metaboliti che presentano un significativo assorbimento a 275 nm ( $M_{\text{pyr}1-5}$ , cromatogrammi di **Fig. 29B**).



**Fig. 29. Cromatogrammi relativi all'analisi HPLC di miscele di incubazione di PYR con microsomi epatici di ratto maschio in presenza di NADPH.**

PYR (50  $\mu\text{M}$ ) è stata incubata a 37°C per 120 min con microsomi epatici di ratto maschio non trattato (1 mg/ml; A) o con microsomi epatici di ratto maschio trattato con fenobarbital (1 mg/ml; B) in presenza di NADPH (2mM). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi"

Successivi esperimenti LC-MS, condotti in stretta collaborazione con il Dott. Dalzoppo (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Padova), hanno evidenziato come gli spettri di massa dei picchi cromatografici  $M_{\text{pyr}1}$ ,  $M_{\text{pyr}2}$ ,  $M_{\text{pyr}4}$ ,  $M_{\text{pyr}5}$  si caratterizzino per la presenza di un picco con  $m/z$  pari a 265 indicativo di uno ione positivo con massa molecolare superiore di 16 Da rispetto allo ione positivo derivante da PYR ( $m/z = 249$ ). Per quanto riguarda il metabolita  $M_{\text{pyr}3}$ , il relativo spettro MS presenta un picco con  $m/z = 281$ ; ciò è indice della presenza di una specie chimica con massa molecolare superiore di 32 Da rispetto alla PYR (prodotto di diossigenazione) (**Fig. 30**).

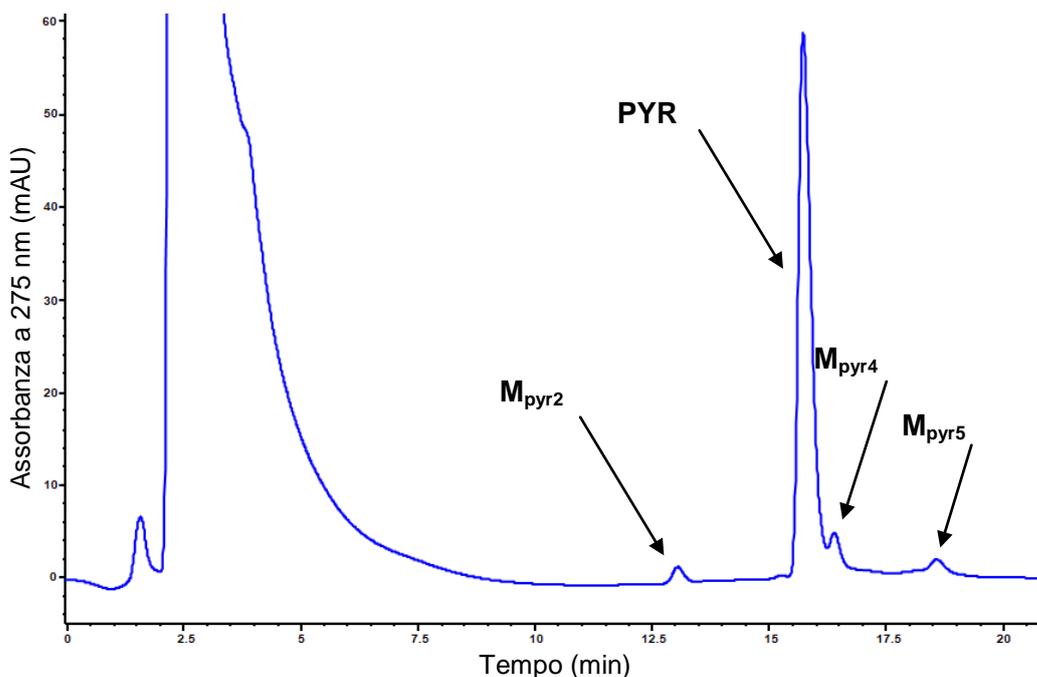


**Fig. 30.** Analisi LC-DAD del surnatante di una miscela di incubazione di PYR con microsomi epatici di ratto maschio trattato con fenobarbital in presenza di NADPH.

PYR (50  $\mu\text{M}$ ) è stato incubato a 37°C per 120 min con microsomi epatici di ratto maschio trattato con fenobarbital (1 mg di proteina/ml) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) in presenza di NADPH (2mM). In corrispondenza di ciascun picco cromatografico sono riportati i rispettivi valori relativi al rapporto  $m/z$  e al tempo di ritenzione.

È interessante notare come PYR sia metabolizzata in  $M_{\text{pyr}2}$ ,  $M_{\text{pyr}4}$  e  $M_{\text{pyr}5}$  seppur lentamente quando incubata con microsomi epatici ottenuti da un soggetto trattato con fenobarbital (**Fig. 31**). L'ultima serie di esperimenti condotti aveva l'obiettivo di valutare la possibile glucuronidazione della PYR o dei suoi prodotti di ossidazione. La PYR presenta infatti due gruppi amminici aromatici potenziali siti di glucuronidazione (N-glucuronidazione) [Parkinson e Ogilvie, 2010]. Quindi, *in primis* la PYR è stata incubata a 37°C per 120 min con microsomi

epatici di ratto maschio PB (1 mg di proteina/mL) in presenza del cofattore acido UDP-glucuronico (UDPGA; 5 mM). In queste condizioni sperimentali la PYR è risultata essere stabile (dati non mostrati).



**Fig. 31.** Cromatogramma relativo all'analisi HPLC di miscele di incubazione di PYR con microsomi epatici umani ottenuti da un soggetto trattato con fenobarbital.

*PYR (50  $\mu$ M) è stata incubata a 37°C per 120 min con microsomi epatici umani ottenuti da un soggetto trattato con fenobarbital (codice H112; 1 mg/ml) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) in presenza di NADPH (2mM). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi".*

Successivamente, nel tentativo di studiare la possibile coniugazione con acido glucuronico dei prodotti di ossidazione della PYR, sono state condotte delle incubazioni a 37°C per 60 min contenenti PYR, microsomi epatici di ratto maschio trattato con fenobarbital, NADPH e UDPGA. Il profilo cromatografico ottenuto è risultato indistinguibile da quello precedentemente ottenuto incubando il farmaco con la medesima frazione microsomiale epatica in presenza di NADPH ma in assenza di UDPGA (**Fig. 29 B**), dato che suggerisce l'assenza di una significativa glucuronidazione di PYR e dei suoi metaboliti ossidativi nelle condizioni sperimentali adottate.

In conclusione, i dati riportati mostrano come PYR, nelle condizioni sperimentali adottate, non vada incontro a significativa biotrasformazione catalizzata da enzimi epatici umani appartenenti alle famiglie CYP e glucuronosiltrasferasi. Il trattamento con fenobarbital, potente induttore di alcune forme di CYP, evidenzia anche nell'uomo un lento metabolismo ossidativo con la formazione di tre metaboliti:  $M_{\text{pyr}2}$ ,  $M_{\text{pyr}4}$  e  $M_{\text{pyr}5}$  (si vedano gli esperimenti di **Fig. 31**). È interessante notare, infine, come i metaboliti ottenuti incubando PYR con microsomi epatici preparati da un soggetto in trattamento abbiano lo stesso  $t_R$  e lo stesso spettro di assorbimento di  $M_{\text{pyr}2}$ ,  $M_{\text{pyr}4}$  e  $M_{\text{pyr}5}$ , ottenuti dalle incubazioni del farmaco con i microsomi epatici di ratto maschio.



## 5. L'O-VANILLINA E I SUOI ANALOGHI

### 5.1 INTRODUZIONE

#### 5.1.1 *La vanillina*

Numerose sostanze naturali, in modo particolare vari composti fenolici, sono caratterizzate da attività antiossidante e antitumorale potenzialmente sfruttabili terapeuticamente [Bezerra *et al.*, 2016]. Fra questi si annovera un'aldeide fenolica, contenuta in elevata concentrazione nei baccelli della vaniglia (*Vanilla planifolia*). La storia della vaniglia è immersa nella tradizione culinaria, tuttavia è meno noto il suo utilizzo in ambito medico-botanico che risale ad un'antica cultura contadina mesoamericana [Anuradha *et al.*, 2013].

La ricerca scientifica ha riconosciuto alla vanillina potenzialità antitumorali e anticlastogene, poiché in grado di inibire la tumorigenesi e proteggere l'integrità cromosomiale [Lirdprapamongkol *et al.*, 2005; Anuradha *et al.*, 2013]. Le proprietà chemiopreventive della vanillina a tutt'oggi descritte includono un'attività *scavenger* di specie reattive dell'ossigeno, l'inibizione dell'attivazione di procancerogeni, attività antinfiammatoria ed antiangiogenica [Lirdprapamongkol *et al.*, 2009 e referenze citate; Marton *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017]. Alcuni Ricercatori hanno inoltre dimostrato come la somministrazione orale quotidiana di vanillina, pur non essendo in grado di interferire con la crescita del tumore primitivo, sia in grado tuttavia di inibire la metastatizzazione polmonare in topi portatori di adenocarcinoma mammario 4T1. Studi *in vitro* condotti dagli stessi autori hanno evidenziato inoltre come la vanillina, ma non il suo prodotto di biotrasformazione ossidativa, l'acido vanillico, sia in grado di inibire l'invasione e la migrazione delle cellule 4T1 [Lirdprapamongkol *et al.*, 2005].

#### 5.1.2 *NFkB: generalità e ruolo nella trasformazione tumorale*

La patogenesi tumorale varia in base alla specifica trasformazione neoplastica presa in esame; tuttavia la deregolazione dei *pathway* cellulari è una caratteristica comune a tutti i tumori. Nella tumorigenesi, infatti, alcune vie di segnale giocano un ruolo fondamentale concorrendo alla trasformazione tumorale mediante

l'eccessiva proliferazione cellulare, la resistenza all'apoptosi, la promozione dell'angiogenesi e la metastatizzazione, determinando lo sviluppo e la progressione neoplastica [Adjei *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2018].

È noto che molti tumori umani sono caratterizzati da una *up*-regolazione dell'attività NFκB (*Nuclear factor kappa-B*). L'attivazione costitutiva di NFκB è una caratteristica tipica di molte neoplasie quali il melanoma, il tumore pancreatico, ovarico, della mammella e del colon [Amiri e Richmond, 2005]. In condizioni fisiologiche NFκB regola l'espressione dei geni coinvolti nelle reazioni immunologiche in risposta a citochine proinfiammatorie, batteri e infezioni virali. Esso è responsabile, inoltre, della modulazione dell'espressione di fattori coinvolti nella crescita cellulare e nell'apoptosi [Amiri e Richmond, 2005; Tilborghs *et al.*, 2017]. L'aumentata attivazione di NFκB, tuttavia, determina un aumento dell'espressione di mediatori proinfiammatori e causa uno stato infiammatorio acuto nei polmoni e in altri organi, così come incrementa lo sviluppo di disfunzioni multiorgano e trasformazioni neoplastiche [Amiri e Richmond, 2005; Xia *et al.*, 2018].

L'NFκB è un'importante famiglia di fattori di trascrizione composta da 5 membri: Rel (cRel), p65 (RelA, NFκB3), RelB, p105/p50 (NFκB1) e p100/p52 (NFκB2). Queste proteine, normalmente, sono sequestrate nel citoplasma in uno stato inattivo in virtù del legame con 3 fattori di inibizione (IκBα, IκBβ e IκBε) che ne impediscono la traslocazione nel nucleo. Stimoli extracellulari, quali il TNFα, l'IL-1 o il lipopolisaccaride, causano l'attivazione di NFκB. Questo processo è catalizzato da un complesso di enzimi formato dalle chinasi di IκB (IKK1 e IKK2) e almeno una proteina accessoria (con attività non catalitica), chiamata NEMO (*NFκB Essential Modulator*). NFκB, quindi, trasloca nel nucleo, promuovendo la trascrizione dei geni *target* [Amiri e Richmond, 2005; Tilborghs *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2018] (**Fig. 32**).

Attualmente, lo studio del *signaling* di NFκB rappresenta un *focus* nella ricerca scientifica in campo oncologico in virtù del suo coinvolgimento nell'immunità cellulare, nell'infiammazione, nello stress, così come nella regolazione della differenziazione e proliferazione cellulare [Marton *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2018].

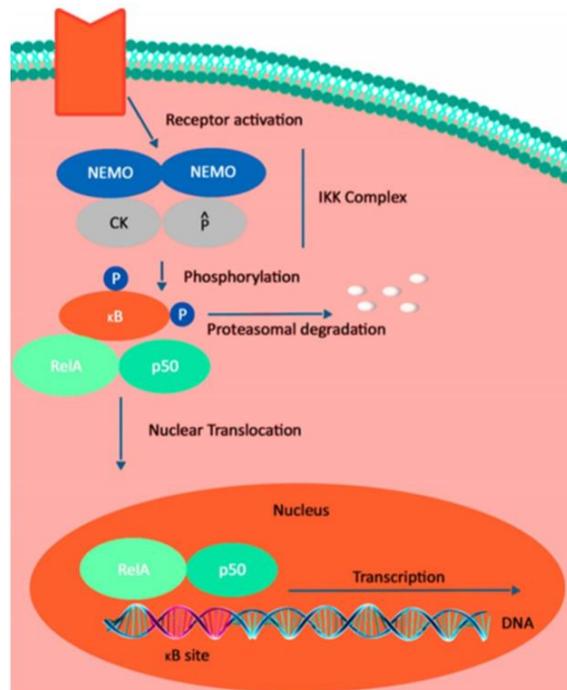


Fig. 32. Attivazione canonica del *pathway* di NFκB [Tilborghs *et al.*, 2017].

Attraverso il controllo della risposta infiammatoria, NFκB influenza lo sviluppo e la progressione del tumore mediante un'eccessiva attivazione dell'immunità innata e un'anomala crescita cellulare. È stato dimostrato che nel microambiente tumorale vi è un *loop a feedback* positivo in base al quale l'elevata espressione di geni proinfiammatori, incrementata attraverso l'attivazione del *pathway* di NFκB, è in grado di promuovere lo sviluppo del tumore e l'espressione di proteine proinfiammatorie che, mediante il legame con specifici dimeri attivati di NFκB, determinano un ulteriore aumento dei geni proinfiammatori [Xia *et al.*, 2018].

Nel caso del melanoma, infatti, NFκB è in grado di attivare l'espressione di una serie di proteine antiapoptotiche, quali TRAF1 (*Tumor necrosis factor receptor associated factor 1*), TRAF2, IAP (*inhibitor of apoptosis*) e ML-IAP (*melanoma inhibitor of apoptosis*). Al tempo stesso, l'attivazione nucleare costitutiva di NFκB è responsabile dell'espressione endogena di chemiochine, interleuchine (IL)-1 e IL-6, così come di fattori di crescita promuoventi il melanoma [Amiri e Richmond, 2005]. Studi relativamente recenti suggeriscono che le MAP (*Mitogen Activated Protein*) chinasi, come la NIK (*NFκB-inducing*

*kinase*) e la MAP chinasi chinasi 1, possono partecipare all'attivazione di NFκB e alla sua traslocazione nel nucleo [Amiri e Richmond, 2005].

Alla luce di queste evidenze l'inibizione di NFκB potrebbe rappresentare una valida strategia nel trattamento antitumorale [Amiri e Richmond, 2005; Tilborghs *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2018].

### **5.1.3 Inibitori di NFκB**

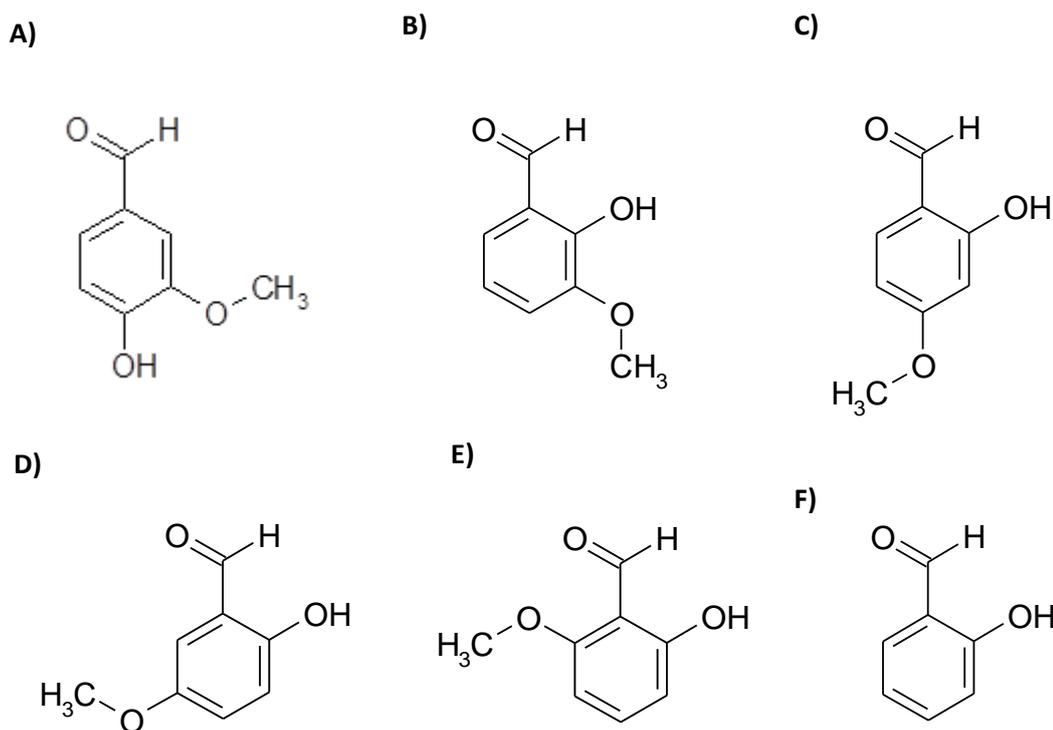
È noto che diversi composti naturali, tra cui la vanillina, sono in grado di interferire con la cascata del segnale di NFκB [Xia *et al.*, 2018]. L'attività anti-NFκB della vanillina potrebbe essere il principale meccanismo alla base della sua attività anti-invasiva, anti-metastatica e anti-angiogenica (vedi paragrafo 5.1.2). Inoltre, la vanillina si è dimostrata in grado di inibire l'attivazione di NFκB indotta da vari stimoli infiammatori in diversi modelli sperimentali, sia *in vitro* sia *in vivo* [Marton *et al.*, 2016 e referenze citate].

Poiché fra gli attivatori di NFκB vi sono vari farmaci antineoplastici (tra cui, ad es. doxorubicina, il cisplatino e i taxani), e la sovraespressione di tale fattore trascrizionale conferisce un fenotipo di resistenza alla chemioterapia [Godwin, 2013], composti in grado di interferire in qualche modo con il *signaling* mediato da NFκB sono ritenuti potenziali agenti da abbinare all'impiego di chemioterapici convenzionali, al fine di migliorare la risposta terapeutica. Nonostante la vanillina sia caratterizzata da una scarsissima tossicità *in vitro* nei confronti di cellule neoplastiche [Durant e Karran, 2003; Marton *et al.*, 2016], alla luce della sua attività anti-NFκB, essa potrebbe essere impiegata per incrementare l'efficacia del trattamento chemioterapico e, al tempo stesso, può essere considerata un utile *lead* per lo sviluppo di analoghi più efficaci [Marton *et al.*, 2016].

In uno studio recentemente condotto dal nostro Laboratorio in collaborazione con il gruppo di ricerca del Dott. C. Vizler (BRC di Szeged, Ungheria) è stata *screenata* una piccola batteria di aldeidi aromatiche, comprendente la vanillina, per l'attività anti-NFκB e l'attività citotossica *in vitro* nei confronti della linea di melanoma umano A375 [Marton *et al.*, 2016]. Gli esperimenti effettuati hanno permesso di selezionare due composti, rappresentati dalla *o*-vanillina (un isomero strutturale della vanillina) e dalla 2,4,6-triidrossibenzaldeide dotati, a differenza della vanillina, di spiccata citotossicità ed in grado di inibire significativamente

l'attività NFκB, sia basale sia indotta da doxorubicina o 4-idroperossiciclofosfamide nelle cellule A375 [Marton *et al.*, 2016]. Entrambe le aldeidi si sono dimostrate inoltre in grado, dopo somministrazione orale a dosi non tossiche, di inibire significativamente la crescita della linea A375 in topi immunodeficienti [Marton *et al.*, 2016].

Alla luce dei risultati ottenuti, l'*o*-vanillina ed un piccolo gruppo di analoghi strutturali (comprendente la vanillina, la 2-idrossi-4-metossibenzaldeide, la 2-idrossi-5-metossibenzaldeide, la 2-idrossi-6-metossibenzaldeide e la salicilaldeide; **Fig. 33**) sono attualmente in fase di *screening* presso i Laboratori del Dott. C. Vizler (BRC; Szeged, Ungheria) e del Prof. N. Ferri (DSF, Università di Padova) per l'attività antineoplastica.



**Fig. 33.** Formule di struttura della vanillina (A), *o*-vanillina (B), 2-idrossi-4-metossibenzaldeide (C), 2-idrossi-5-metossibenzaldeide (D), 2-idrossi-6-metossibenzaldeide (E), salicilaldeide (F).

Parallelamente gli stessi composti sono oggetto di studio presso il nostro Laboratorio, nell'intento di ottenere informazioni circa la loro stabilità metabolica, vista l'assenza in letteratura, con la sola eccezione della vanillina [Wong e

Sourkes, 1966; Panoutsopoulos *et al.*, 2004; Panoutsopoulos e Beedham, 2005; Yu *et al.*, 2013], di informazioni in merito.

Come più volte ribadito, infatti, la caratterizzazione della stabilità metabolica di un potenziale farmaco, al pari degli studi di efficacia e tossicità, è una fase importante nel processo di ricerca e sviluppo di nuove entità chimiche terapeuticamente utili, in quanto tale fattore può condizionarne la biodisponibilità e i profili di attività biologica e tossicità.

## 5.2 MATERIALI E METODI

### 5.2.1 Reagenti

L'acqua ultrapura con cui sono stati preparati tutti i tamponi e le soluzioni acquose utilizzate nel presente lavoro di tesi è stata ottenuta tramite un apparecchio PureLab Option-Q (Elga LabWater, High Wycombe, UK).

Acido cloridrico e acido acetico sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagenti S.p.A. (Milano).

Il citosol di fegato umano (*pool* da 50 donatori di entrambi i sessi), di ratto Sprague-Dawley (*pool* da individui di solo sesso maschile) sono stati ottenuti dalla Xenotech LLC (Lenexa, Kansas, USA).

Tutti gli altri reagenti utilizzati per il progetto di ricerca in questione, compresi l'acido trifluoroacetico (TFA), il nicotinnamide adenina dinucleotide ossidato (NAD<sup>+</sup>), le aldeidi aromatiche (vanillina, *o*-vanillina, 2-idrossi-4-metossibenzaldeide, 2-idrossi-5-metossibenzaldeide, 2-idrossi-6-metossibenzaldeide e salicilaldeide); gli inibitori enzimatici isovanillina, allopurinolo e menadione, sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich S.r.l. (Milano).

### 5.2.2 *Caratterizzazione della stabilità dell'o-vanillina e dei suoi analoghi strutturali, vanillina, 2-idrossi-4-metossibenzaldeide, 2-idrossi-5-metossibenzaldeide, 2-idrossi-6-metossibenzaldeide e salicilaldeide in presenza di citosol epatico*

#### *Condizioni generali di incubazione e processazione dei campioni*

Nell'intento di valutare la possibile ossidazione delle aldeidi oggetto dello studio, da parte di enzimi citosolici epatici non richiedenti NAD<sup>+</sup>, ciascun composto (concentrazione finale, 10 µM) è stato incubato in un mezzo di reazione (volume finale, 0,2 mL) contenente 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4) e 0,1 mg di proteina/mL di citosol epatico umano, di ratto o di topo. Le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta della frazione citosolica epatica agli altri componenti del mezzo di reazione precedentemente incubati per 3 min in bagnetto

termostato a 37°C. Tutte le reazioni sono state condotte a 37°C e arrestate, dopo opportuni intervalli di tempo, mediante l'aggiunta a ciascun campione di 0,1 mL di TFA 0,3% (v/v) mantenuto a temperatura ambiente. Campioni "tempo 0" sono stati preparati, aggiungendo tutti i componenti presenti nella miscela di reazione (volume finale, 0,2 mL) a provette contenenti 0,1 mL di TFA 0,3% (v/v). I campioni così ottenuti sono stati agitati tramite agitatore a vortice e centrifugati a 20.000g, per 10 min a 4°C. Aliquote dei surnatanti sono state quindi trasferite in fialette da autocampionatore e successivamente analizzate mediante HPLC con rivelazione *Diode Array Detector* (DAD) (si veda "Analisi HPLC").

Il possibile contributo di enzimi citosolici epatici umani richiedenti NAD<sup>+</sup> al metabolismo dei composti studiati è stato valutato includendo nella miscela di reazione, la cui composizione è stata precedentemente riportata, il cofattore NAD<sup>+</sup> alla concentrazione finale 1 mM. In questa serie di esperimenti il tempo di incubazione era pari a 30 min e la processazione dei campioni identica a quanto sopra riportato per le reazioni condotte in assenza di NAD<sup>+</sup>.

### ***Valutazione del possibile ruolo di aldeide ossidasi (AOX) e xantina ossidasi (XO) murine***

Allo scopo di valutare il potenziale coinvolgimento di AOX e/o XO nella biotrasformazione citosolica epatica delle aldeidi studiate, ciascun composto (concentrazione finale, 10 µM) è stato incubato con 0,1 mg di proteina/mL di citosol epatico di topo maschio in 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4), in assenza (controllo) e in presenza di un inibitore di AOX (isovanillina o menadione; concentrazione finale: 100 µM), o dell'inibitore di XO allopurinolo (concentrazione finale: 100 µM) [Clarke *et al.*, 1995]. In questa serie di esperimenti il tempo di incubazione era pari a 15 min e la processazione dei campioni identica a quanto sopra riportato (vedi sottoparagrafo "Condizioni generali di incubazione e processazione dei campioni").

### ***5.2.3 Analisi HPLC***

L'analisi dei surnatanti di reazione è stata condotta utilizzando un cromatografo Hewlett-Packard/Agilent serie 1100 (Agilent Technologies GMBH, Germany) costituito da una pompa quaternaria, un degasatore per i componenti

della fase mobile, un autocampionatore termostato, un comparto colonna termostato, un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a lunghezza d'onda variabile e un rivelatore DAD. L'apparecchiatura, controllata da un Personal Computer dotato di uno specifico *software* (Chemstation for LC, Hewlett-Packard, USA) ha reso possibile l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

Il rivelatore DAD è stato impostato al massimo di assorbimento (nelle nostre condizioni sperimentali) di ciascuna delle aldeidi studiate, ovvero 270 nm (*o*-vanillina), 310 nm (vanillina), 285 nm (2-idrossi-4-metossibenzaldeide), 265 nm (2-idrossi-5-metossibenzaldeide, 2-idrossi-6-metossibenzaldeide, salicilaldeide).

Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna SymmetryShield RP 18 (4,6 x 150 mm, 5 µm), termostata a 45°C.

Il volume del campione iniettato era di 70 µL.

La fase mobile utilizzata per la separazione cromatografica era costituita da:

- un "solvente A" rappresentato da 10 mM bicarbonato di ammonio (pH 6,8)/MeOH (97:3, v/v);
- un "solvente B" rappresentato da MeOH 100%.

Il programma di eluizione seguiva un andamento isocratico con 82% di "solvente A" nei primi 2, seguita da un gradiente da 18% a 45% di "solvente B" fino al termine della corsa cromatografica (18 min). Il flusso della fase mobile, mantenuto costante per tutta la durata della corsa, era di 1 mL/min. In queste condizioni cromatografiche i  $t_R$  delle aldeidi aromatiche studiate sono compresi tra 6,8 e 15,0 min.

La concentrazione di substrato (10 µM) utilizzata nelle varie sessioni sperimentali è stata scelta sulla base dell'intensità del segnale analitico, al fine di garantire una facile integrazione del picco cromatografico anche in presenza di una possibile deplezione dell'analita pari al 90% del quantitativo iniziale (tempo 0).

#### **5.2.4 Analisi dei dati**

La stabilità dell'*o*-vanillina e suoi analoghi è stata espressa come percentuale (media ± deviazione standard; n= 3) di analita residuo nel mezzo di incubazione calcolata rapportando l'area del rispettivo picco cromatografico a ciascun tempo

di incubazione con l'area del rispettivo picco cromatografico relativa al campione tempo "0 min".

Dettagli circa l'analisi statistica dei dati (laddove effettuata) sono riportate nella didascalia della relativa figura.

L'emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) dal mezzo di incubazione delle aldeidi analizzate è stata calcolata mediante l'equazione:

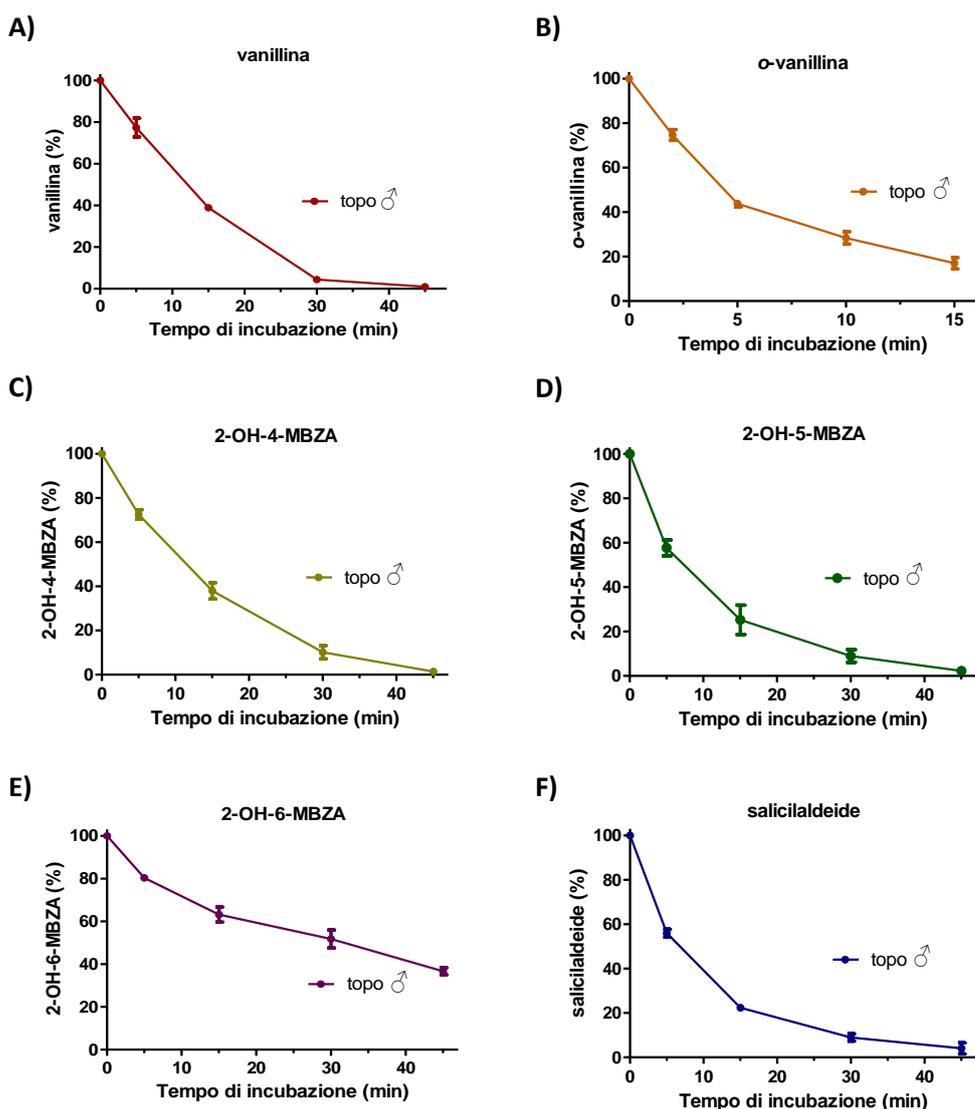
$$t_{1/2} = 0,693/k$$

dove k rappresenta la pendenza della retta ottenuta dalla regressione lineare dei dati ottenuti diagrammando il logaritmo naturale della quantità relativa (%) di substrato rimanente nel mezzo di reazione, in funzione del tempo di incubazione (min).

## 5.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Il metabolismo di composti a struttura aldeidica è noto essere mediato, prevalentemente, da enzimi ossidativi a localizzazione citosolica rappresentati da aldeide ossidasi, aldeide deidrogenasi e xantina ossidasi [Parkinson e Ogilvie, 2010; Panoutsopoulos *et al.*, 2004]; di conseguenza, la valutazione della stabilità metabolica della *o*-vanillina e dei suoi analoghi si è basata sull'impiego, quali sorgenti di enzimi, di frazioni citosoliche epatiche umane, di ratto e di topo. Sia le AOX che le XO, entrambi enzimi citosolici la cui attività è indipendente dalla disponibilità del cofattore nicotinammide adenina dinucleotide ossidato (NAD<sup>+</sup>) o nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ossidato (NADP<sup>+</sup>), sono note per la loro capacità di catalizzare l'ossidazione di una grande varietà di aldeidi trasformandole nel corrispondente acido carbossilico [Panoutsopoulos *et al.*, 2004 e referenze citate]. Studi precedentemente condotti da Panoutsopoulos *et al.* utilizzando il modello delle fettine di fegato di cavia, hanno dimostrato come la vanillina sia substrato di AOX e non vada incontro ad un significativo metabolismo mediato da XO e ALDH [Panoutsopoulos *et al.*, 2004; Panoutsopoulos e Beedham, 2005]. Sulla base di tali premesse, le aldeidi aromatiche oggetto dello studio sono state incubate, alla concentrazione finale 10 µM e alla temperatura di 37°C, con citosol epatico di topo, di ratto e umano per diversi tempi.

I grafici riportati in **Fig. 34**, **35** e **36** mostrano l'andamento temporale dei livelli di ciascuna delle aldeidi studiate presente nelle miscele di incubazione contenenti rispettivamente citosol di fegato di topo maschio, di ratto maschio e umano. È interessante notare come la velocità di scomparsa del substrato dalle miscele di reazione vari sensibilmente in funzione della specie considerata. Tutte le aldeidi studiate sono risultate essere relativamente instabili quando incubate in presenza di citosol di fegato di topo maschio, con emivite di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) comprese tra 5,9 min (*o*-vanillina) e 33,5 min (2-idrossi-6-metossibenzaldeide) (**Fig. 34**). Gli stessi composti hanno mostrato una stabilità nettamente superiore in miscele di incubazione contenenti citosol epatico di ratto (**Fig. 35**) o umano (**Fig. 36**).

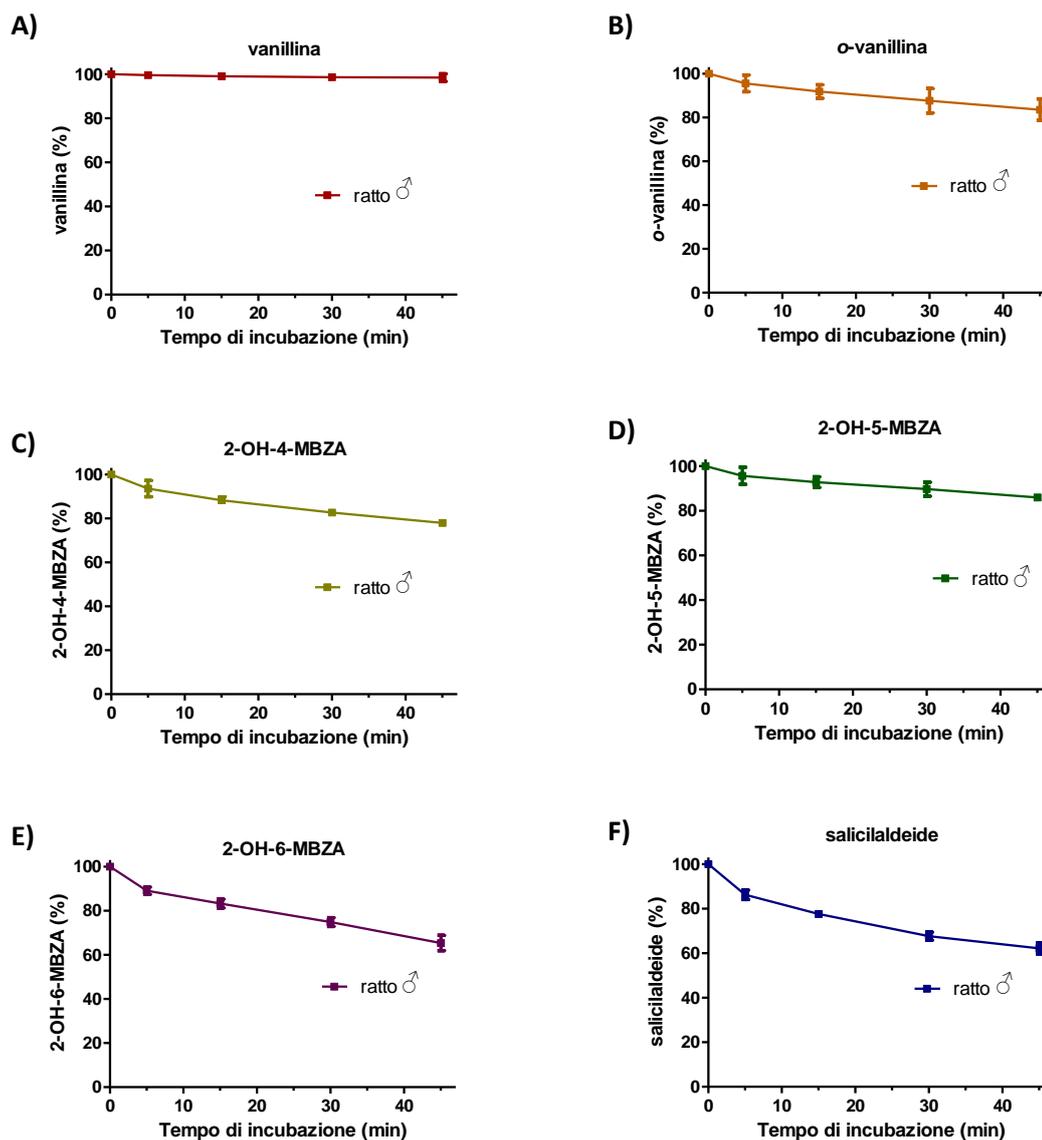


Emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ )	
2-OH-6-MBZA	33,5 min
vanillina	10,9 min
2-OH-4-MBZA	10,7 min
salicilaldeide	10,0 min
2-OH-5-MBZA	8,5 min
o-vanillina	6,0 min

**Fig. 34.** Valutazione della stabilità di vanillina (A), o-vanillina (B), 2-idrossi-4-metossibenzaldeide (2-OH-4-MBZA; C), 2-idrossi-5-metossibenzaldeide (2-OH-5-MBZA; D), 2-idrossi-6-metossibenzaldeide (2-OH-6-MBZA; E), salicilaldeide (F) in presenza di citosol epatico di topo.

Tutti i composti elencati ( $10 \mu\text{M}$ ) sono stati incubati a  $37^\circ\text{C}$  con citosol di topo maschio ( $0,1 \text{ mg proteina/mL}$ ) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,05 \text{ M}$  ( $\text{pH } 7,4$ ). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi". I dati sono espressi come percentuale di composto presente nel mezzo di incubazione a ciascun tempo rispetto al quantitativo presente al tempo 0 min e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti. In alcuni casi le barre degli errori non sono visibili perchè di dimensioni inferiori a quelle del simbolo. In tabella è riportata per ciascun composto l'emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ).

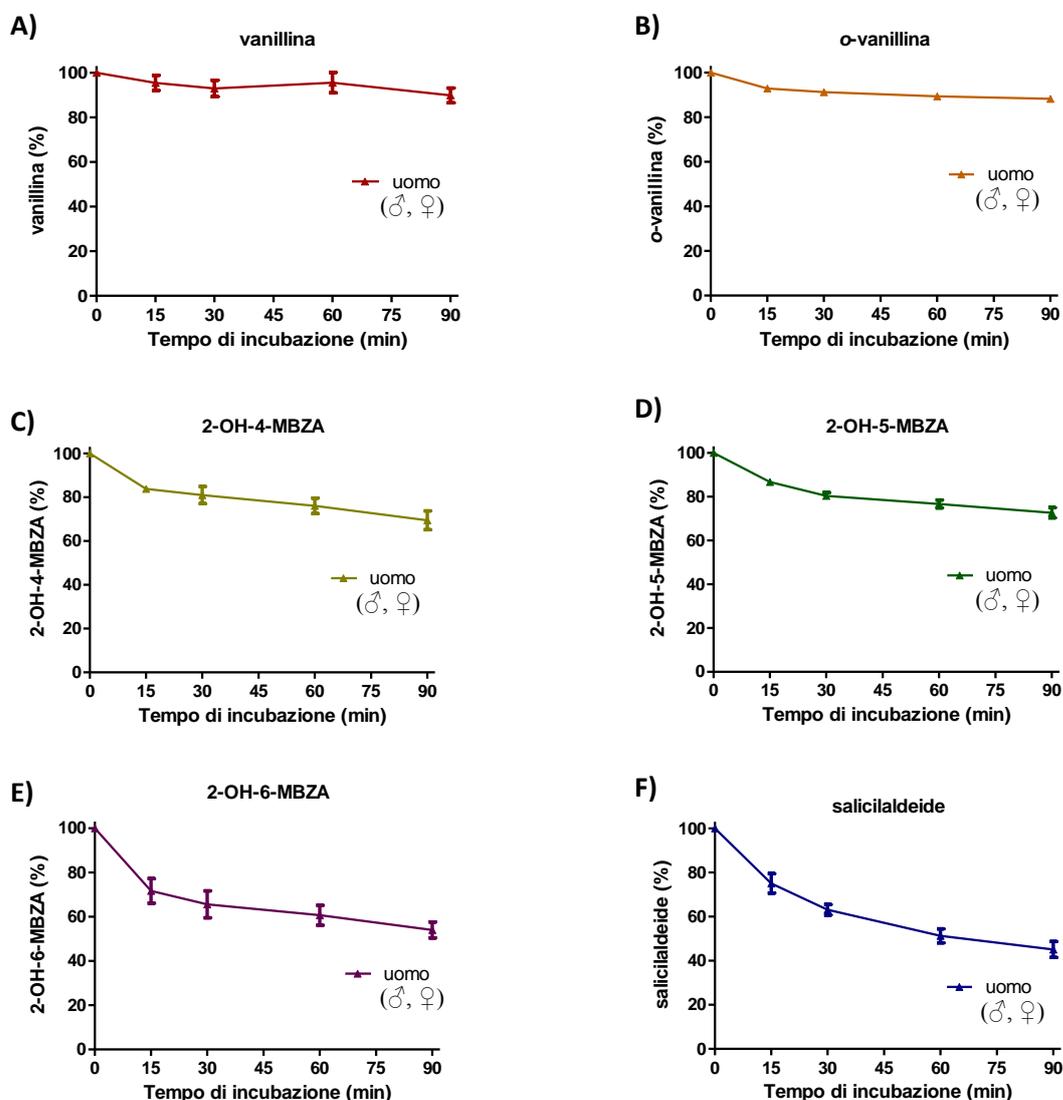
I risultati ottenuti sono in accordo con quanto osservato precedentemente da Arora *et al.* per la vanillina, considerata da alcuni autori, un substrato *marker* di attività AOX. Precisamente l'attività AOX, misurata nel citosol di fegato di topo, ratto, scimmia e uomo in termini di attività vanillina ossidasi è risultata nell'ordine: scimmia > topo >> uomo > ratto [Arora *et al.*, 2012 e referenze citate].



**Fig. 35. Stabilità di vanillina (A), o-vanillina (B), 2-idrossi-4-metossibenzaldeide (2-OH-4-MBZA; C), 2-idrossi-5-metossibenzaldeide (2-OH-5-MBZA; D), 2-idrossi-6-metossibenzaldeide (2-OH-6MBZA; E), e salicilaldeide (F) in presenza di citosol epatico di ratto.**

Tutti i composti elencati (10  $\mu$ M) sono stati incubati a 37°C con citosol di ratto maschio (0,1 mg proteina/mL) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 M (pH 7,4). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I dati sono espressi come percentuale di composto presente nel mezzo di incubazione a ciascun tempo rispetto al quantitativo presente al tempo 0 min e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti. In alcuni casi le barre degli errori non sono visibili perchè di dimensioni inferiori a quelle del simbolo.

È interessante notare come la 2-idrossi-6-metossibenzaldeide sia risultata, tra le aldeidi studiate, la più stabile in presenza di citosol epatico murino ma la più rapidamente metabolizzata in presenza di citosol di fegato di ratto.



**Fig. 36. Stabilità di vanillina (A), o-vanillina (B), 2-idrossi-4-metossibenzaldeide (2-OH-4-MBZA; C), 2-idrossi-5-metossibenzaldeide (2-OH-5-MBZA; D), 2-idrossi-6-metossibenzaldeide (2-OH-6-MBZA; E), e salicilaldeide (F) in presenza di citosol di fegato umano.**

Tutti i composti elencati (10  $\mu$ M) sono stati incubati a 37°C con citosol di topo maschio (0,1 mg proteina/mL) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 M (pH 7,4). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I dati sono espressi come percentuale di composto presente nel mezzo di incubazione a ciascun tempo rispetto al quantitativo presente al tempo 0 min e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti. In alcuni casi le barre degli errori non sono visibili perchè di dimensioni inferiori a quelle del simbolo.

Dopo 45 min di incubazione, infatti, la quantità residua di 2-idrossi-6-metossibenzaldeide era pari al 65% della quota iniziale (campione tempo 0 min); le altre aldeidi, con la sola eccezione della benzaldeide (quantità residua pari al 62% della quota iniziale al tempo 45 min) sono invece caratterizzate da una maggiore stabilità (quantità residua pari all'80% della quota iniziale al tempo 45 min). Risultati analoghi sono emersi dagli esperimenti basati sull'impiego di citosol epatico umano (**Fig. 36**) ad indicare una forte similitudine sul piano quantitativo tra uomo e ratto nel metabolismo citosolico NAD(P)<sup>+</sup>-indipendente delle aldeidi aromatiche studiate.

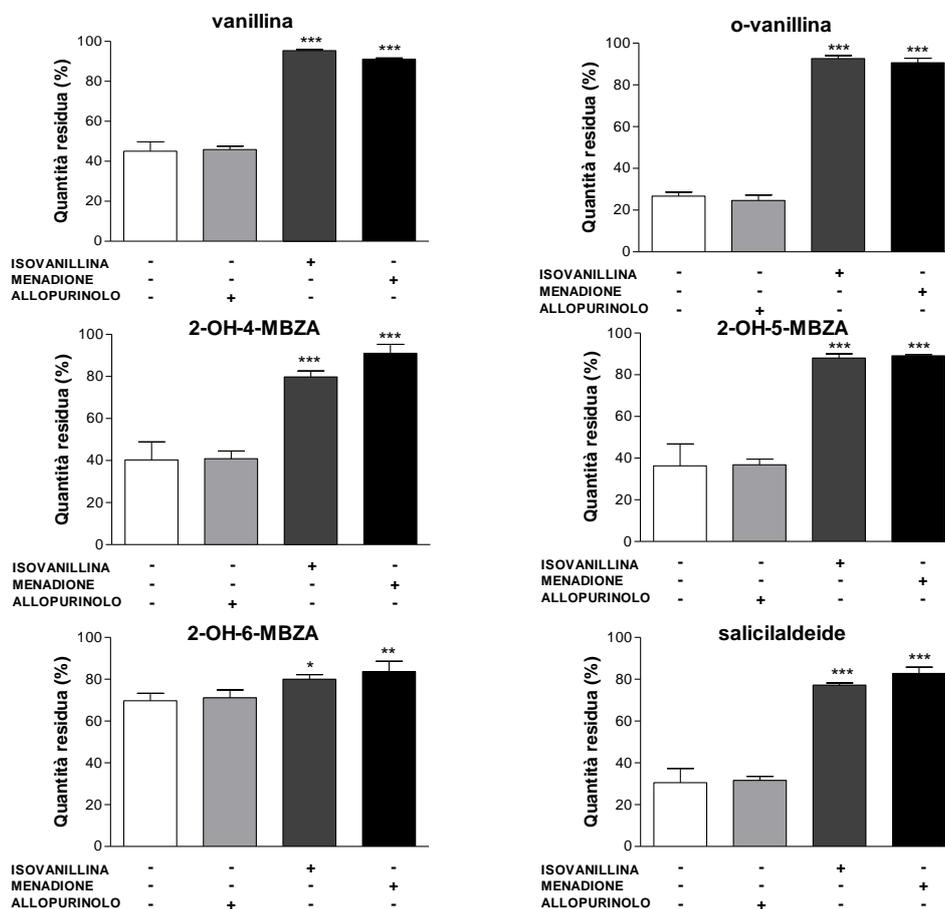
Il ruolo di AOX e XO nel metabolismo citosolico epatico murino delle aldeidi studiate è stato successivamente esplorato grazie all'impiego di inibitori chimici ampiamente utilizzati in letteratura, rappresentati dall'isovanillina (inibitore di AOX), dal menadione (inibitore di AOX) e dall'allopurinolo (inibitore di XO), tutti utilizzati alla concentrazione finale 100 µM [Clarke *et al.*, 1995].

I dati riportati in **Fig. 37** dimostrano come la scomparsa dal mezzo di incubazione di ciascuna delle aldeidi considerate venga inibita sensibilmente dalla presenza degli inibitori di AOX isovanillina e menadione, ma non dall'allopurinolo, un inibitore di XO. I risultati di questi esperimenti indicano quindi il coinvolgimento di una o più AOX murine nella biotrasformazione non solo della vanillina, in analogia a quanto già osservato nella cavia da Panaoutsopoulos *et al.* (2004) utilizzando il modello delle fettine di fegato, bensì di tutte le aldeidi aromatiche prese in considerazione nello studio.

Poiché fra gli enzimi in grado, potenzialmente, di mediare l'ossidazione di composti a struttura aldeidica vi sono le aldeide deidrogenasi (ALDH), enzimi citosolici e mitocondriali (matrice) richiedenti il cofattore NAD<sup>+</sup> (o NADP<sup>+</sup>) [Parkinson e Ogilvie, 2010], in un ultimo *set* di esperimenti, ciascuna delle aldeide di interesse è stata incubata per 30 min con citosol epatico umano (*pool* di donatori di entrambi i sessi) in presenza del cofattore NAD<sup>+</sup>.

I risultati ottenuti sono riportati in **Fig. 38**. Nonostante la loro preliminarità, i dati sino ad ora raccolti suggeriscono una maggiore instabilità delle aldeidi studiate quando l'incubazione con citosol umano era condotta in presenza di NAD<sup>+</sup>, ad indicare il coinvolgimento di uno o più enzimi richiedenti NAD<sup>+</sup>. La quantità residua di ciascuna aldeide presente nel mezzo di incubazione dopo 30

min, infatti, era sensibilmente inferiore a quella precedentemente riscontrata nelle medesime condizioni in assenza del cofattore NAD<sup>+</sup> (si veda la Fig. 36).



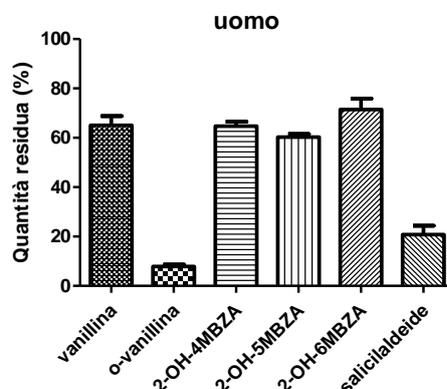
**Fig. 37. Impatto degli inibitori isovanillina, menadione e allopurinolo sulla stabilità delle aldeidi vanillina, o-vanillina, 2-idrossi-4-metossibenzaldeide (2-OH-4-MBZA), 2-idrossi-5-metossibenzaldeide (2-OH-5-MBZA), 2-idrossi-6-metossibenzaldeide (2-OH-6-MBZA), e salicilaldeide in presenza di citosol di fegato di topo.**

Tutte le aldeidi studiate (10 µM) sono state incubate a 37°C con citosol di fegato di topo (0,1 mg/ml) in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M (pH 7,4) per 0 e 15 min, sia in assenza sia in presenza degli inibitori. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I dati sono espressi come percentuale di composto residuo nel mezzo di incubazione dopo 15 min e rappresentano la media ± deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti.

Analisi statistica condotta mediante test di analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA) \*P < 0,05 vs controllo; \*\*P < 0,01 vs controllo; \*\*\*P < 0,001 vs controllo.

Sulla base di questi risultati, successivi esperimenti saranno dedicati alla valutazione del ruolo di ALDH nel metabolismo citosolico delle aldeidi

considerate nelle tre specie di interesse. Tali studi, pertanto, saranno basati sull'impiego di inibitori selettivi di ALDH (es. disulfiram) [Koppaka *et al.*, 2012].



**Fig. 38. Stabilità di vanillina, o-vanillina, 2-idrossi-4-metossibenzaldeide (2-OH-4MBZA), 2-idrossi-5-metossibenzaldeide (2-OH-5MBZA), 2-idrossi-6-metossibenzaldeide (2-OH-6MBZA), salicilaldeide in presenza di citosol di fegato umano e NAD<sup>+</sup>.**

Tutte le aldeidi studiate (10  $\mu$ M) sono state incubate per 30 min a 37°C con citosol di fegato umano (0,1 mg di proteina totale/mL) in presenza di NAD<sup>+</sup> (1 mM). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I dati sono espressi come percentuale di substrato residuo nel mezzo di incubazione dopo 30 min rispetto al quantitativo presente al tempo 0 min, e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti.

L'identificazione di un modello animale in cui condurre gli studi preclinici *in vivo*, volti a valutare l'efficacia e la sicurezza di un nuovo potenziale farmaco, è un passaggio particolarmente critico. Questo è particolarmente vero per le specie chimiche che vanno incontro a ossidazione mediata da AOX, poiché si osservano frequentemente marcate differenze interspecie nel metabolismo dei suoi substrati [Garattini e Terao, 2013]. Alla luce dei dati precedentemente mostrati, è chiaro che nel caso dei composti studiati gli eventuali dati di efficacia e farmacocinetica, ottenuti nel topo (animale modello tipicamente utilizzato per la valutazione preclinica dell'attività antitumorale) potrebbero rivelarsi difficilmente traslabili all'uomo.



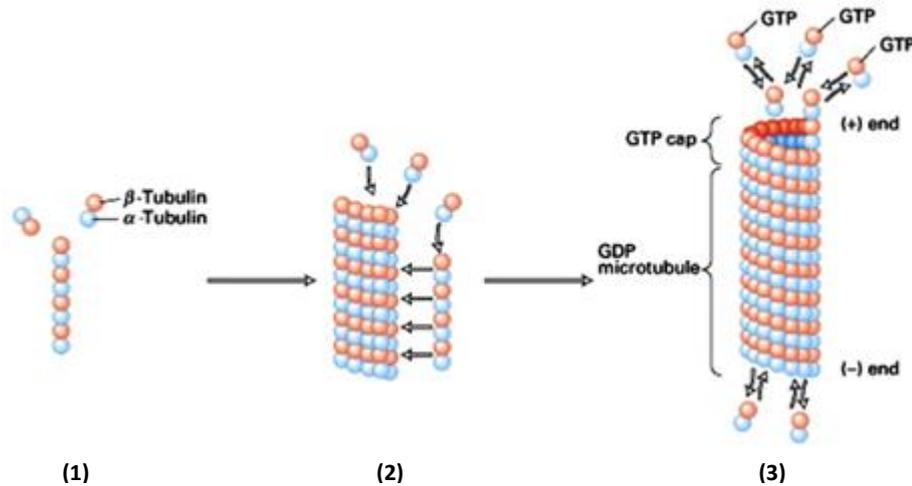
## 6. MG: INIBITORI DELLA POLIMERIZZAZIONE DELLA TUBULINA

### 6.1 INTRODUZIONE

#### *6.1.1 Microtubuli: un target per la terapia dei tumori*

Un'area di ricerca di grande interesse nell'ambito della terapia antitumorale è rappresentata dallo sviluppo di nuovi farmaci che interagiscono con i microtubuli, strutture tubulari cave costituite dalla polimerizzazione della proteina eterodimerica tubulina (composta a sua volta da due subunità  $\alpha$  e  $\beta$ ) [Islam e Iskander, 2004; Kavallaris, 2010; Steinmetz e Prota, 2018]. I microtubuli sono costituiti generalmente da 13 subunità affiancate tra loro, chiamate protofilamenti, e sono caratterizzati da un diametro esterno di  $\approx 25$  nm [Kavallaris, 2010; Kueh e Mitchison, 2009; Steinmetz e Prota, 2018]. Essi costituiscono una componente essenziale del citoscheletro della cellula, sono coinvolti in molteplici funzioni, che comprendono la motilità cellulare, il trasporto intracellulare, la trasduzione del segnale e la divisione cellulare e rappresentano il bersaglio d'azione di farmaci antineoplastici definiti "inibitori dei microtubuli" [Mukhtar *et al.*, 2014; Steinmetz e Prota, 2018].

I microtubuli sono strutture estremamente dinamiche in cui vi è una continua alternanza tra polimerizzazione e depolimerizzazione, mediante l'addizione o la rimozione delle subunità di tubulina in corrispondenza delle estremità del microtubulo stesso [Kavallaris, 2010]. Entrambe le subunità di  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina legano una molecola di guanina-trifosfato (GTP), ma solo quella della  $\beta$ -tubulina è idrolizzabile a GDP. L'aggiunta delle nuove subunità avviene preferenzialmente all'estremità positiva, dove costituiscono il cosiddetto "cappuccio a GTP", che stabilizza il microtubulo (**Fig. 39**) [Steinmetz e Prota, 2018]. Dopo la polimerizzazione, la GTP idrolizza a GDP, viene rilasciato fosfato e ha inizio la depolimerizzazione [Kueh e Mitchison, 2009]. Il passaggio dalla fase di estensione a quella di accorciamento del polimero prende il nome di "catastrofe"; la fase opposta, viceversa, prende il nome di "salvataggio" [Steinmetz e Prota, 2018].

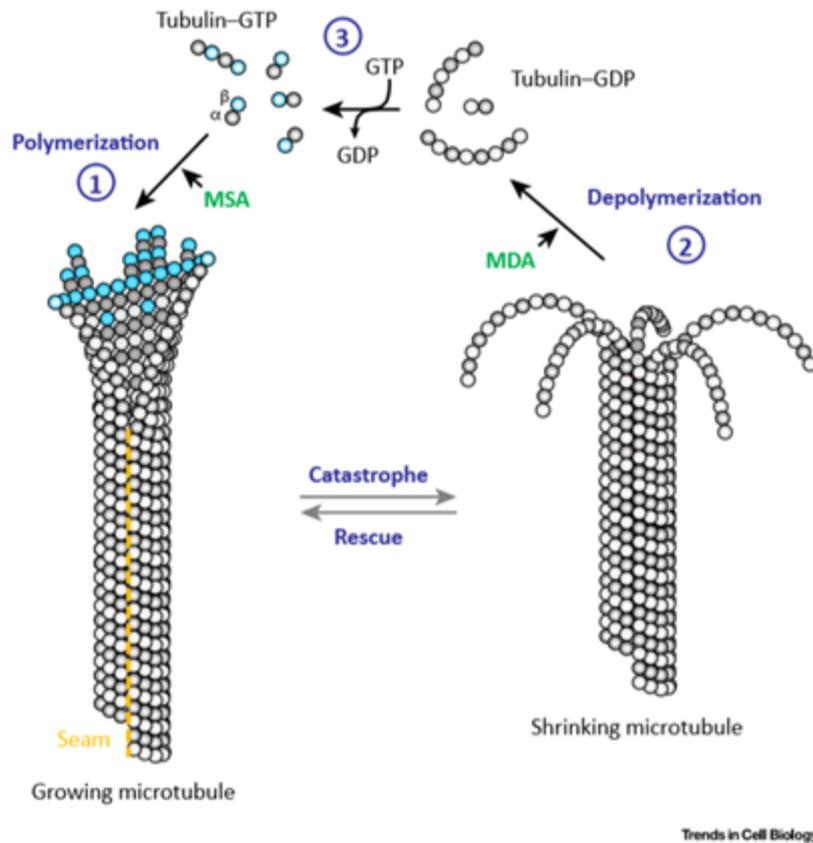


**Fig. 39. Polimerizzazione dei microtubuli.** (1) Dimeri di  $\alpha\beta$  tubulina liberi si associano longitudinalmente a formare il protofilamento; (2) i protofilamenti si associano lateralmente formando una struttura tubulare cava; (3) l'aggiunta di nuovi eterodimeri avviene preferenzialmente all'estremità positiva; ogni singolo protofilamento in un microtubulo in estensione contiene prevalentemente GDP- $\beta$ -tubulina e all'estremità positiva un cappuccio a GTP.

I primi farmaci antineoplastici inibitori dei microtubuli sono stati approvati più di mezzo secolo fa per il trattamento di linfomi e diversi tumori solidi [Steinmetz e Prota, 2018]. Una peculiarità degli inibitori dei microtubuli è data dalla diversità strutturale tra una molecola e l'altra e, al contempo, dalla loro complessità [Kavallaris, 2010]. La maggior parte di questi composti è stata ottenuta da piante o da organismi marini; molti dei composti più attivi, ad esempio i taxani, hanno incontrato delle difficoltà nel loro impiego clinico dovute alla scarsità, e difficoltà di reperibilità, della fonte naturale di origine (Tasso del Pacifico nel caso del paclitaxel) [Dumontet e Jordan, 2010; Steinmetz e Prota, 2018]. Questo problema, in alcuni casi, è stato risolto dalla sintesi parziale (semisintesi) o totale del composto di interesse. La maggior parte degli inibitori dei microtubuli, dunque, è rappresentata da prodotti naturali o derivati sintetici in grado di perturbare il dinamismo dei microtubuli, interferendo nella formazione del fuso mitotico e promuovendo la morte cellulare per apoptosi, strategia utile nel trattamento antitumorale [Steinmetz e Prota, 2018].

I farmaci che interagiscono con i microtubuli, generalmente, vengono classificati in due gruppi principali, ovvero come agenti stabilizzanti i microtubuli (*microtubule-stabilizing agents*, MSA) e agenti destabilizzanti (*microtubule-destabilizing agents*, MDA) a seconda che questi promuovano, rispettivamente, la

polimerizzazione del microtubulo o la depolimerizzazione (**Fig. 40**) [Mukhtar *et al.*, 2014; Steinmetz e Prota, 2018].



**Fig. 40. Agenti di interazione con i microtubuli.** Gli MSA spostano l'equilibrio a favore della polimerizzazione, stabilizzando i polimeri; gli MDA, viceversa, destabilizzano i polimeri favorendo il disassemblaggio del microtubulo [modificata da Steinmetz e Prota, 2018].

### 6.1.2 Limiti dei farmaci che interagiscono con i microtubuli

E' stato dimostrato che i farmaci in grado di interagire con i microtubuli sono caratterizzati da una buona attività antitumorale; la loro somministrazione, tuttavia, è ostacolata dagli effetti avversi e la tossicità associata all'uso per breve o lungo termine [Dumontet e Jordan, 2010; Mukhtar *et al.*, 2014]. Le reazioni avverse più frequenti sono di tipo neurologico ed ematologico (es. severa neutropenia). La neurotossicità, più frequente nei pazienti con neuropatie preesistenti, si manifesta con sintomi diversi quali, mal di testa, intorpidimento, depressione, vertigini, oltre a nausea, vomito e diarrea [Mukhtar *et al.*, 2014].

Ulteriori difficoltà sono rappresentate dalla comparsa di farmacoresistenza, la quale determina uno stato di non responsività delle cellule tumorali ai farmaci chemioterapici [Mukhtar *et al.*, 2014]. Di conseguenza, la conoscenza dei meccanismi alla base della farmacoresistenza è fondamentale per lo sviluppo di farmaci più potenti in grado di interagire con i microtubuli. I meccanismi che inducono farmacoresistenza possono essere molteplici. È stato dimostrato che i trasportatori della famiglia ABC, di cui la glicoproteina-P è la più conosciuta, hanno un ruolo primario nella farmacoresistenza degli inibitori dei microtubuli. La resistenza, tuttavia, potrebbe essere dovuta anche ad un'alterazione del *target*, nel contesto del complesso tubulina-microtubulo, così come ad una variazione del *signaling* di proteine regolatorie coinvolte nell'apoptosi (es. p53) [Dumontet e Jordan, 2010].

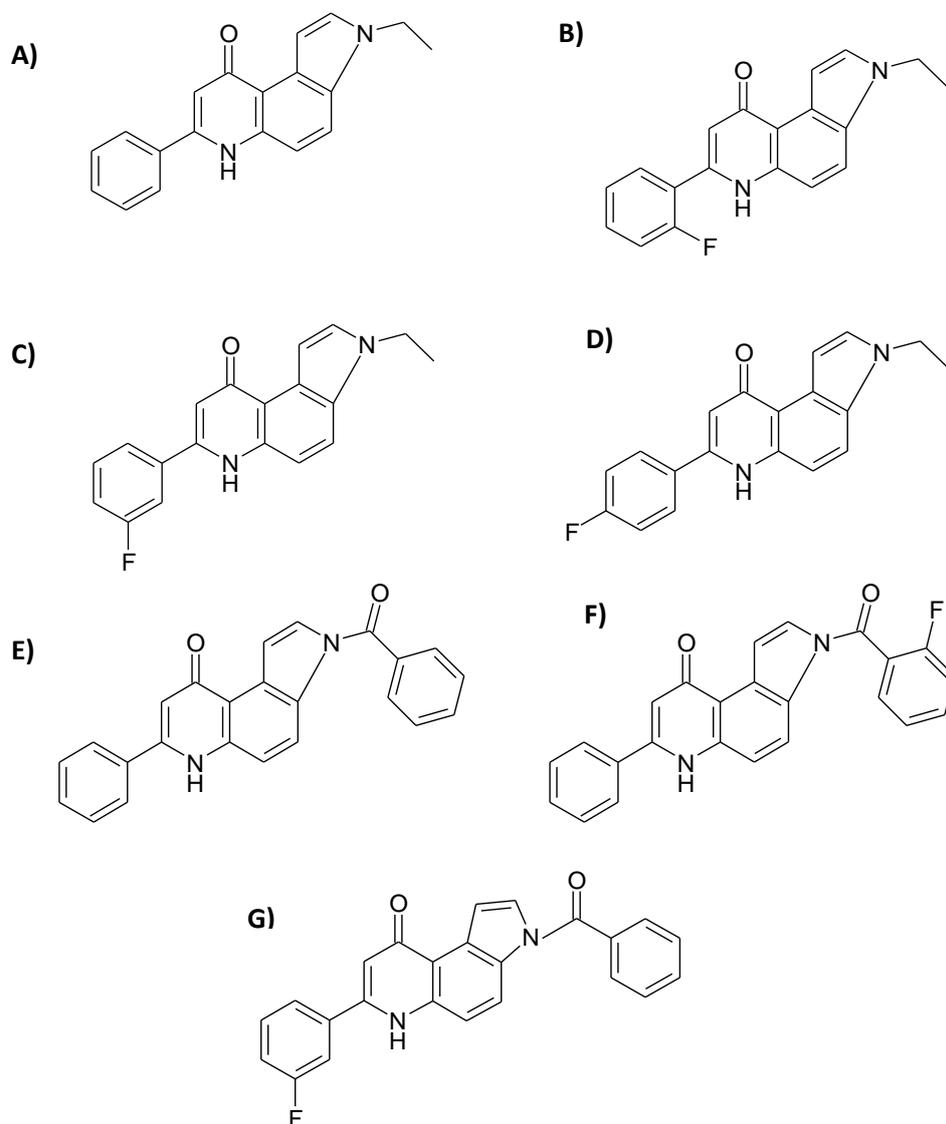
### **6.1.3 Derivati del fenil pirrolo chinolone (PPyQ)**

Il gruppo di ricerca coordinato dalla Prof.ssa Maria Grazia Ferlin (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Padova) circa 10 anni fa ha sintetizzato e caratterizzato una prima serie di derivati del fenilpirrolochinolinone (PPyQ), fra i quali si annoverano il 2-PPyQ e il 7-PPyQ. Entrambi i composti hanno dimostrato una spiccata attività antitumorale sia *in vitro* sia *in vivo*, riconducibile ad inibizione della polimerizzazione della tubulina [Ferlin *et al.*, 2005]. In particolare, il bersaglio d'azione dei due fenilpirrolochinolononi è stato identificato, ed è rappresentato dalla subunità  $\beta$  a cui i due farmaci si legano in corrispondenza del sito per la colchicina [Carta *et al.*, 2017 e referenze citate].

Nel tentativo di ottenere composti caratterizzati da migliori proprietà farmacologiche lo stesso Gruppo di ricerca ha più recentemente disegnato e sintetizzato numerosi nuovi analoghi del PPyQ fra cui si annoverano alcuni derivati del 7-PPyQ acilati in corrispondenza dell'N3; si tratta di composti caratterizzati da un interessante profilo di attività *in vitro*, in particolare da elevata attività antiproliferativa nei confronti di cellule neoplastiche di diversa origine [IG<sub>50</sub> (50% *inhibitory growth concentration*) nel *range* nanomolare e subnanomolare] e, per contro scarsa citotossicità nei confronti di cellule non neoplastiche (linfociti umani). Particolarmente attivo è risultato il composto denominato MG2710 (struttura **E** di **Fig. 41**) caratterizzato, come dimostrato

grazie a studi condotti nel nostro Laboratorio, da elevata stabilità al metabolismo ossidativo microsomiale epatico [Carta *et al.*, 2017].

Sono attualmente in fase di caratterizzazione per l'attività antineoplastica altri nuovi derivati del 7-PPyQ preparati dal Gruppo di ricerca della Prof.ssa M. G. Ferlin denominati MG2474, MG2712, MG2713, MG2714, MG2718 e MG2854 (**Fig. 41**) tutti contenenti il farmacoforo riportato in **Fig. 42**, ritenuto importante ai fini di un'ottimale attività antiproliferativa [Carta *et al.*, 2017].



**Fig. 41.** Formule di struttura di MG2474 (A), MG2712 (B), MG2713 (C), MG2714 (D), MG2710 (E), MG2718 (F), MG2854 (G).

Gli stessi composti sono stati oggetto recentemente di esperimenti condotti nel nostro Laboratorio, al fine di ottenere informazioni circa la loro stabilità al

metabolismo epatico, con particolare riferimento al metabolismo ossidativo mediato da enzimi citocromo P450 (CYP) e, limitatamente ai composti a struttura ammidica (MG2718, MG2854 e, per confronto, MG2710), al possibile metabolismo idrolitico catalizzato da carbossilesterasi microsomiali [Parkinson e Ogilvie, 2010].

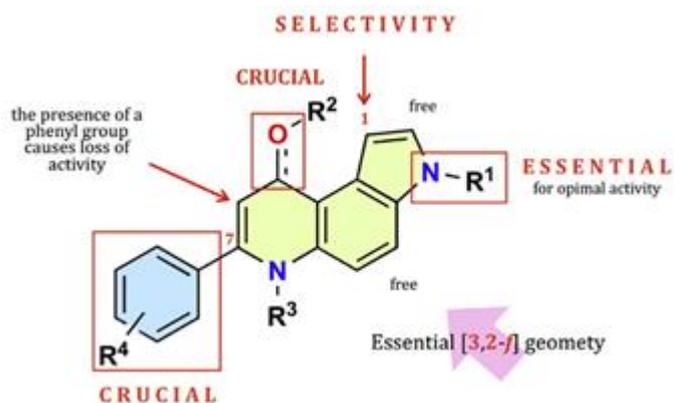


Fig.42. Farmacoforo dei derivati del PPyQ [Carta *et al.*, 2017].

## 6.2 MATERIALI E METODI

### 6.2.1 Reagenti

L'acqua ultrapura con cui sono stati preparati tutti i tamponi e le soluzioni acquose utilizzate in questo progetto di ricerca è stata ottenuta mediante lo strumento PureLab Option-Q (Elga LabWater, High Wycombe, UK).

I composti MG2474, MG2712, MG2713, MG2714, MG2710, MG2718, MG2854 e il 7-PPyQ sono stati forniti dalla Prof.ssa Maria Grazia Ferlin (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Padova).

Il nicotinnamide adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH) è stato acquistato dalla Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA).

I microsomi epatici umani (un *pool* di microsomi isolati dal fegato di 50 donatori di entrambi i sessi) sono stati acquistati dalla Xenotech LLC (Lenexa, Kansas, USA).

Tutti gli altri reagenti, compresi l'acetonitrile, l'acido trifluoroacetico, il benzil e la quercetina, sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich S.r.l. (Milano).

### 6.2.2 Valutazione della stabilità di MG2474, MG2712, MG2713, MG2714, MG2710, MG2718 e MG2854 al metabolismo microsomiale epatico

#### *Condizioni generali di incubazione e processazione dei campioni*

Al fine di valutare la possibile biotrasformazione da parte di enzimi microsomiali epatici NADPH-dipendenti dei derivati del 7-PPyQ oggetto del presente studio, ciascun composto è stato incubato, alla concentrazione finale 10  $\mu$ M, in un mezzo di reazione (volume finale, 0,2 mL) contenente 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), microsomi epatici umani (0,5 mg di proteina/mL) e 1 mM NADPH. Le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta dei microsomi epatici agli altri componenti del mezzo di reazione (precedentemente incubati per 3 min a 37°C), condotte a 37°C, infine arrestate dopo intervalli di tempo prestabiliti (MG2712-14 e MG2474: 0, 2, 5, 15 e 30 min; MG2710, MG2718, MG2854: 60 min) mediante l'aggiunta di 0,2 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  mantenuto in ghiaccio. Campioni "tempo 0" sono

stati preparati aggiungendo tutti i componenti della miscela di reazione a provette mantenute in ghiaccio e contenenti 0,2 mL di CH<sub>3</sub>CN. Reazioni di controllo sono state condotte, inoltre, sia in assenza del cofattore NADPH sia in assenza di NADPH e microsomi (incubazioni “buffer”). I campioni così ottenuti sono stati centrifugati a 20.000g per 10 min a 4°C e aliquote dei rispettivi surnatanti trasferiti in fiale da autocampionatore e analizzate mediante HPLC con rivelazione di fluorescenza.

#### ***Valutazione del ruolo di enzimi CYP nel metabolismo microsomiale di MG2474, MG2712, MG2713 e MG2714***

Al fine di ottenere informazioni circa il ruolo di uno o più enzimi CYP microsomiali epatici umani nella biotrasformazione di MG2474, MG2712, MG2713 e MG2714, ciascuno dei composti studiati è stato incubato a 37°C, alla concentrazione finale 10 µM, in un mezzo di reazione (volume finale: 0,2 mL) contenente 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4), 0,5 mg/mL di microsomi di fegato umano e 1 mM NADPH, sia in assenza sia in presenza dell'inibitore di CYP quercetina (concentrazione finale, 100 µM) [Ono *et al.*, 1996]. Tutte le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta del cofattore NADPH agli altri componenti del mezzo di reazione (preincubati per 3 min a 37°C), e condotte per 15 min; la successiva processazione dei campioni era identica a quanto sopra riportato (vedi sottoparagrafo “*Condizioni generali di incubazione e processazione dei campioni*”).

#### ***Valutazione del ruolo di carbossilesterasi (CES) nel metabolismo microsomiale di MG2710, MG2718, MG2854***

Al fine di valutare il possibile coinvolgimento di carbossilesterasi microsomiali epatiche nel metabolismo dei composti a struttura ammidica MG2710, MG2718 e MG2854, ciascun composto è stato incubato (concentrazione finale, 10 µM) in un mezzo di reazione (volume finale, 0,2 mL) contenente 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4) e microsomi epatici umani (1 mg di proteina/mL) sia in presenza sia in assenza del *pan*-inibitore di CES benzil (concentrazione finale: 50 µM) [Ross *et al.*, 2012]. Tutte le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta dei microsomi epatici agli altri componenti del mezzo

di reazione (preincubati per 3 min a 37°C) e condotte a 37°C; la successiva processazione dei campioni era identica a quanto sopra riportato (vedi sottoparagrafo “*Condizioni generali di incubazione e processazione dei campioni*”).

### **6.2.3 Analisi HPLC**

L’analisi dei surnatanti di reazione, mediante HPLC con rivelazione di fluorescenza, è stata condotta utilizzando un cromatografo Hewlett-Packard/Agilent serie 1100 (Agilent Technologies GMBH, Germany) costituito da una pompa quaternaria, un degasatore per i componenti della fase mobile, un autocampionatore, un comparto colonna termostato, un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a lunghezza d’onda variabile e un rivelatore di fluorescenza. La strumentazione era controllata da un Personal Computer, dotato di uno specifico *software* (Chemstation for LC, Hewlett-Packard, USA) che ha reso possibile l’acquisizione e l’elaborazione dei dati.

La separazione degli inibitori della polimerizzazione della tubulina MG2710, MG2712, MG2713, MG2714, MG2718 e MG2854 è stata condotta utilizzando una colonna Agilent Zorbax SB C18 (4,6 X 150 mm, 5,0 µm) termostata a 30°C. Per l’analisi del solo composto MG2474 è stata utilizzata una colonna Waters SymmetryShield RP18 (4,6 x 150 mm, 5,0 µm).

Il volume del campione iniettato era pari a 50 µL. Per quanto concerne la rivelazione di fluorescenza, per tutti i composti studiati la lunghezza d’onda di eccitazione era pari a 344 nm, mentre quella di emissione era fissata a 493 nm.

La fase mobile utilizzata era composta da:

- “solvente A”: 0,1% (v/v) acido formico in acqua
- “solvente B”: 0,1% (v/v) acido formico in acetonitrile

Il programma di eluizione prevedeva un’eluizione isocratica con il 95% del “solvente A” nei primi 2 min, un gradiente dal 5% al 40% di “solvente B” nei successivi 8 min, seguito da un ulteriore gradiente dal 40% al 60% del “solvente B” fino a fine corsa (24,0 min). Il flusso della fase mobile, mantenuto costante per tutta la corsa cromatografica, era pari a 1 mL/min. Nelle condizioni cromatografiche adottate il  $t_R$  dei composti studiati era compreso tra 11,5 e 13,5 min.

La concentrazione di substrato (10  $\mu\text{M}$ ) utilizzata nelle varie sessioni sperimentali è stata scelta sulla base dell'intensità del segnale analitico, al fine di garantire una facile integrazione del picco cromatografico anche in presenza di una possibile deplezione dell'analita pari al 90% del quantitativo iniziale (tempo 0).

#### **6.2.4 Analisi dei dati**

La stabilità metabolica dei composti studiati è stata espressa come percentuale (media  $\pm$  deviazione standard;  $n=3$ ) di analita residuo nel mezzo di incubazione, calcolata rapportando l'area del rispettivo picco cromatografico a ciascun tempo di incubazione con l'area del rispettivo picco cromatografico relativa al campione tempo "0 min".

L'emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) dal mezzo di incubazione degli analoghi MG2474, MG2712, MG2713 e MG2714 è stata calcolata mediante l'equazione:

$$t_{1/2} = 0,693/k$$

dove  $k$  rappresenta la pendenza della retta ottenuta dalla regressione lineare dei dati ottenuti diagrammando il logaritmo naturale della quantità relativa (%) di substrato rimanente nel mezzo di reazione, in funzione del tempo di incubazione (min).

L'analisi statistica dei dati è stata condotta mediante *test* di analisi della varianza ad una via (*one-way ANOVA*) seguito dal *test* di Tukey; valori di  $P$  inferiori a 0,05 sono stati considerati significativi.

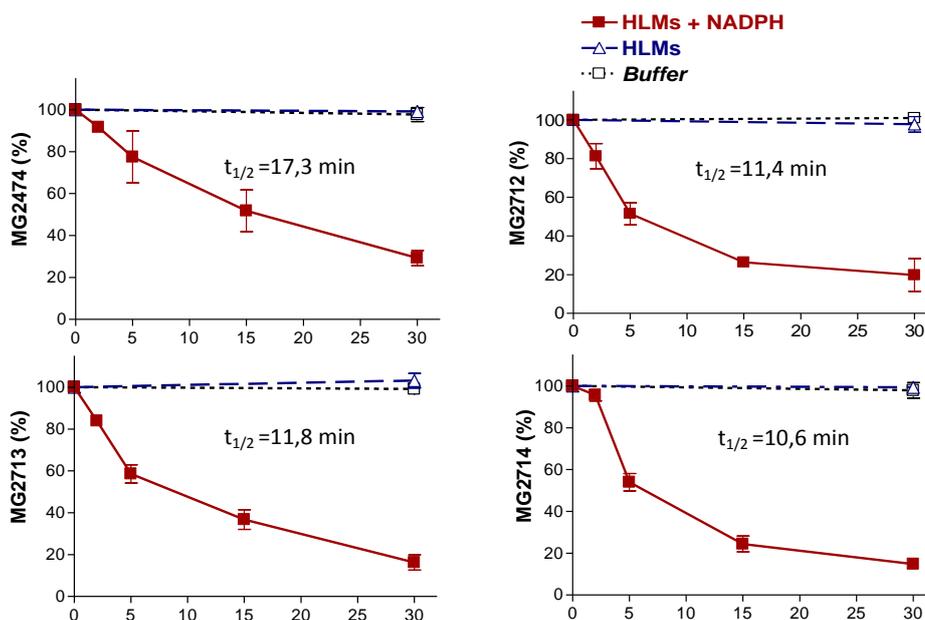
## 6.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 6.3.1 Stabilità di MG2474, MG2712, MG2713, e MG2714 al metabolismo ossidativo microsomiale epatico

Com'è noto, nei mammiferi, uomo compreso, le reazioni di biotrasformazione di xenobiotici osservate con maggior frequenza sono le ossidazioni microsomiali mediate da CYP [Parkinson e Ogilvie, 2010]. In una prima serie di esperimenti i nuovi derivati del 7-PPyQ MG2474, MG2712, MG2713 e MG2714, tutti caratterizzati dalla presenza di una catena etilica legata all'azoto del nucleo pirrolico (N3) (**Fig. 41**), sono stati incubati a 37°C per diversi tempi con microsomi epatici umani sia in assenza sia in presenza di NADPH, cofattore essenziale ai fini delle reazioni ossidative catalizzate dagli enzimi microsomiali CYP e monossigenasi flaviniche [Parkinson e Ogilvie, 2010]. Incubazioni di controllo sono inoltre state condotte in assenza sia della frazione microsomiale sia del cofattore NADPH (incubazioni "buffer"). I diagrammi riportati in **Fig. 43** mostrano l'andamento temporale dei livelli di ciascuno dei composti analizzati nelle diverse condizioni di incubazione.

I 4 composti studiati, 3 dei quali (MG2712, MG2713, e MG2714) rappresentano gli analoghi fluorurati in corrispondenza di specifici atomi di carbonio aromatici di MG2474, presentano, in presenza di microsomi epatici umani e NADPH, una instabilità sovrapponibile, espressa da un'emivita di scomparsa dal mezzo relativamente breve e compresa tra 10,6 (MG2714) e 17,3 (MG2474) min. Viceversa, gli stessi composti sono risultati stabili per almeno 30 min quando incubati in presenza di microsomi, ma in assenza del cofattore NADPH o in solo tampone fosfato (**Fig. 43**). Nel loro complesso i risultati ottenuti indicano la suscettibilità di tutti i derivati N-etilati del 7-PPyQ studiati ad un metabolismo microsomiale NADPH-dipendente (metabolismo ossidativo), che non viene tuttavia ad interessare i siti rappresentati dagli atomi di carbonio aromatici fluorurati in MG2712, MG2713 e MG2714 (anello fenilico legato al C7 del nucleo PPyQ). La fluorurazione, infatti, rappresenta una strategia ampiamente adottata per conferire resistenza all'ossidazione mediata da enzimi CYP in specifici siti [Murphy e Sandford, 2015].

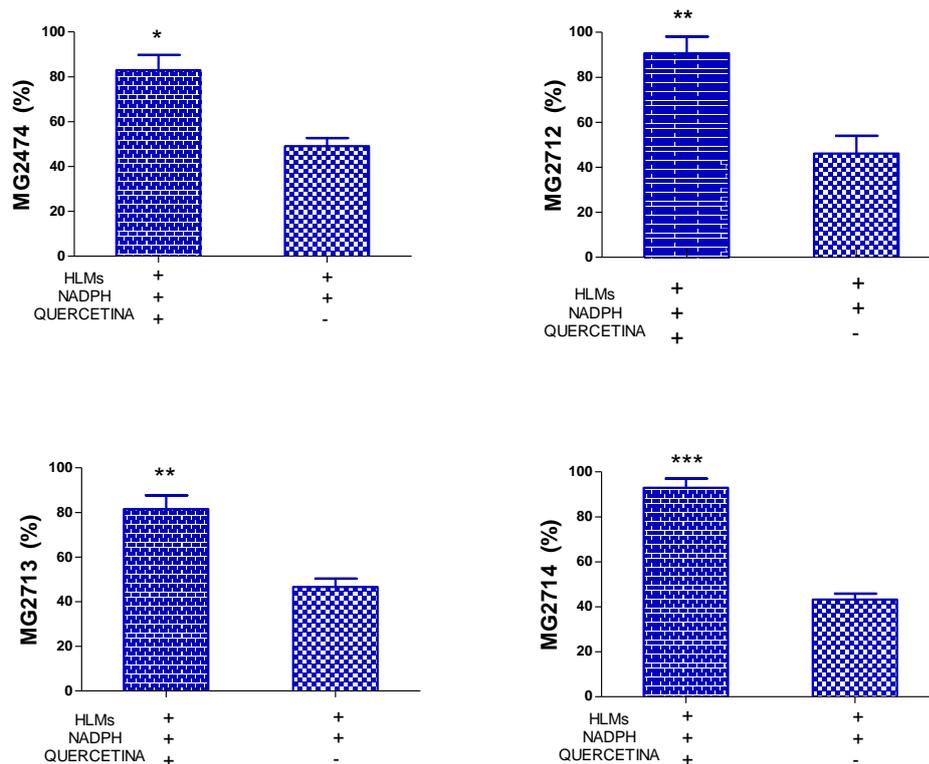
Il coinvolgimento di uno o più enzimi CYP nel metabolismo microsomiale dei composti studiati (MG2712, MG2713, MG2714, MG2474) è stato successivamente valutato incubando per 15 min ciascuno di essi a 37°C con microsomi epatici umani e NADPH sia in presenza sia in assenza di quercetina (100 µM), un potente inibitore di vari CYP microsomiali umani frequentemente coinvolti nel metabolismo di farmaci, tra cui CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2 e gli enzimi della sottofamiglia CYP2C [Ono *et al.*, 1996; Obach, 2000; Rastogi e Jana, 2014].



**Fig. 43. Valutazione della stabilità di MG2474, MG2712, MG2713, e MG2714 al metabolismo microsomiale epatico.**

MG2474, MG2712, MG2713, e MG2714 (10 µM) sono stati incubati a 37°C con microsomi epatici umani (0,5 mg di proteina/mL) e NADPH (1 mM) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) per 0, 2, 5, 15 e 30 min e . Gli stessi composti sono stati incubati a 37°C con i soli microsomi epatici (0,5 mg di proteina/mL) in fosfato di potassio 0,1 M (pH 7,4) o in solo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  per 0 e 30 min. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC con rivelazione di fluorescenza come descritto nella sezione "Materiali e metodi". I dati sono espressi come percentuale di composto residuo nel mezzo di incubazione a ciascun tempo rispetto al quantitativo presente al tempo 0 min, e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti. In alcuni casi le barre degli errori non risultano visibili in quanto di dimensioni inferiori a quelle di simbolo. Per ciascun composto è riportata, inoltre, l'emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ).

I dati riportati in **Fig. 44** dimostrano come la scomparsa dal mezzo di incubazione di ciascuno dei composti studiati venga sensibilmente inibita dalla presenza della quercetina. Uno o più enzimi CYP sono pertanto responsabili dell'instabilità di MG2474, MG2712, MG2713 e MG2714 quando incubati con microsomi epatici umani e NADPH.



**Fig. 44. Effetto dell'inibitore quercetina sulla biotrasformazione microsomiale epatica NADPH-dipendente di MG2474, MG2712, MG2713, e MG2714.**

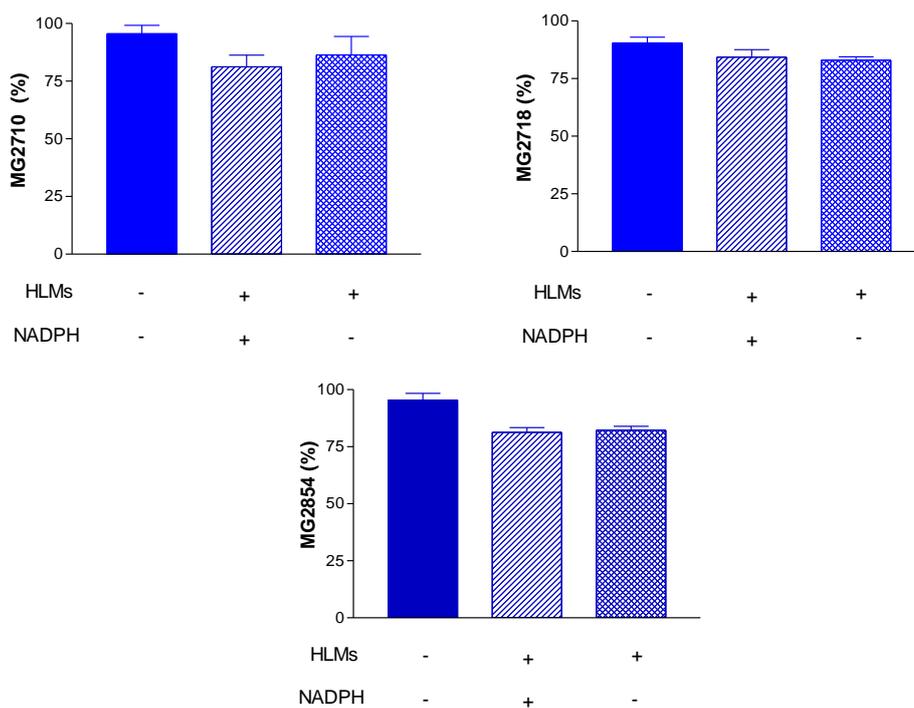
MG2474, MG2712, MG2713, e MG2714 (10  $\mu$ M) sono stati incubati a 37°C con microsomi epatici umani (HLMs, 0,05 mg di proteina/mL) e NADPH (1 mM) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) per 0 e 15 min, sia in assenza sia in presenza di quercetina (100  $\mu$ M). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC con rivelazione di fluorescenza come descritto nella sezione "Materiali e metodi". I dati sono espressi come percentuale di composto residuo nel mezzo di incubazione dopo 15 min e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti.

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,0001$  (t-test).

### 6.3.2 Stabilità degli N-benzoil derivati del 7-PPyQ MG2710, MG2718 e MG2854 al metabolismo microsomiale epatico

Studi precedentemente condotti nel nostro Laboratorio hanno dimostrato una elevata stabilità dell'N-benzoil derivato del 7-PPyQ denominato MG2710 (**Fig. 41 E**) al metabolismo microsomiale NADPH-dipendente; gli studi di metabolismo effettuati hanno tuttavia dimostrato una relativa suscettibilità del composto al metabolismo idrolitico che conduce alla sua N-deacilazione (idrolisi del legame ammidico), con formazione di un metabolita dotato, tuttavia, di significativa attività antiproliferativa (7-PPyQ) [Carta *et al.*, 2017]. Più recentemente sono stati preparati due analoghi fluorurati di MG2710, denominati MG2718 e MG2854, la

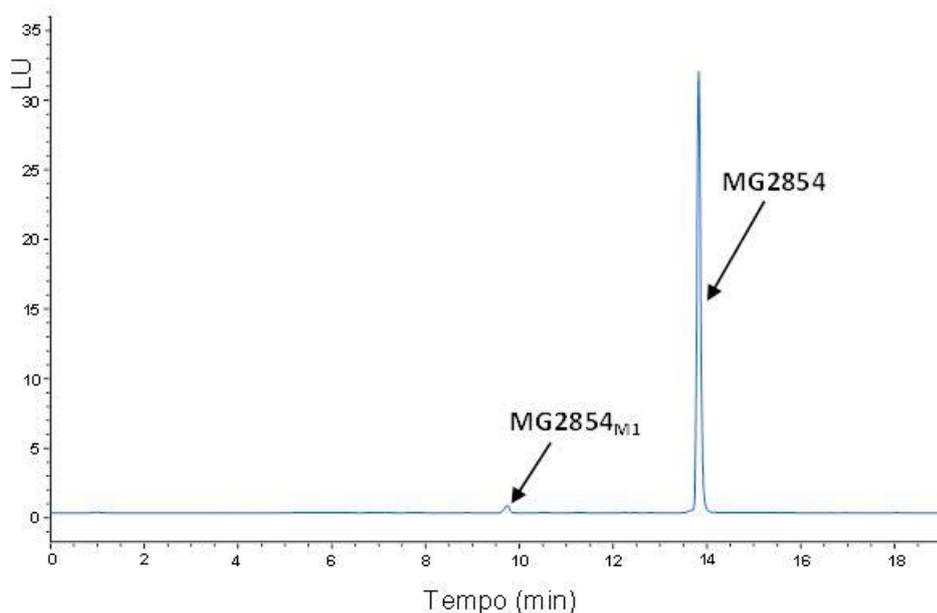
cui attività antitumorale è in corso di studio. Al fine di valutare la suscettibilità di MG2718 e MG2854 al metabolismo microsomiale epatico, sia ossidativo sia idrolitico, ciascuno dei due composti è stato incubato per 60 min con microsomi epatici umani sia in presenza sia in assenza del cofattore NADPH. In parallelo, sono state condotte incubazioni di controllo nelle quali erano assenti sia i microsomi sia il cofattore NADPH. A fini comparativi, lo stesso tipo di indagini sono state condotte incubando, nelle medesime condizioni, MG2710. I dati riportati in **Fig. 45** dimostrano come l'incubazione dei tre analoghi a struttura ammidica con microsomi epatici umani si associ ad un modesto calo del rispettivo livello nel mezzo di incubazione ( $\approx 20\%$  dopo 60 min), ciò indipendentemente dalla presenza o meno del cofattore NADPH (**Fig. 45**).



**Fig. 45. Valutazione della stabilità di MG2710, MG2718 e MG2854 al metabolismo microsomiale ossidativo.**

MG2710, MG2718 e MG2854 ( $10 \mu\text{M}$ ) sono stati incubati per 60 min a  $37^\circ\text{C}$  con microsomi epatici umani (HLMs;  $1 \text{ mg}$  di proteina/mL) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,1 \text{ M}$  (pH 7,4), sia in presenza sia in assenza di NADPH ( $1 \text{ mM}$ ); incubazioni di controllo sono state inoltre condotte in assenza sia di microsomi sia di NADPH. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC con rivelazione di fluorescenza come descritto nella sezione "Materiali e metodi". I dati sono espressi come percentuale di MG2854 residuo nel mezzo di incubazione dopo 60 min rispetto al quantitativo presente al tempo 0 min, e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti.

In tutti i casi, inoltre, la scomparsa del substrato dal mezzo di reazione si associa alla formazione di un nuovo picco cromatografico con  $t_R$  pari a 9,7 min rappresentato con certezza, nel caso del composto MG2710, dal suo prodotto di N-deacilazione 7-PPyQ, composto sintetizzato e caratterizzato chimicamente e per l'attività citotossica *in vitro* dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Ferlin [Carta *et al.* 2017]. E' quindi probabile che il metabolismo microsomiale NADPH-indipendente degli analoghi fluorurati MG2718 e MG2854 conduca alla formazione dei rispettivi prodotti di N-deacilazione con  $t_R$ , nelle nostre condizioni cromatografiche, identico a quello del 7-PPyQ. La **Fig. 46** riporta, a titolo di esempio, il profilo cromatografico ottenuto dall'analisi HPLC-fluorescenza del campione relativo all'incubazione di MG2854 con microsomi epatici umani in assenza di NADPH.



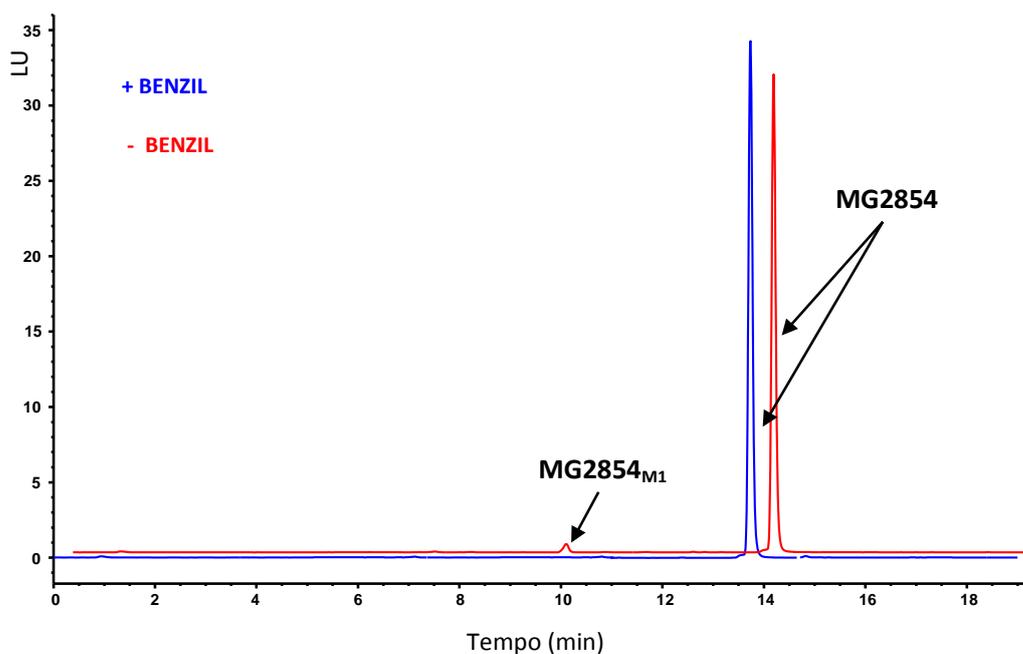
**Fig. 46. Cromatogramma relativo all'analisi HPLC di unamiscela di incubazione di MG2854 con microsomi epatici umani in assenza di NADPH.**

MG2854 (10  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C per 60 min con microsomi epatici umani (HLMs; 1 mg proteina/mL) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) in assenza di NADPH. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi".

Tali risultati se da un lato indicano il mancato coinvolgimento di enzimi microsomiali NADPH-dipendenti (CYP e monossigenasi flaviniche) nel metabolismo di MG2710, MG2718 e MG2854, dall'altro suggeriscono un possibile ruolo di enzimi microsomiali idrolitici rappresentati, in particolare da

carbossilesterasi (CES), proteine note per la loro capacità di catalizzare anche la scissione idrolitica di funzioni ammidiche [Parkinson e Ogilvie, 2010]. A questo proposito, esperimenti successivi hanno dimostrato come sia la scomparsa dal mezzo di MG2710, MG2718 e MG2854 sia la formazione del rispettivo metabolita con  $t_R$  pari a 9,7 min, promosse da microsomi epatici umani, siano risultate inibite dalla presenza dell'inibitore non selettivo di CES benzil (50  $\mu$ M) [Ross *et al.*, 2012].

In **Fig. 47** è riportata, a titolo di esempio, una sovrapposizione dei profili cromatografici relativi all'analisi dei surnatanti ottenuti dopo incubazione di MG2854 per 60 min con microsomi epatici umani in assenza e in presenza di benzil.



**Fig. 47. Cromatogrammi relativi all'analisi HPLC di miscele di incubazione di MG2854 con microsomi epatici umani in assenza e presenza del *pan* inibitore di carbossilesterasi (CES) benzil.**

*MG2854 (10  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C per 60 min con microsomi epatici umani (HLMs; 1 mg proteina/mL) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,4) sia in presenza sia in assenza di benzil (50  $\mu$ M). Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC con rivelazione di fluorescenza come descritto nella sezione "Materiali e metodi".*

Una o più CES microsomiali epatiche umane appaiono quindi coinvolte nel metabolismo degli N-benzoil derivati del 7-PPyQ denominati MG2710, MG2718 e MG2854. Va tuttavia sottolineato che, sulla base dei risultati ottenuti (oltre 80%

del composto ancora presente nel mezzo dopo 60 min di incubazione a 37°C con 1 mg di proteina microsomiale/mL) i composti MG2710, MG2718 e MG2854 possono essere considerati comunque relativamente stabili, oltre che al metabolismo NADPH-dipendente (metabolismo ossidativo), anche al metabolismo microsomiale idrolitico. Tali composti risultano quindi, a differenza degli altri derivati del 7-PPyQ presi in considerazione nello studio (ossia i derivati etilati all'azoto pirrolico MG2474, MG2712, MG2713, e MG2714) particolarmente interessanti da un punto di vista della loro stabilità metabolica nella specie umana. Futuri studi saranno dedicati alla valutazione del loro potenziale di inibizione dell'attività dei principali enzimi CYP umani coinvolti nel metabolismo dei farmaci, oltre che alla valutazione della loro stabilità al metabolismo microsomiale epatico nelle principali specie di interesse preclinico (topo e ratto).



## APPENDICE

### SCREENING DI POTENZIALI INIBITORI SELETTIVI DI SOLFOTRASFERASI

#### *Polifarmacia e interazioni tra farmaci*

La diffusione della polifarmacia, ossia il simultaneo impiego di più farmaci da parte dello stesso soggetto, ha determinato una maggiore attenzione sul rapporto rischio vs. beneficio dei nuovi farmaci. A tal proposito le case farmaceutiche hanno potenziato gli studi sulle nuove entità chimiche nell'intento di individuare dei composti caratterizzati da buone proprietà ADME (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Escrezione). Il profilo ideale di un candidato farmaco comprende un buon assorbimento, una farmacocinetica che permetta la somministrazione una o due volte al giorno, una ridotta variabilità interindividuale nella risposta e un ampio indice terapeutico. È vantaggioso, inoltre, ridurre il più possibile il rischio di interazioni tra farmaci con l'obiettivo di massimizzare la sicurezza del paziente [Williams *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007].

Le reazioni avverse ai farmaci rappresentano uno dei maggiori problemi di salute pubblica. Nonostante alcuni studi riportino percentuali comprese tra il 3 e il 28%, si stima che circa il 5% dei ricoveri ospedalieri siano causati da reazioni avverse [Hutzler *et al.*, 2011 e referenze citate]. È stato osservato che i soggetti anziani, trattati simultaneamente con più farmaci, rappresentano la categoria più esposta al rischio di interazioni tra farmaci (DDI, *Drug-Drug Interactions*). La maggior parte delle DDI coinvolge uno o più farmaci, definiti nella bibliografia internazionale *perpetrators*, i quali provocano un cambiamento del profilo farmacocinetico di altri farmaci definiti *victims*. Di conseguenza, la maggior parte delle aziende farmaceutiche e dei gruppi di ricerca accademici coinvolti nella ricerca e sviluppo di nuovi potenziali farmaci esegue esperimenti *in vitro* sulle nuove entità chimiche in sperimentazione con l'obiettivo di valutare la possibile induzione o inibizione dei principali enzimi farmaco metabolizzanti umani [Zhang *et al.*, 2007]. Inoltre, poiché il processo di biotrasformazione concorre in modo sostanziale alla *clearance* della maggior parte dei farmaci di corrente impiego in terapia è estremamente utile identificare e caratterizzare precocemente gli enzimi

responsabili della biotrasformazione di un nuovo potenziale farmaco (*reaction phenotyping*) [Zhang *et al.*, 2007; Harper e Brassil, 2008; Di L., 2017].

### ***Studi di fenotipizzazione di reazione (Reaction Phenotyping Studies; RPS)***

Gli studi di fenotipizzazione di reazione, ossia gli studi *in vitro* volti all'identificazione degli enzimi coinvolti nella biotrasformazione di un'entità chimica sono ritenuti di fondamentale importanza nel processo di scoperta e sviluppo di nuovi farmaci [Williams *et al.*, 2003; Di L., 2017]. Tra le principali agenzie regolatorie, *Food and Drug Administration* e *European Medicine Agency*, vi è infatti consenso nel ritenere indispensabile non solo la conoscenza della struttura dei principali metaboliti, ma anche l'identificazione degli enzimi coinvolti nel processo biotrasformativo [Zientek *et al.*, 2015]. Gli RPS forniscono, infatti, preziose informazioni relative alla farmacocinetica del composto in esame, permettendo una valutazione del potenziale rischio di DDI [Di L., 2017].

La superfamiglia citocromo P450 (CYP) rappresenta, attualmente, la classe di enzimi metabolizzanti xenobiotici meglio caratterizzata; in questo caso la fenotipizzazione di reazione prevede più approcci sperimentali condotti simultaneamente che comprendono: (a) la correlazione tra la velocità di biotrasformazione del composto studiato da parte di microsomi epatici umani con la velocità di reazioni *marker* di singoli enzimi CYP; (b) la valutazione dell'impatto sulla biotrasformazione del composto in esame da parte di inibitori enzimatici selettivi, rappresentati da piccole molecole organiche o da anticorpi in grado di inibire l'attività di singoli enzimi CYP; (c) la valutazione della possibile biotrasformazione del composto studiato da parte di enzimi CYP ricombinanti ottenuti mediante espressione eterologa [Zientek *et al.*, 2015].

Un aspetto importante per gli studi di fenotipizzazione di reazione riguarda l'analisi della presenza, nel contesto del composto di interesse, di determinati gruppi funzionali che possano rappresentare potenziali siti di biotrasformazione. [Williams *et al.*, 2003]. Qualora per la specie chimica studiata sia ipotizzabile, sulla base della struttura chimica, una certa modalità di biotrasformazione sarà necessario ai fini della fenotipizzazione di reazione identificare il sistema

sperimentale (sorgente enzimatica; **Tab. 2**) più appropriato e compatibile con il possibile metabolismo ipotizzato [Williams *et al.*, 2003; Di, 2017].

Generalmente i microsomi epatici, supplementati con l'opportuno cofattore, vengono utilizzati per lo studio del possibile coinvolgimento di CYP, monoossigenasi flaviniche e glucuronosiltrasferasi; il citosol epatico, viceversa, rappresenta la principale fonte di molibdo-enzimi, solfostransferasi, alcol e aldeide deidrogenasi. Questi sistemi enzimatici, tuttavia, sono affiancati da enzimi ricombinanti e colture cellulari di epatociti, anch'essi utilizzati comunemente negli studi di fenotipizzazione di reazione (**Tab. 2**) [Williams *et al.*, 2003; Di, 2017].

Sorgente enzimatica	Vantaggi	Svantaggi
<b>Enzimi ricombinanti</b>	Presenza di un singolo enzima (alta specificità)	Sistema artificiale
<b>Frazioni microsomiali</b>	Elevata applicabilità	Assenza di enzimi citosolici (es. SULT) e mitocondriali
<b>Frazioni citosoliche</b>	Elevata applicabilità	Assenza di enzimi associati a membrana (es. CYP)
<b>Epatociti umani</b>	Presenza dell'intero <i>set</i> di enzimi biotrasformanti	Scarsa specificità

**Tab. 2.** Sorgenti enzimatiche più frequentemente utilizzate negli studi di fenotipizzazione di reazione.

Uno dei possibili approcci allo studio di fenotipizzazione di reazioni è riassunto nel diagramma a flusso riportato in **Fig. 48**. Alcuni degli approcci sopra descritti per gli enzimi CYP, nello specifico gli studi di inibizione e di correlazione, non possono tuttavia essere attualmente adottati per la fenotipizzazione di reazioni catalizzate dalle solfostransferasi (SULT) umane. Infatti, nonostante siano disponibili in commercio numerosi enzimi SULT umani ricombinanti, e siano stati identificati alcuni composti organici metabolizzati in modo preferenziale da alcune SULT, manca ancora una caratterizzazione completa dei substrati attualmente ritenuti *marker* di ciascuna delle principali SULT citosoliche umane note [James e Ambadapadi, 2013]. Ulteriori difficoltà

derivano dalla non disponibilità commerciale di un *panel* completo di inibitori validati per la selettività verso singole forme.

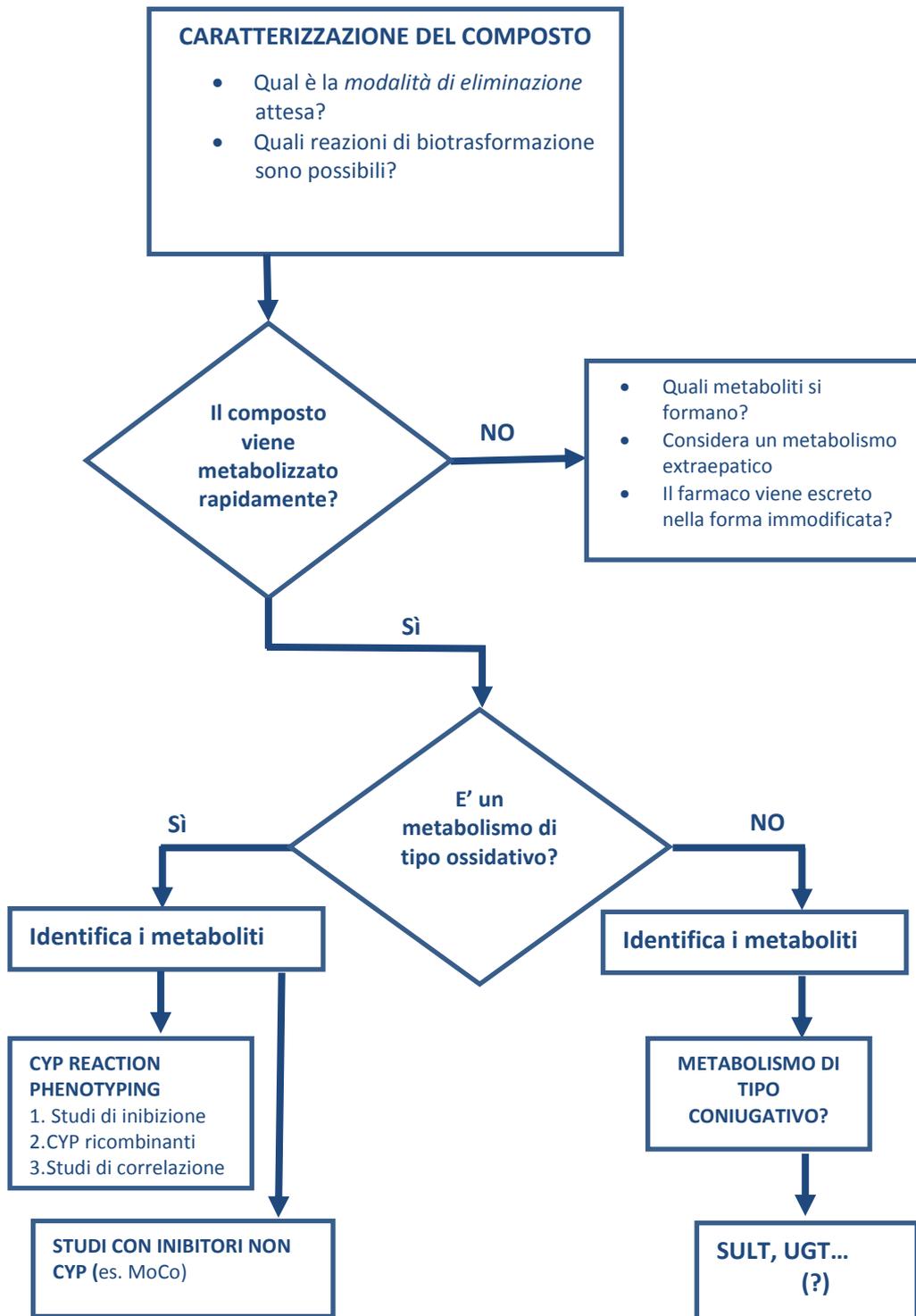


Fig. 48. Diagramma a flusso per gli studi di fenotipizzazione di reazione.

Da queste premesse è nato un progetto di ricerca, condotto in collaborazione con Aptuit (Verona) Srl e il gruppo di ricerca diretto dal Prof. S. Moro, con l'obiettivo di individuare substrati e inibitori forma-selettivi di SULT umane. *In primis* è stato condotto uno *screening* per la ricerca di potenziali inibitori dell'attività di singole forme SULT da un *panel* di 12 farmaci selezionati sulla base di studi di *docking* molecolare, effettuati presso la “*Molecular Modeling Section*” del DSF dell'Università di Padova. Gli esperimenti da me condotti, invece, erano finalizzati alla valutazione della possibile inibizione dell'attività enzimatica delle principali SULT coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici, SULT1A1 e SULT1B1, ad opera dei 12 farmaci selezionati.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Reagenti***

L'acqua ultrapura con cui sono stati preparati tutti i tamponi e le soluzioni acquose utilizzate nel presente lavoro di tesi è stata ottenuta mediante un apparecchio PureLab Option-Q (Elga LabWater, High Wycombe, UK).

Amodiachina, olaparib e ivacaftor sono stati ottenuti dalla Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA); il deferasirox è stato fornito dalla Carbosynth Ltd. (Berkshire, UK) e il pirlindolo dalla Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Gli enzimi ricombinanti umani utilizzati nello studio (SULT1A1 e SULT1B1) sono stati acquistati dalla Cypex LTD (Scozia, UK). La frazione citosolica di fegato umano (un *pool* ottenuto da individui di entrambi i sessi) utilizzata nello studio è stata acquistata dalla Xenotech LLC (Lenexa, Kansas, USA).

Tutti gli altri reagenti utilizzati per questo progetto di ricerca, compresi l'alvimopan, l'amprenavir, il darunavir, la nitroxolina, il micofenolato mofetile, la tolterodina e il 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato (PAPS), sono stati acquistati da Sigma-Aldrich S.r.l (Milano, Italia).

### ***Studi di inibizione dell'attività solfotrasferasica delle proteine ricombinanti umane SULT1A1 e SULT1B1***

L'attività coniugativa degli enzimi ricombinanti umani SULT1A1 e SUT1B1 è stata determinata valutando la formazione del metabolita 4-nirofenil solfato a

partire dal substrato 4-nitrofenolo sia in assenza sia in presenza dei potenziali inibitori, rappresentati dai 12 farmaci selezionati dalla *Molecular Modeling Section* del DSF. Sono stati condotti degli esperimenti preliminari al fine di individuare le condizioni sperimentali tali da garantire una produzione del metabolita 4-nitrofenil solfato lineare sia rispetto al tempo sia rispetto alla concentrazione proteica. L'identificazione e la quantificazione del prodotto di reazione è stata effettuata mediante analisi HPLC con rivelazione spettrofotometrica a serie di diodi (HPLC-DAD).

### ***Saggi di inibizione dell'attività coniugativa della SULT1A1 umana***

Il 4-nitrofenolo (concentrazione finale, 4  $\mu\text{M}$ ) è stato incubato a 37°C in un mezzo di reazione (volume finale, 500  $\mu\text{L}$ ) contenente 0,05 M Tris (pH 7,4), SULT1A1 ricombinante umana (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 50  $\mu\text{M}$  PAPS, sia in assenza (controllo) sia in presenza di ciascuno dei 12 composti selezionati dalla “*Molecular Modeling Section*” del DSF alla concentrazione finale 50  $\mu\text{M}$ . Sulla base dei risultati ottenuti nello *screening* a singola concentrazione (50  $\mu\text{M}$ ) due composti, nitroxolina e ivacaftor, sono stati successivamente testati a diverse concentrazioni; nello specifico la nitroxolina è stata saggiata nel *range* di concentrazione 0,0005-50  $\mu\text{M}$ , mentre l'ivacaftor nel *range* 0,1-100  $\mu\text{M}$ . Tutte le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta del cofattore PAPS agli altri componenti del mezzo di reazione (preincubati per 2 min in bagnetto termostato a 37°C) e arrestate, dopo 30 min, mediante l'aggiunta di 0,2 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  mantenuto in ghiaccio. I campioni così ottenuti sono stati agitati mediante agitatore a vortice, posti in ghiaccio e centrifugati a 20.000g per 10 min a 4°C. Aliquote dei surnatanti sono state quindi trasferite in fiale da autocampionatore e analizzate mediante HPLC-DAD (si veda “*Analisi HPLC*”).

### ***Saggi di inibizione dell'attività coniugativa della SULT1B1 umana***

Il 4-nitrofenolo (45  $\mu\text{M}$ ) è stato incubato a 37°C in una miscela di reazione (volume finale, 500  $\mu\text{L}$ ) costituita da 0,05 M Tris pH 7,4, SULT1B1 ricombinante umana (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 50  $\mu\text{M}$  PAPS, sia in assenza (controllo) sia in presenza di ciascuno dei 12 farmaci precedentemente selezionati mediante *docking* molecolare alla concentrazione finale 50  $\mu\text{M}$ . Sulla base dei risultati ottenuti nello

*screening* a singola concentrazione (50  $\mu\text{M}$ ), due composti, nitroxolina e ivacaftor, sono stati successivamente saggiati diverse concentrazioni; precisamente, la nitroxolina è stata testata nel *range* di concentrazione 0,1-10  $\mu\text{M}$ , mentre l'ivacaftor nell'intervallo 0,1-120  $\mu\text{M}$ . Tutte le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta del cofattore PAPS agli altri componenti del mezzo di reazione (preincubati per 2 min in bagnetto termostato a 37°C) e arrestate, dopo 30 min, mediante l'aggiunta di 0,2 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  mantenuto in ghiaccio. I campioni sono stati quindi messi in agitazione con l'ausilio di un agitatore a vortice, trasferiti in ghiaccio, e centrifugati a 20.000g per 10 min a 4°C. Un'aliquota di ciascun surnatante è stata infine collocata in fiale da autocampionatore e successivamente analizzata mediante HPLC-DAD (si veda "Analisi HPLC").

### ***Incubazione di nitroxolina e ivacaftor con citosol di fegato umano***

Nell'intento di valutare la stabilità della nitroxolina e dell'ivacaftor in presenza di citosol di fegato umano, entrambi i composti sono stati incubati, alla concentrazione finale 50  $\mu\text{M}$ , in un mezzo di reazione (volume finale, 500  $\mu\text{L}$ ) contenente 0,05 M Tris (pH 7,4), frazione citosolica di fegato umano (0,1 mg di proteina/mL) e 50  $\mu\text{M}$  PAPS; incubazioni di controllo sono state condotte sia in assenza della sola frazione citosolica, sia in simultanea assenza della frazione citosolica e del cofattore PAPS. Tutte le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta del cofattore PAPS agli altri componenti del mezzo di reazione (preincubati per 2 min in bagnetto termostato a 37°C) e arrestate dopo 30 o 60 min mediante l'aggiunta di 0,2 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  mantenuto in ghiaccio. Tutti i campioni sono stati centrifugati a 20.000g per 10 min a 4°C; successivamente i surnatanti sono stati trasferiti in fiale da autocampionatore e analizzati con HPLC-DAD (si veda "Analisi HPLC").

### ***Analisi HPLC***

L'analisi cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Waters SYMMETRY C8 (4,6 x 250 mm, 5,0  $\mu\text{m}$ ).

Il volume del campione iniettato era di 80  $\mu\text{L}$ .

La fase mobile era composta da:

- “solvente A”: 0,1% (v/v) acido trifluoroacetico in acqua
- “solvente B”: 0,1% (v/v) acido trifluoroacetico in CH<sub>3</sub>CN.

Nella maggior parte dei casi, l’eluizione è stata condotta in condizioni isocratiche utilizzando una fase mobile costituita da una miscela dei due solventi “A” e “B” nel rapporto 70:30 (v/v). L’analisi dei campioni contenenti darunavir, deferasirox, ivacaftor e tolterodina, prevedeva invece un’iniziale eluizione isocratica con il 30% di “solvente B” seguita da un’eluizione in gradiente dal 30% al 70% di “solvente B” dal min 10 fino al termine della corsa (22 min).

Il flusso della fase mobile è stato mantenuto costante per l’intera durata della corsa cromatografica ed era pari a 1 mL/min. Ai fini dell’analisi dell’attività SULT (identificazione e quantificazione del 4-nitrofenil solfato) il rivelatore DAD era settato alle lunghezze d’onda di 330 e 284 nm; viceversa l’identificazione e quantificazione della nitroxolina e dell’ivacaftor, nei campioni analizzati, è stata effettuata impostando il rivelatore alla lunghezza d’onda di 370 nm (nitroxolina) o 310 nm (ivacaftor). Nelle condizioni cromatografiche adottate i t<sub>R</sub> di 4-nitrofenolo, 4-nitrofenil solfato, nitroxolina e ivacaftor erano rispettivamente 10,9, 6,8, 7,7 e 20,6 min.

La concentrazione dei 12 farmaci studiati (50 µM), utilizzata nelle varie sessioni sperimentali, è stata scelta sulla base dell’intensità del segnale analitico, al fine di garantire una facile integrazione del picco cromatografico anche in presenza di una possibile deplezione dell’analita pari al 90% del quantitativo iniziale (tempo 0).

### ***Analisi dei dati***

Tutti i dati sono espressi come media ± deviazione standard di 3 determinazioni effettuate in esperimenti distinti.

L’attività coniugativa degli enzimi SULT1A1 e SULT1B1 (attività enzimatica) è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Attività enzimatica (\%)} = 100 \cdot \frac{\text{area del picco cromatografico del nitrofenil solfato in presenza dell'inibitore}}{\text{area del picco del nitrofenil solfato nel campione di controllo (assenza di inibitore)}}$$

La stabilità della nitroxolina e dell'ivacaftor in presenza di solo citosol epatico e citosol epatico supplementato con PAPS, è stata espressa come percentuale (media  $\pm$  deviazione standard; n= 3) di analita residuo nel mezzo di incubazione calcolata rapportando l'area del rispettivo picco cromatografico a ciascun tempo di incubazione (30 o 60 min) con l'area del rispettivo picco cromatografico relativa al campione di controllo (al medesimo tempo di incubazione) non contenente né la frazione citosolica né PAPS.

L'analisi statistica dei dati è stata condotta mediante *test* di analisi della varianza ad una via (*one-way ANOVA*) seguito dal *test* di Tukey; valori di *P* inferiori a 0,05 sono stati considerati significativi.

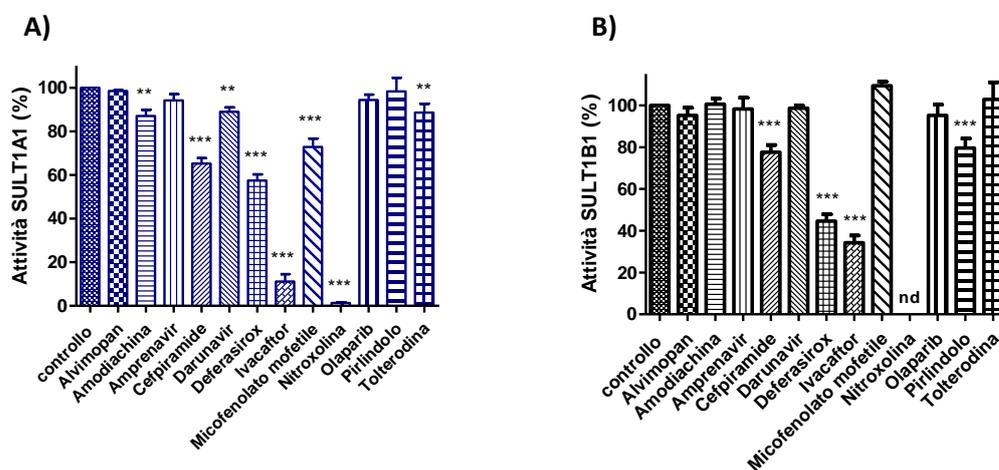
I valori di IC<sub>50</sub> di nitroxolina e ivacaftor (concentrazione di inibitore che causa il 50% di inibizione dell'attività enzimatica) sono stati stimati utilizzando il *software* GraphPad Prism e impiegando, per il *fit* dei dati sperimentali, l'equazione della curva sigmoideale dose-risposta.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Come già anticipato, è stato recentemente intrapreso dal nostro Laboratorio un progetto di ricerca, condotto in collaborazione con il Centro Ricerche Aptuit di Verona e la *Molecular Modeling Section* del DSF, il cui obiettivo è rappresentato dall'identificazione di inibitori selettivi delle principali solfotrasferasi (SULT) umane coinvolte nel metabolismo dei farmaci. In questo contesto mi sono personalmente occupata della valutazione del potenziale inibitorio di un *panel* di 12 farmaci, precedentemente selezionati mediante studi di *docking* molecolare *in silico*, sull'attività degli enzimi SULT1A1 e SULT1B1. Lo *screening* è stato effettuato monitorando l'impatto di ciascun composto sulla capacità delle proteine ricombinanti SULT1A1 e SULT1B1 di catalizzare la solfonazione del 4-nitrofenolo in presenza del cofattore PAPS; i risultati ottenuti sono riassunti nei diagrammi di **Fig. 49**. E' interessante notare come, da un punto di vista qualitativo, l'effetto inibitorio dei singoli composti sull'attività SULT1A1 e SULT1B1, sia risultata sostanzialmente sovrapponibile. Questo dato non è sorprendente alla luce del fatto che le due proteine possiedono proprietà analoghe, in termini di specificità di substrato [Coughtrie, 2016].

L'antimicrobico nitroxolina (**Fig. 50**) e l'ivacaftor (**Fig. 51**), farmaco utilizzato nel trattamento della fibrosi cistica, si sono rivelati gli inibitori più potenti dell'attività degli enzimi SULT1A1 e SULT1B1 (**Fig. 49**) e sono stati pertanto sottoposti ad ulteriori indagini.

Sia la nitroxolina che l'ivacaftor si sono dimostrati in grado di inibire l'attività coniugativa di SULT1A1 e SULT1B1 in modo concentrazione-dipendente, con una IC<sub>50</sub> rispettivamente pari a 0,08 e 5,31 μM (SULT1A1) e 2,36 e 18,44 μM (SULT1B1) (**Fig. 52**). Le IC<sub>50</sub>, tuttavia, sono risultate significativamente più basse nei confronti dell'enzima SULT1A1, ossia la SULT maggiormente espressa nel fegato umano (Vedi paragrafo 1.6, **Fig. 3**) [Riches *et al.*, 2009].

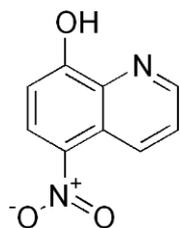


**Fig. 49.** Effetto di 12 farmaci selezionati sulla base di studi *in silico* sull'attività 4-nitrofenolo solfotrasferasi di SULT1A1 (A) e SULT1B1 (B).

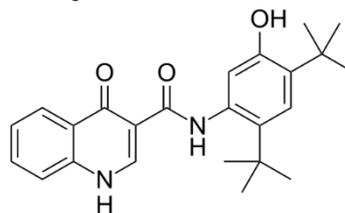
A) Il 4-nitrofenolo (4 μM) è stato incubato per 30 min a 37°C con SULT1A1 umana ricombinante (4 μg/mL) e PAPS (50 μM) in Tris 0,05 M (pH 7,4) in presenza di ciascuno dei 12 farmaci selezionati presente alla concentrazione 50 μM; incubazioni di controllo sono state condotte in assenza di farmaco. B) Il 4-nitrofenolo (45 μM) è stato incubato per 30 min a 37°C con SULT1B1 ricombinante (12 μg/mL) e PAPS (50 μM) in Tris 0,05 M (pH 7,4) in presenza di ciascuno dei 12 farmaci selezionati (50 μM); incubazioni di controllo sono state condotte in assenza di farmaco. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC-DAD come descritto nella sezione "Materiali e metodi". I dati sono espressi come attività enzimatica (%), calcolata come riportato nella sezione "Materiali e metodi", e rappresentano la media ± deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti.

Analisi statistica condotta mediante test one-way ANOVA \* P < 0.05 vs controllo; \*\*P < 0.01 vs. controllo; \*\*\*P < 0.001 vs. controllo.

nd: picco cromatografico dell'analisa (4-nitrofenil solfato) non integrabile

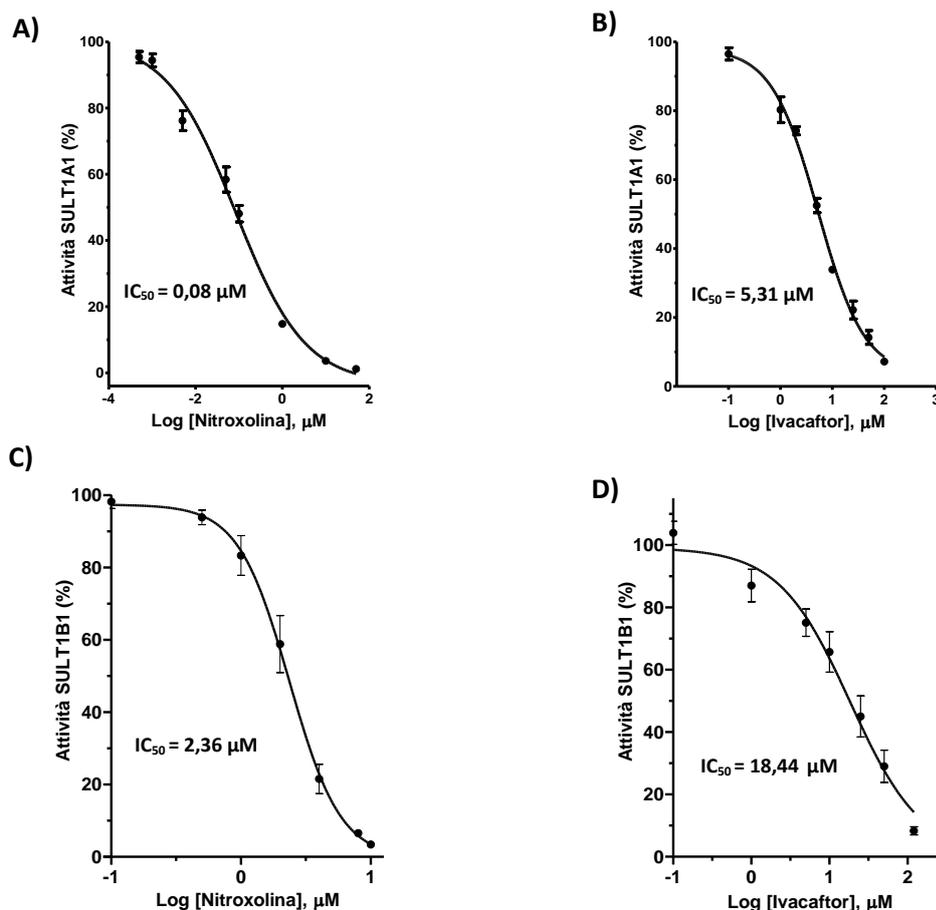


**Fig. 50.** Formula di struttura della Nitroxolina.



**Fig. 51.** Formula di struttura dell' Ivacaftor.

Alla luce dei risultati ottenuti, e nella prospettiva di identificare inibitori di SULT da utilizzarsi in studi di fenotipizzazione di reazione *in vitro* basati sull'impiego di citosol epatico, i due composti identificati sono stati successivamente saggiati per la stabilità in presenza di citosol di fegato umano e PAPS.

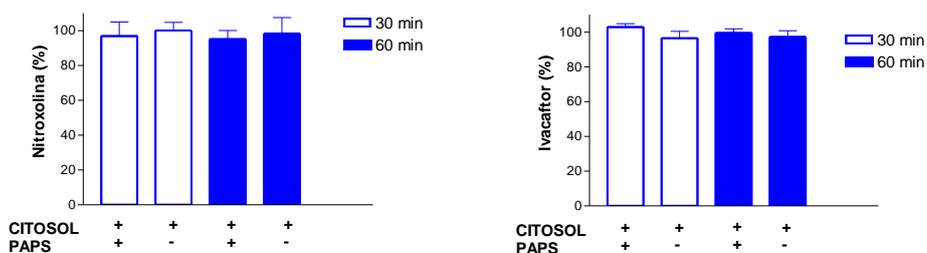


**Fig. 52.** Effetto inibitorio di concentrazioni crescenti di nitroxolina e ivacaftor sull'attività SULT1A1 (A e B) e SULT1B1 (C e D).

Le condizioni di reazione, di processazione del campione e di analisi sono analoghe a quelle descritte in Fig. 49. Ciascun valore rappresenta la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni. I valori di IC<sub>50</sub> di nitroxolina e ivacaftor sono stati stimati utilizzando il software GraphPad Prism, impiegando per il fit dei dati sperimentali l'equazione della curva sigmoidale dose-risposta.

Un inibitore di SULT ideale infatti, oltre a presentare selettività d'azione dovrebbe mostrare elevata stabilità nelle condizioni di esecuzione del *test* di fenotipizzazione. Sia la nitroxolina sia l'ivacaftor sono stati quindi incubati con citosol di fegato umano per 30 o 60 min sia in presenza che in assenza del

cofattore PAPS; incubazioni di controllo sono state inoltre condotte per 30 e 60 min in assenza sia di proteine citosoliche sia di PAPS. Come mostrato in **Fig. 53**, entrambi i composti sono stabili, nelle condizioni sperimentali sopra descritte, per almeno 60 min.



**Fig. 53. Stabilità di nitroxolina e ivacaftor in presenza di citosol epatico umano, in assenza e in presenza di PAPS.**

*Nitroxolina e ivacaftor (50  $\mu$ M) sono stati incubati per 30 e 60 min a 37°C con citosol epatico umano (0,2 mg di proteina/mL) sia in presenza sia in assenza di PAPS (50  $\mu$ M); incubazioni di controllo sono state inoltre condotte nelle medesime condizioni in assenza sia di proteine citosoliche sia di PAPS. Al termine del periodo di incubazione i campioni sono stati processati e analizzati mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi". I dati sono espressi come percentuale di inibitore residuo nel mezzo di incubazione dopo 30 o 60 min rispetto al quantitativo presente nel rispettivo campione di controllo non contenente né citosol epatico né PAPS, e rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 determinazioni indipendenti.*

In conclusione, alla luce dei risultati ottenuti è possibile affermare che la nitroxolina, e in minor misura l'ivacaftor, rappresentino degli inibitori potenti di SULT1A1 e SULT1B1 con  $IC_{50}$  nel range del basso micromolare. Sono attualmente in corso presso il laboratorio diretto dal Dott. Massimo Breda del Centro Ricerche Aptuit di Verona esperimenti volti a determinare l'impatto di concentrazioni relativamente basse di nitroxolina (<5  $\mu$ M) sull'attività coniugativa delle altre principali SULT umane coinvolte nel metabolismo dei farmaci ossia SULT2A1, SULT1E1 e SULT1A3 (vedi paragrafo 1.6). I risultati di tali studi consentiranno di definire la selettività d'azione della nitroxolina, caratteristica che ne potrà determinare o meno l'eventuale impiego quale inibitore di SULT1A1/1B1 nell'ambito di studi di fenotipizzazione di reazione.

## BIBLIOGRAFIA

- Adjei A.A., Hidalgo M. Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy, *J Clin Oncol.* 2005; 23:5386-403.
- Adler V., Yin Z., Fuchs S.Y., Benezra M., Rosario L., Tew K.D., Pincus M.R., Sardana M., Henderson C.J., Wolf C.R., Davis R.J., Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp, *EMBO J.* 1999; 18:1321-34.
- Agarwal V., Kommaddi R.P., Valli K., Ryoler D., Hyde T.M., Kleinman J.E., Strobel H.W., Ravindranath V. Drug metabolism in human brain: high levels of cytochrome P4503A43 in brain and metabolism of anti-anxiety drug alprazolam to its active metabolite, *PLoS One*, 2008; 3:e2337.
- Agrawal A.K., Shapiro B.H. Intrinsic signals in the sexually dimorphic circulating growth hormone profiles of the rat, *Mol Cell Endocrinol*, 2001; 173:167-81.
- Aliya S., Reddanna P., Thyagaraju K. Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer?, *Mol Cell Biochem.* 2003; 253:319-27.
- Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., Federici L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases, *Oncogenesis.* 2018; 7:8.
- Alnouti Y., Klaassen C.D. Tissue distribution, ontogeny, and regulation of aldehyde dehydrogenase (Aldh) enzymes mRNA by prototypical microsomal enzyme inducers in mice, *Toxicol Sci.* 2008; 101:51-64.
- Amiri K.I., Richmond A. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma, *Cancer Metastasis Rev.* 2005; 24:301-13.
- Anuradha K., Shyamala B.N., Naidu M.M. Vanilla--its science of cultivation, curing, chemistry, and nutraceutical properties, *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013; 53:1250-76.
- Arora V.K., Philip T., Huang S., Shu Y.Z., A novel ring oxidation of 4- or 5-substituted 2H-oxazole to corresponding 2-oxazolone catalysed by cytosolic aldehyde oxidase, *Drug Metab Dispos*, 2012; 40:1668-1676.
- Ascione A., Cianfriglia M., Dupuis M.L., Mallano A., Sau A., Pellizzari Tregno F., Pezzola S., Caccuri A.M. The glutathione S-transferase inhibitor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol overcomes the MDR1-P-glycoprotein and MRP1-mediated multidrug resistance in acute myeloid leukemia cells, *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 64:419-24.
- Becker W.M., Hardin J., Kleinsmith L.J., Bertoni G., The Endomembrane System and Peroxisomes In: Becker's World of the Cell; 2011 Edited by Pearson Benjamin Cummings.
- Bezerra D.P., Soares A.K., de Sousa D.P. Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development, *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016:9734816.

- Blanchard R.L., Freimuth R.R., Buck J., Weinshilboum R.M., Coughtrie M.W. A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily, *Pharmacogenetics*. 2004; 14:199-211.
- Bohnert T., Patel A., Templeton I., Chen Y., Lu C., Lai G., Leung L., Tse S., Einolf H.J., Wang Y., Sinz M., Stearns R., Walsky R., Geng W., Sudsakorn S., Moore D., He L., Wahlstrom J., Keirns J., Narayanan R., Lang D., Yang X. Evaluation of a new molecular entity as a victim of metabolic drug-drug interactions-an industry perspective, *Drug Metab Dispos*, 2016; 44:1399-1423.
- Bortolozzi R., Mattiuzzo E., Dal Pra M., Sturlese M., Moro S., Hamel E., Carta D., Viola G., Ferlin M.G. Targeting tubulin polymerization by novel 7-aryl-pyrroloquinolinones: Synthesis, biological activity and SARs, *Eur J Med Chem*. 2018; 143:244-258.
- Bradford L.D. The ethnopharmacology of atypical antipsychotics, *CNS Spectr*. 2005; 10:6-12.
- Caccuri A.M., Ascenzi P., Antonini G., Parker M.W., Oakley A.J., Chiessi E., Nuccetelli M., Battistoni A., Bellizia A., Ricci G. Structural flexibility modulates the activity of human glutathione transferase P1-1. Influence of a poor co-substrate on dynamics and kinetics of human glutathione transferase, *J Biol Chem*. 1996; 271:16193-8.
- Calderan L., Caratterizzazione preclinica in vitro di nuovi inibitori non peptidomimetici della glutatione trasferasi P1-1 [Tesi di Dottorato] 2015.
- Carta D., Bortolozzi R., Sturlese M., Salmaso V., Hamel E., Basso G., Calderan L., Quintieri L., Moro S., Viola G., Ferlin M.G. Synthesis, structure-activity relationships and biological evaluation of 7-phenyl-pyrroloquinolinone 3-amide derivatives as potent antimitotic agents, *Eur J Med Chem*. 2017; 127:643-660.
- Cavallito J.C., Nichol C.A., Brenckman W.D. Jr, Deangelis R.L., Stickney D.R., Simmons W.S., Sigel C.W. Lipid-soluble inhibitors of dihydrofolate reductase. I. Kinetics, tissue distribution, and extent of metabolism of pyrimethamine, metoprine, and etoprine in the rat, dog, and man, *Drug Metab Dispos*. 1978; 6:329-37.
- Clarke S.E., Harrell A.W., Chenery R.J. Role of aldehyde oxidase in the in vitro conversion of famciclovir to penciclovir in human liver, *Drug Metab Dispos*. 1995; 23:251-4.
- Coughtrie M.W.H. Function and organization of the human cytosolic sulfotransferase (SULT) family, *Chem Biol Interact*. 2016; 259(Pt A):2-7.
- Dai D., Bai R., Hodgson E., Rose RL. Cloning, sequencing, heterologous expression, and characterization of murine cytochrome P450 3a25\*(Cyp3a25), a testosterone 6beta-hydroxylase, *J Biochem Mol Toxicol*. 2001; 15:90-9.
- Dalzoppo D., Di Paolo V., Calderan L., Pasut G., Rosato A., Caccuri A.M., Quintieri L. Thiol-Activated Anticancer Agents: The State of the Art, *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17:4-20.
- De Luca A., Rotili D., Carpanese D., Lenoci A., Calderan L., Scimeca M., Mai A., Bonanno E., Rosato A., Geroni C., Quintieri L., Caccuri A.M. A novel orally active water-soluble inhibitor of human glutathione transferase exerts a potent and selective antitumor activity against human melanoma xenografts, *Oncotarget*. 2015; 6:4126-43.

- Di L. Reaction phenotyping to assess victim drug-drug interaction risks, *Expert Opin Drug Discov.* 2017; 12:1105-1115.
- Duanmu Z., Weckle A., Koukouritaki S.B., Hines R.N., Falany J.L., Falany C.N., Kocarek T.A., Runge-Morris M. Developmental expression of aryl, estrogen, and hydroxysteroid sulfotransferases in pre- and postnatal human liver, *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 316:1310-7.
- Dumontet C., Jordan M.A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics, *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9:790-803.
- Dunn R.T., Klaassen C.D. Tissue-specific expression of rat sulfotransferase messenger RNAs, *Drug Metab Dispos.* 1998; 26:598-604.
- Durant S., Karran P. Vanillins--a novel family of DNA-PK inhibitors, *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:5501-12.
- Edenberg H.J., Bosron W.F. Alcohol Dehydrogenases In: *Comprehensive Toxicology. McQueen, CA., editor. Oxford:Academic Press; 2010. p. 111-130.*
- Fang B. Genetic Interactions of STAT3 and Anticancer Drug Development, *Cancers (Basel).* 2014; 6:494-525.
- Federici L., Lo Sterzo C., Pezzola S., Di Matteo A., Scaloni F., Federici G., Caccuri A.M. Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol to human glutathione s-transferases, *Cancer Res.* 2009; 69:8025-34.
- Ferlin M.G., Chiarelto G., Gasparotto V., Dalla Via L., Pezzi V., Barzon L., Palù G., Castagliuolo I. Synthesis and in vitro and in vivo antitumor activity of 2-phenylpyrroloquinolin-4-ones, *J Med Chem.* 2005; 48:3417-27.
- Ferone R., Dihydrofolate reductase from pyrimethamine-resistant *Plasmodium berghei*, *J. Biol. Chem.*, 1970; 245:850-854.
- Filomeni G., Turella P., Dupuis M.L., Forini O., Ciriolo M.R., Cianfriglia M., Pezzola S., Federici G., Caccuri A.M. 6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol, a specific glutathione S-transferase inhibitor, overcomes the multidrug resistance (MDR)-associated protein 1-mediated MDR in small cell lung cancer, *Mol Cancer Ther.* 2008; 7:371-9.
- Foti R.S. e Dalvie D.K. Cytochrome P450 and Non-Cytochrome P450 oxidative metabolism: contributions to the pharmacokinetics, safety, and efficacy of xenobiotics, *Drug Metab Dispos.* 2016; 44:1229-1245.
- Fu C., Di L., Han X., Soderstrom C., Snyder M., Troutman M.D., Obach R.S., Zhang H. Aldehyde oxidase 1 (AOX1) in human liver cytosols: quantitative characterization of AOX1 expression level and activity relationship, *Drug Metab Dispos.* 2013; 41:1797804.
- Fulci C., Rotili D., De Luca A., Stella L., Morozzo Della Rocca B., Forgione M., Di Paolo V., Mai A., Falconi M., Quintieri L., Caccuri A.M., A new nitrobenzoxadiazole-based GSTP1-1 inhibitor with a previously unheard of mechanism of action and high stability, *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017;32:240-247.

- Gamage N., Barnett A., Hempel N., Duggleby R.G., Windmill K.F., Martin J.L., McManus M.E. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism, *Toxicol Sci.* 2006;90:5-22.
- Garattini E., Terao M. Aldehyde oxidase and its importance in novel drug discovery: present and future challenges, *Expert Opin Drug Discov.* 2013;8:641-54.
- Giammarioli A.M., Maselli A., Casagrande A., Gambardella L., Gallina A., Spada M., Giovannetti A., Proietti E., Malorni W., Pierdominici M. Pyrimethamine induces apoptosis of melanoma cells via a caspase and cathepsin double-edged mechanism, *Cancer Res.* 2008; 68:5291-300.
- Gildenhuis S., Wallace L.A., Burke J.P., Balchin D., Sayed Y., Dirr H.W. Class Pi glutathione transferase unfolds via a dimeric and not monomeric intermediate: functional implications for an unstable monomer, *Biochemistry.* 2010; 49:5074-81.
- Godwin P., Baird A.M., Heavey S., Barr M.P., O'Byrne K.J., Gately K. Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy, *Front Oncol.* 2013; 3:120.
- Gunnarsdottir S., Elfarra A.A. Glutathione-dependent metabolism of cis-3-(9H-purin-6-ylthio)acrylic acid to yield the chemotherapeutic drug 6-mercaptopurine: evidence for two distinct mechanisms in rats, *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 290:950-7.
- Habig, W.H., Pabst M.J., Jacobi W.B., Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.*, 1974; 249:7130-7139.
- Harper T.W., Brassil P.J. Reaction phenotyping: current industry efforts to identify enzymes responsible for metabolizing drug candidates, *AAPS J.* 2008;10:200-7.
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88.
- Hayes J.D., Pulford D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30:445-600.
- Hebbring S.J., Adjei A.A., Baer J.L., Jenkins G.D., Zhang J., Cunningham J.M., Schaid D.J., Weinshilboum R.M., Thibodeau S.N. Human SULT1A1 gene: copy number differences and functional implications, *Hum Mol Genet.* 2007; 16:463-70.
- Hinchman C.A., Ballatori N. Glutathione-degrading capacities of liver and kidney in different species, *Biochem Pharmacol.*, 1990; 40:1131-5.
- Hinchman C.A., Matsumoto H., Simmons T.W., Ballatori N., Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers, *J Biol Chem.* 1991; 266:22179-85.
- Hubbell J.P., Henning M.L., Grace M.E., Nichol C.A., Sigel C.W. N-oxide metabolites of the 2,4-diaminopyrimidine inhibitors of dihydrofolate reductase, trimethoprim, pyrimethamine and metoprine. In: Garrod J.W. (ed) Biological oxidation of nitrogen, *Elsevier-North Holland Biomedical*, New York, 1978; pp. 177-182.

- Hutzler J.M., Cook J., Fleishaker J.C. Pharmacokinetics In Drug Development Advances and Application, *Volume 3 Bonate P.L., Howard D.R. (Eds.)* 2011, XII, 21-56p.
- Islam M.N., Iskander M.N. Microtubulin binding sites as target for developing anticancer agents, *Mini Rev Med Chem.* 2004; 4:1077-104.
- Jackson B., Brocker C., Thompson D.C., Black W., Vasiliou K., Nebert D.W., Vasiliou V. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily, *Hum Genomics.* 2011; 5:283-303.
- James M.O., Ambadapadi S. Interactions of cytosolic sulfotransferases with xenobiotics, *Drug Metab Rev.* 2013; 45:401-14.
- Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents, *Nat Rev Cancer.* 2010; 10:194-204.
- Kawai M., Bandiera S.M., Chang T.K., Bellward G.D. Growth hormone regulation and developmental expression of rat hepatic CYP3A18, CYP3A9 and CYP3A2, *Biochem Pharmacol.* 2000; 59:1277-87.
- Keppler D. Export pumps for glutathione S-conjugates, *Free Radic Biol Med.* 1999; 27:985-91.
- Khan M.W., Saadalla A., Ewida A.H., Al-Katranji K., Al-Saoudi G., Giaccone Z.T., Gounari F., Zhang M., Frank D.A., Khazaie K. The STAT3 inhibitor pyrimethamine displays anti-cancer and immune stimulatory effects in murine models of breast cancer, *Cancer Immunol Immunother.* 2018; 67:13-23.
- Kirchmair J., Göller A.H., Lang D., Kunze J., Testa B., Wilson I.D., Glen R.C., Schneider G. Predicting drug metabolism: experiment and/or computation? *Nat Rev Drug Discov.* 2015; 14:387-404.
- Kishida T., Muto S., Hayashi M., Tsutsui M., Tanaka S., Murakami M., Kuroda J. Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *J Toxicol Sci.* 2008; 33:447-57.
- Koppaka V., Thompson D.C., Chen Y., Ellermann M., Nicolaou K.C., Juvonen R.O., Petersen D., Deitrich R.A., Hurley T.D., Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application, *Pharmacol Rev.* 2012; 64:520-39.
- Kueh H.Y., Mitchison T.J. Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics, *Science.* 2009; 325:960-3.
- Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death, *Cell Death Differ.* 2010; 17:1373-80.
- Lin J.H. e Lu A.Y. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development, *Pharmacol Rev.* 1997; 49:403-49.
- Lirdpramongkol K., Kramb J.P., Suthiphongchai T., Surarit R., Srisomsap C., Dannhardt G., Svasti J. Vanillin suppresses metastatic potential of human cancer cells through PI3K inhibition and decreases angiogenesis in vivo, *J Agric Food Chem.* 2009; 57:3055-63.

- Lirdprapamongkol K., Sakurai H., Kawasaki N., Choo M.K., Saitoh Y., Aozuka Y., Singhirunnosorn P., Ruchirawat S., Svasti J., Saiki I. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells, *Eur J Pharm Sci.* 2005; 25:57-65.
- Ma B., Schrag M. Sulfotransferases In: Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions. 2012; Edited by Alexander V. Lyubimov, First Edition 6-Volume Set.
- Mahnke A., Strotkamp D., Roos P.H., Hanstein W.G., Chabot G.G., Nef P. Expression and inducibility of cytochrome P450 3A9 (CYP3A9) and other members of the CYP3A subfamily in rat liver, *Arch Biochem Biophys.* 1997; 337:62-8.
- Marchitti S.A., Brocker C., Stagos D., Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily, *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008; 4:697-720.
- Marto N., Morello J., Monteiro E.C., Pereira S.A. Implications of sulfotransferase activity in interindividual variability in drug response: clinical perspective on current knowledge, *Drug Metab Rev.* 2017; 49:357-371.
- Marton A., Kúsz E., Kolozsi C., Tubak V., Zagotto G., Buzás K., Quintieri L., Vizler C. Vanillin Analogues o-Vanillin and 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde Inhibit NFκB Activation and Suppress Growth of A375 Human Melanoma, *Anticancer Res.* 2016;36:5743-5750.
- Meerman J.H., Ringer D.P., Coughtrie M.W., Bamforth K.J., Gilissen R.A. Sulfation of carcinogenic aromatic hydroxylamines and hydroxamic acids by rat and human sulfotransferases: substrate specificity, developmental aspects and sex differences, *Chem Biol Interact.* 1994; 92:321-8.
- Mugford C.A. e Kedderis G.L. Sex-dependent metabolism of xenobiotics, *Drug Metab Rev.* 1998; 30:441-98.
- Mukhtar E., Adhami V.M., Mukhtar H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy, *Mol Cancer Ther.* 2014;13:275-84.
- Murphy C.D., Sandford G. Recent advances in fluorination techniques and their anticipated impact on drug metabolism and toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015;11:589-99.
- Nagar S., Walther S., Blanchard R.L. Sulfotransferase (SULT) 1A1 polymorphic variants \*1, \*2, and \*3 are associated with altered enzymatic activity, cellular phenotype, and protein degradation, *Mol Pharmacol.* 2006; 69:2084-92.
- Nelson D.R., Zeldin D.C., Hoffman S.M., Maltais L.J., Wain H.M., Nebert D.W. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants, *Pharmacogenetics.* 2004;14:1-18.
- Nelson E.A., Sharma S.V., Settleman J., Frank D.A. A chemical biology approach to developing STAT inhibitors: molecular strategies for accelerating clinical translation, *Oncotarget.* 2011; 2:518-24.
- Nicholas J.S. e Barron D.H. The use of sodium amytal in the production of anesthesia in the rat, *J Pharmacol Exp Ther.* 1932; 46:125-129.

- Obach R.S. Inhibition of human Cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an Herbal Preparation used in the treatment of depression. *JPET*. 2000; 294:88-95.
- Ono S., Hatanaka T., Hotta H., Satoh T., Gonzalez F.J., Tsutsui M. Specificity of substrate and inhibitor probes for cytochrome P450s: evaluation of in vitro metabolism using cDNA-expressed human P450s and human liver microsomes, *Xenobiotica*. 1996; 26:681-93.
- Panoutsopoulos G.I., Beedham C., Enzymatic oxidation of vanillin, isovanillin and protocatechuic aldehyde with freshly prepared Guinea pig liver slices, *Cell Physiol Biochem*, 2005;15:89-98.
- Panoutsopoulos G.I., Kouretas D., Beedham C., Contribution of aldehyde oxidase, xanthine oxidase, and aldehyde dehydrogenase on the oxidation of aromatic aldehydes, *Chem Res Toxicol*, 2004; 17:1368-1376.
- Park E.J., Lee Y.M., Oh T.I., Kim B.M., Lim B.O., Lim J.H. Vanillin Suppresses Cell Motility by Inhibiting STAT3-Mediated HIF-1 $\alpha$  mRNA Expression in Malignant Melanoma Cells, *Int J Mol Sci*. 2017; 18(3).
- Parkinson e Ogilvie Biotrasformazione degli xenobiotici in Casarett&Doull's – Tossicologia - I fondamenti dell'azione delle sostanze tossiche, EMSI, settima edizione italiana, 2010.
- Pasello M., Manara M.C., Michelacci F., Fanelli M., Hattinger C.M., Nicoletti G., Landuzzi L., Lollini P.L., Caccuri A., Picci P., Scotlandi K., Serra M. Targeting glutathione-S transferase enzymes in musculoskeletal sarcomas: a promising therapeutic strategy, *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2011; 34:131-45.
- Pryde D.C., Dalvie D., Hu Q., Jones P., Obach R.S., Tran T.D. Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery, *J Med Chem*. 2010; 53:8441-60.
- Quintanilla M.E., Tampier L., Sapag A., Gerdtzen Z., Israel Y. Sex differences, alcohol dehydrogenase, acetaldehyde burst, and aversion to ethanol in the rat: a systems perspective, *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 293:E531-7.
- Quintieri L Biotrasformazione dei farmaci. In: Dorigo P. Farmacologia generale III ed. *CEDAM*, pp 144-173. Padova, 2006.
- Quintieri L., Fantin M., Palatini P., De Martin S., Rosato A., Caruso M., Geroni C., Floreani M. In vitro hepatic conversion of the anticancer agent nemorubicin to its active metabolite PNU-159682 in mice, rats and dogs: a comparison with human liver microsomes, *Biochem Pharmacol*. 2008;76:784-95.
- Rastogi H., Jana S. Evaluation of inhibitory effects of caffeic acid and quercetin on human liver cytochrome p450 activities. *Phytother Res*. 2014; 28:1873-8.
- Renaud H.J., Cui J.Y., Khan M., Klaassen C.D. Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice, *Toxicol Sci*. 2011; 124:261-77.
- Ricci G., De Maria F., Antonini G., Turella P., Bullo A., Stella L., Filomeni G., Federici G., Caccuri A.M. 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione S-transferases. Mechanism of action of potential anticancer drugs, *J Biol Chem*. 2005; 280:26397-405.

- Riches Z., Stanley E.L., Bloomer J.C., Coughtrie M.W. Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT "pie", *Drug Metab Dispos.* 2009; 37:2255-61.
- Rinn J.L., Rozowsky J.S., Laurenzi I.J., Peterson P.H., Zou K., Zhong W., Gerstein M., Snyder M. Major molecular differences between mammalian sexes are involved in drug metabolism and renal function, *Dev Cell*, 2004; 6:791-800.
- Romão M.J., Coelho C., Santos-Silva T., Foti A., Terao M., Garattini E., Leimkühler S. Structural basis for the role of mammalian aldehyde oxidases in the metabolism of drugs and xenobiotics, *Curr Opin Chem Biol.* 2017; 37:39-47.
- Ross M. K., Borazjani A., Wang R., Crow J. A., Xie S., Examination of the carboxylesterase phenotype in human liver, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012; 522:42-56.
- Ruzza P., Rosato A., Rossi C.R., Floreani M., Quintieri L. Glutathione transferases as targets for cancer therapy, *Anticancer Agents Med Chem.* 2009; 9:763-77.
- Sakuma T., Endo Y., Mashino M., Kuroiwa M., Ohara A., Jarukamjorn K., Nemoto N. Regulation of the expression of two female-predominant CYP3A mRNAs (CYP3A41 and CYP3A44) in mouse liver by sex and growth hormones, *Arch Biochem Biophys.* 2002; 404:234-42.
- Sakuma T., Takai M., Endo Y., Kuroiwa M., Ohara A., Jarukamjorn K., Honma R., Nemoto N. A novel female-specific member of the CYP3A gene subfamily in the mouse liver, *Arch Biochem Biophys.* 2000; 377:153-62.
- Sanoh S., Tayama Y., Sugihara K., Kitamura S., Ohta S. Significance of aldehyde oxidase during drug development: Effects on drug metabolism, pharmacokinetics, toxicity, and efficacy, *Drug Metab Pharmacokinet.* 2015; 30:52-63.
- Sau A., Pellizzari Tregno F., Valentino F., Federici G., Caccuri A.M. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance, *Arch Biochem Biophys.* 2010; 500:116-22.
- Shapiro B.H., Agrawal A.K., Pampori N.A. Gender differences in drug metabolism regulated by growth hormone, *Int J Biochem Cell Biol*, 1995; 27:9-20.
- Simic T., Savic-Radojevic A., Pljesa-Ercegovac M., Matic M., Mimic-Oka J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors, *Nat Rev Urol.* 2009; 6:281-9.
- Simon F.R., Fortune J., Iwahashi M., Sutherland E. Sexual dimorphic expression of ADH in rat liver: importance of the hypothalamic-pituitary-liver axis, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283:G646-55.
- Steinmetz M.O., Prota A.E. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton, *Trends Cell Biol.* 2018 Epub ahead of print PMID 29871823.
- Suiko M., Kurogi K., Hashiguchi T., Sakakibara Y., Liu M.C. Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation, *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017; 81:63-72.

- Tayama Y., Moriyasu A., Sugihara K., Ohta S., Kitamura S. Developmental changes of aldehyde oxidase in postnatal rat liver, *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007; 22:119-24.
- Tayama Y., Sugihara K., Sanoh S., Miyake K., Kitamura S., Ohta S. Developmental changes of aldehyde oxidase activity and protein expression in human liver cytosol, *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012; 27:543-7.
- Terao M., Romão M.J., Leimkühler S., Bolis M., Fratelli M., Coelho C., Santos-Silva T., Garattini E. Structure and function of mammalian aldehyde oxidases, *Arch Toxicol.* 2016; 90:753-80.
- Tilborghs S., Corthouts J., Verhoeven Y., Arias D., Rolfo C., Trinh X.B., van Dam P.A. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer, *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017; 120:141-150.
- Tingle M.D. e Helsby N.A. Can in vitro drug metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies?, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2006; 21:184-190.
- Tommasino C., Gambardella L., Buoncervello M., Griffin R.J., Golding B.T., Alberton M., Macchia D., Spada M., Cerbelli B., d'Amati G., Malorni W., Gabriele L., Giammarioli A.M. New derivatives of the antimalarial drug Pyrimethamine in the control of melanoma tumor growth: an in vitro and in vivo study, *J Exp Clin Cancer Res.* 2016; 35:137.
- Townsend D.M., Tew K.D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance, *Oncogene.* 2003; 22:7369-75.
- Turella P., Filomeni G., Dupuis M.L., Ciriolo M.R., Molinari A., De Maria F., Tombesi M., Cianfriglia M., Federici G., Ricci G., Caccuri A.M. A strong glutathione S-transferase inhibitor overcomes the P-glycoprotein-mediated resistance in tumor cells. 6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) triggers a caspase-dependent apoptosis in MDR1-expressing leukemia cells, *J Biol Chem.* 2006; 281:23725-32.
- Venkatachalam K.V. Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthase: biochemistry, molecular biology and genetic deficiency, *IUBMB Life.* 2003; 55:1-11.
- Wang X., Crowe P.J., Goldstein D., Yang J.L. STAT3 inhibition, a novel approach to enhancing targeted therapy in human cancers (review), *Int J Oncol.* 2012; 41:1181-91.
- Waxman D.J. e Holloway M.G. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes, *Mol Pharmacol.* 2009; 76:215-228.
- Williams J.A., Hurst S.I., Bauman J., Jones B.C., Hyland R., Gibbs J.P., Obach R.S., Ball S.E. Reaction phenotyping in drug discovery: moving forward with confidence?, *Curr Drug Metab.* 2003;4:527-34.
- Wong K.P., Sourkes T.L. Metabolism of vanillin and related substances in the rat, *Can J Biochem.* 1966; 44:635-44.
- Wrighton S.A., Ring B.J., VandenBranden M. The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies, *Toxicol Pathol*, 1995; 23:199-208.

- Xia L., Tan S., Zhou Y., Lin J., Wang H., Oyang L., Tian Y., Liu L., Su M., Wang H., Cao D, Liao Q. Role of the NFκB-signaling pathway in cancer, *Onco Targets Ther.* 2018; 11:2063-2073.
- Yoshinara S., Tatsumi K. Purification and characterization of hepatic aldehyde oxidase in male and female mice, *Arch Biochem Biophys.* 1997; 338:29-34.
- Yu J., Han J.C., Hua L.M., Gao Y.J. In vitro characterization of glucuronidation of vanillin: identification of human UDP-glucuronosyltransferases and species differences, *Phytother Res.* 2013; 27:1392-7.
- Zhang H., Davis C.D., Sinz M.W., Rodrigues A.D. Cytochrome P450 reaction-phenotyping: an industrial perspective, *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007; 3:667-87.
- Zientek M.A., Youdim K. Reaction phenotyping: advances in the experimental strategies used to characterize the contribution of drug-metabolizing enzymes, *Drug Metab Dispos.* 2015; 43:163-81.

## ***RINGRAZIAMENTI***

*Giunta al termine di questo percorso desidero ringraziare per la competenza, la disponibilità e l'umanità dimostrata durante la mia formazione il Dott. Quintieri, punto di riferimento per l'attività di ricerca svolta in questi anni. Un grazie sentito al Dott. Dalzoppo per il prezioso aiuto nell'esecuzione degli esperimenti di spettrometria di massa e l'interpretazione dei dati.*

*Un ringraziamento speciale ai miei genitori, ai quali dedico questo lavoro di tesi e questo traguardo, senza dei quali nulla sarebbe stato possibile; grazie per aver creduto sempre in me e per essere stati sempre i primi al mio fianco nei momenti felici così come nei momenti più impegnativi.*

*Grazie a Francesco che con pazienza e amore mi è stato vicino in questi anni.*