



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE**

**TITOLO DELLA TESI**

**La scoperta di nuovi farmaci antitumorali a base di rame**

**Relatore: Prof. Fernando Formaggio**

**Laureanda: Stefania Mautone  
1169057**

**Anno Accademico 2022/2023**



*Questo lavoro è interamente dedicato a mia zia che ha lottato, per sette anni, contro un tumore che non è riuscita a sconfiggere... sette lunghi anni di luci e ombre, di speranze e di rassegnazioni, di conforti e di sfiducie e infine solo dolore e sofferenza.... A mia zia dico grazie perché mi ha insegnato a lottare e ad essere sempre forte perché è proprio in queste dure prove che la vita ci mette di fronte, che si capisce il valore immenso della vita stessa e che vale sempre la pena lottare per proteggerla, fino all'ultimo respiro.*

*Ci tengo, poi, a ringraziare la mia famiglia, che senza il loro sostegno e supporto non sarei mai arrivata a questo traguardo, e ringrazio mio fratello, un pilastro importante, che mi è stato vicino in questo percorso e, a modo suo, mi ha insegnato a spiccare il volo e soprattutto a far emergere il mio potenziale...*

## INDICE

### Sommario

TUMORE: ASPETTI GENERALI .....	3
RAME: ELEMENTO CHIMICO E LE SUE FUNZIONI PER L'ORGANISMO .....	5
GLI EFFETTI ANTITUMORALI DEI COMPOSTI DI COORDINAZIONE DEL CU .....	6
CHELANTI DEL CU NELLA TERAPIA DEL CANCRO .....	7
4.1 Tetratiomolibdato di ammonio (ATTM) .....	8
4.2 Sintesi.....	8
4.3 Struttura, legami e stabilità .....	9
4.4 Legame chelante .....	9
4.5 Antagonismo Mo-Cu .....	12
4.6 Farmaco .....	13
IONOFORI DEL CU NELLA TERAPIA DEL CANCRO .....	13
5.1 Disulfiram o DSF .....	14
5.2 Chimica e farmacocinetica del disulfiram.....	14
5.3 Meccanismi antitumorali del disulfiram .....	15
5.4 La reazione chimica tra DSF e Cu <sup>2+</sup> .....	16
5.5 Cu media il danno da stress ossidativo .....	16
5.6 Attività antitumorale di CuEt .....	17
5.7 Strategie per aumentare la selettività degli ionofori Cu .....	17
CONCLUSIONE .....	19

## INTRODUZIONE

Questo elaborato è incentrato sulla scoperta di nuovi farmaci antitumorali a base di rame. Al giorno d'oggi, i farmaci antitumorali usati nella chemioterapia sono a base di platino e altri metalli, che provocano un impatto estremamente tossico per l'organismo perché spesso non sono selettivi. Proprio per questo la ricerca si sta concentrando sullo sviluppo di farmaci definiti "target drugs", ovvero molecole che puntano verso bersagli precisi. Tra questi, sono in fase di studio complessi a base di rame (Cu), poiché il rame è un elemento endogeno, ovvero è un metallo presente in piccole quantità nel nostro corpo e di conseguenza viene riconosciuto di più rispetto ad altri come il platino; pertanto, il rame rappresenta il punto di partenza per la preparazione di diversi composti che possano essere meglio tollerati rispetto a quelli che vengono utilizzati oggi in terapia. La molecola, costituente il farmaco antitumorale, viene definita smart, cioè intelligente, perché è indirizzata esclusivamente verso le cellule tumorali. Infatti, il meccanismo d'azione di questi nuovi farmaci sfrutta una caratteristica delle cellule tumorali stesse: esse richiedono una quantità di rame, essenziale per la crescita cellulare, molto più elevata rispetto alle cellule sane perché si moltiplicano più rapidamente. Pertanto, il rame si può sfruttare come veicolo selettivo per scatenare una cascata di segnali che culminano con la morte delle cellule tumorali. Anche questi farmaci, come tanti altri, sono stati definiti 'cavallo di Troia' perché ingannano quello che è il meccanismo fisiologico delle cellule tumorali che credono di sfruttare il rame per alimentare la propria crescita e invece vengono eliminate<sup>[1]</sup>. Tutto questo è possibile grazie alla natura chimica del rame che mostra un enorme potenziale di generazione dei radicali liberi. Pertanto, una volta opportunamente complessato, può essere usato come farmaco nella terapia del cancro con bassi effetti avversi.

## TUMORE: ASPETTI GENERALI

L'origine di un tumore è dovuta a mutazioni genetiche. In particolare, durante il processo di mitosi, avviene un fenomeno estremamente complesso e di straordinaria importanza: la cellula deve fare una copia esatta del suo DNA, in modo che le cellule figlie ereditino lo stesso DNA e contengano quindi tutte le informazioni necessarie per funzionare. Questo processo viene svolto da un enzima, la DNA polimerasi, che scorre lungo il filo di DNA e lo copia in modo perfettamente esatto, generando due fili identici, ma questo straordinario lavoro viene svolto anche e soprattutto da altre proteine che riparano eventuali errori di copiatura. In generale, si trovano al massimo due-tre errori per copiatura che prendono il nome di mutazioni. Le mutazioni non sono tutte uguali e si classificano in base alle loro conseguenze: quando queste si susseguono in modo caotico e rapido possono contribuire in maniera determinante al cancro. Infatti, studi recenti <sup>[2]</sup> hanno dimostrato che sono necessarie almeno quattro-cinque mutazioni e forse di più all'interno della stessa cellula. Inoltre, non è necessario che si verifichino nello stesso momento, ma si possono manifestare nel tempo, in successive generazioni cellulari, perché vengono ereditate dalle cellule figlie. Ad ogni modo, considerando che l'organismo è costituito da decine di migliaia di miliardi di cellule e che le mutazioni sono un evento raro, è chiaro che la probabilità che si verifichino nella stessa cellula un numero maggiore o uguale a cinque è estremamente bassa, così bassa che il tumore dovrebbe essere una malattia rara. Purtroppo non è così, poiché subentra una strategia ancora più subdola, messa in atto dal semplice fatto che la cellula, in seguito alle mutazioni dannose, cambia il suo programma e si comporta seguendo un nuovo piano di funzionamento. Tutto si sviluppa secondo quella che è definita 'storia naturale del cancro', in cui il cancro si manifesta seguendo una direzione, una logica, un programma e delle regole che due grandi scienziati, Hanahan e Weinberg, hanno codificato in dieci marchi, definiti *hallmarks*<sup>[2]</sup>. Nello specifico, si va dal primo marchio, in cui la cellula si libera dal controllo esterno sulla proliferazione e diventa capace di prodursi autonomamente, fino ad arrivare all'ultimo della metastasi, in cui il cancro si è diffuso e ha abbattuto qualsiasi barriera difensiva, in sostanza si è impadronito del corpo. Arrivati a questo punto la domanda che sorge spontanea è: qual è l'origine di queste mutazioni? Non esiste un'origine specifica. Il cancro, come tutti i sistemi biologici è complesso e pertanto richiede spiegazioni complesse. In pratica, possono essere tante le cause delle mutazioni e si possono dividere in endogene ed esogene. Le cause endogene sono quelle provenienti dal nostro interno, sono considerate le più letali minacce mutazionali e, in particolare, possono scaturire da due differenti fattori:

1. il meccanismo stesso della replicazione del DNA;
2. i veleni endogeni che il nostro organismo produce, derivanti dalla normale funzione del metabolismo; alcuni di questi prodotti di scarto sono genotossici, cioè hanno la capacità di indurre mutazioni, tra cui i radicali liberi.

Nelle cause esogene, invece, rientrano tutti gli agenti cancerogeni provenienti dall'ambiente.

Da come si può intuire risulta difficile trovare una cura al tumore. Se pensiamo ai secoli

scorsi, si è riusciti a sconfiggere un ampio spettro di malattie, anche quelle più dannose, come la peste, la febbre tifoide, la polmonite, ecc... e tutto questo grande successo è stato possibile grazie al fatto che ognuna di queste malattie è generata da batteri, virus, parassiti, dotati di geni diversi da quelli umani. Sono stati scoperti farmaci, tra cui antibiotici e vaccini, mirati contro bersagli precisi, grazie all'isolamento, allo studio e alla comprensione di questi geni, così diversi dai nostri, che hanno consentito alla ricerca di fare grandi passi in avanti. Nel caso di un tumore diventa difficile avanzare perché sono tante le cause che sommate tra loro impediscono di giungere ad una soluzione, tra queste:

- 1) il cancro è generato da mutazioni cellulari, ma il DNA delle cellule mutate è praticamente identico a quello delle cellule sane, che svolgono le regolari funzioni per consentire il benessere all'organismo nella sua totalità.
- 2) Risulta estremamente complicato individuare quali geni sono mutati nel cancro, poiché queste mutazioni definite *driver*, che sono quelle che determinano il cancro, sono pochissime (4-5) e vengono nascoste nelle mutazioni *passenger*, cioè nelle migliaia di mutazioni che avvengono normalmente all'interno della cellula.
- 3) Il cancro costituisce un insieme di malattie, simili nel comportamento biologico ma diverse nei loro meccanismi molecolari: la causa di questo è che la cellula assume un fenotipo mutatore, in sostanza accumula mutazioni in maniera incontrollata e una volta che la prima cellula staminale del cancro si sarà formata, essa continuerà a dividersi, a mutare e cambiare casualmente. Ciò implica che le cellule figlie della prima cellula staminale del cancro muteranno in maniera diversa e indipendente dalle altre, di conseguenza più il cancro cresce e più al suo interno si sviluppano popolazioni di cellule tutte in parte diverse tra loro, rivelando una sfumatura non immediatamente percepibile: il cancro è un'entità intrinsecamente eterogenea. Su questa terza causa poggia un problema fondamentale, per cui oggi non può esistere un'unica terapia, ma tante terapie per i vari tipi di cancro con farmaci specifici per combattere le alterazioni molecolari presenti nei vari tipi di tumori.

Uno dei pilasti fondamentali della terapia dei tumori è la chemioterapia, in cui vengono somministrati tutta una serie di farmaci, come gli agenti alchilanti, gli antimetaboliti, gli inibitori dei microtubuli, gli agenti intercalanti, e altri con funzioni specifiche<sup>[2]</sup>; ma la questione è alquanto complicata, poiché tutti questi farmaci, adoperati tradizionalmente, sono tutti citotossici e cioè uccidono le cellule neoplastiche - ovvero tumorali - ma anche quelle sane. Purtroppo, vengono lo stesso adoperati in quanto al momento rappresentano l'unica soluzione, anche se si cerca di renderli più compatibili con il corpo umano, dosandoli opportunamente. In base alla quantità iniettata, essi uccidono le cellule tumorali più efficacemente di quanto non uccidano le cellule normali, poiché colpiscono preferenzialmente processi già danneggiati nella cellula tumorale e questo rappresenta un principio fondamentale su cui si basa la chemioterapia oggi in atto: dal momento che la funzione principale delle cellule tumorali è quella di mutare rapidamente, se queste entrano in contatto con un farmaco che induce a loro volta mutazioni, si arriverà ad un punto in cui la cellula avrà accumulato così tante mutazioni da diventare incapace di funzionare e bloccarsi nella proliferazione e addirittura morire<sup>[2]</sup>. Il problema è che non è

tutto così semplice come potrebbe sembrare, poiché non esiste nessuna dose di farmaco che non uccida per nulla le cellule sane. Questo è il motivo per cui la chemioterapia porta una certa dose di tossicità, nella maggior parte dei casi cronica. I farmaci tradizionalmente impiegati e in uso ancora oggi sono a base di platino: il cisplatino, che è stato il primo, e i suoi analoghi carboplatino e oxaliplatino, introdotti successivamente. La funzione di questi farmaci è quella di agire formando legami incrociati del DNA che inibiscono la sua replicazione e arrestano la divisione cellulare. In queste condizioni il sistema di riparazione del DNA si attiva e, se il danno non viene riparato in un tempo ragionevole, si attiva l'apoptosi, che è un fenomeno controllato geneticamente che determina la morte programmata di una cellula, consentendone l'autodistruzione. Purtroppo, oltre al problema degli effetti collaterali, un altro importante limite che si oppone all'efficacia dei farmaci a base di platino è la rapida insorgenza di resistenza, che si sviluppa attraverso adattamenti cellulari con conseguente riduzione dell'assorbimento del farmaco e fallimento del trattamento. Tutto ciò richiede terapie alternative ai farmaci a base di platino che sensibilizzino nuovamente le cellule<sup>[3]</sup>.

## **RAME: LE SUE FUNZIONI PER L'ORGANISMO**

Da un punto di vista chimico, il rame è il 29° elemento della tavola periodica di Mendeleev, appartenente al gruppo 11 e al blocco dei metalli di transizione. Esiste in tre stati di ossidazione: Cu(III), Cu(II) e Cu(I), di cui lo stato di ossidazione più favorevole è Cu(II) con una configurazione elettronica  $d^9$ <sup>[4]</sup>. La natura metallica del rame è fondamentale per lo sviluppo di complessi con proprietà antineoplastiche per due motivi fondamentali:

1. il rame è un elemento endogeno, ovvero dopo lo zinco e il ferro, è il terzo metallo essenziale per l'organismo. La quantità media di rame nel corpo umano è di circa 100 mg ed è sempre legato alle proteine chaperone che ne regolano l'omeostasi per evitare reazioni indesiderate. In queste condizioni rappresenta un cofattore catalitico<sup>1</sup> essenziale nella chimica redox<sup>2</sup> delle proteine necessarie per la crescita e lo sviluppo. Tale caratteristica ha reso il rame cruciale per gli eucarioti. Infatti, il rame partecipa alla generazione di energia nella catena respiratoria mitocondriale, alla difesa antiossidante e a molti altri processi essenziali.
2. Quantità elevate di rame nelle cellule sono coinvolte nello sviluppo di malattie, tra cui il cancro. Le cellule tumorali presentano un'omeostasi anormale del rame, in particolare le linee cellulari cancerose, i tessuti e il siero dei pazienti mostrano livelli aumentati di rame, suggerendo che questo metallo è necessario per almeno tre fenomeni caratteristici coinvolti nella progressione del cancro:

---

<sup>1</sup> Un cofattore catalitico è una molecola organica o uno ione inorganico che si lega all'enzima rendendo possibile l'attività catalitica. La maggior parte degli enzimi richiede il legame a cofattori e nel caso di assenza di quest'ultimo, l'enzima perde la sua funzionalità.

<sup>2</sup> 2. Reazione di ossidoriduzione (redox) che comporta il trasferimento di elettroni tra due specie chimiche e può essere scomposta in due semireazioni: di riduzione in cui la specie acquista elettroni e di ossidazione in cui la specie cede elettroni) metti una nota a pie di pagina dove dai la definizione di queste due cose.

- a) proliferazione cellulare (nuovi studi hanno dimostrato che le protein-chinasi, coinvolte in questo processo, sono proteine che legano il rame);
- b) stimolazione dell'angiogenesi<sup>[5]</sup> (è il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni, il sangue costituisce il mezzo affinché le cellule possano ricevere o scambiare molecole essenziali ed eliminare sostanze di scarto; per sopravvivere e crescere il tumore deve perciò crearsi una propria rete vascolare);<sup>[6]</sup>
- c) metastasi (il rame può migliorare la capacità di cellule cancerose a metastatizzare attraverso l'attivazione di enzimi metabolici e proliferativi)<sup>[7]</sup>.

## **GLI EFFETTI ANTITUMORALI DEI COMPOSTI DI COORDINAZIONE DEL CU**

Esistono due approcci principali per colpire l'omeostasi anormale del rame presente nelle cellule tumorali:

1. L'uso di chelanti che legano il rame mediante il processo di formazione di un complesso. L'effetto antitumorale di questa attività è quello di ridurre la biodisponibilità del rame per la proliferazione tumorale, l'angiogenesi e le metastasi.
2. L'uso degli ionofori del rame che, al contrario, forniscono il rame alle cellule per aumentare i suoi livelli intracellulari. La modalità di azione degli ionofori è varia e comprende: l'interazione del DNA, l'inibizione del proteasoma (complesso multiproteico che ha la funzione di degradare le proteine danneggiate o non più utili, con emivita breve) e la generazione di ROS (specie reattive dell'ossigeno, responsabili dello stress ossidativo e del danno ossidativo, con la distruzione parziale o totale del doppio strato lipidico nelle membrane e delle proteine di alterazione, che culminano nella morte della cellula per necrosi o apoptosi)<sup>[8]</sup>. In questo elaborato sarà analizzata l'ultima modalità di azione.

Le attività antitumorali più note dei complessi di coordinazione del Cu sono riassunte nelle figura 1.

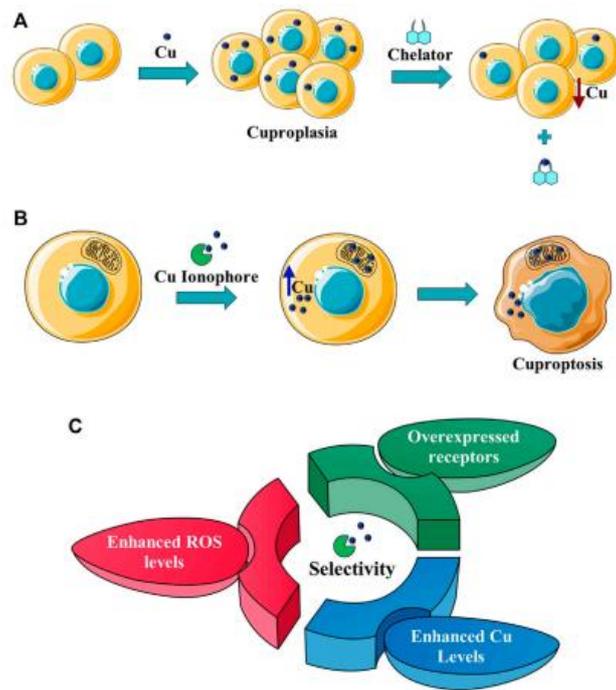


Figura 1: (A) I chelanti di Cu inibiscono la proliferazione cellulare Cu-dipendente, diminuendone la concentrazione intracellulare; (B) Gli ionofori di Cu aumentano i livelli di Cu intracellulari (in particolare nei mitocondri) e portano alla morte cellulare; (C) la selettività intrinseca degli ionofori di Cu deriva da diversi fattori: l'aumento dei livelli di Cu nei tessuti tumorali, i livelli aumentati di specie ROS che rendono le cellule tumorali più suscettibili a un ulteriore aumento dello stress ossidativo e il targeting dei recettori sovra espressi nelle cellule tumorali<sup>[9]</sup>.

## CHELANTI DEL CU NELLA TERAPIA DEL CANCRO

Sono stati scoperti una serie di chelanti per il rame, che agiscono da inibitori per l'angiogenesi e compromettono la crescita e la metastasi del cancro. Finora, le attività antitumorali dei chelanti del rame sono state studiate in una grande varietà di tipi di tumore. Un esempio rappresentativo di chelante del rame è il tetratiomolibdato di ammonio (ATTM, figura 2).

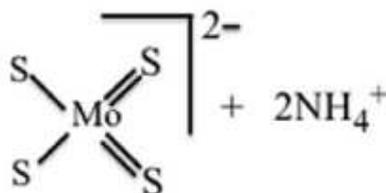


Figura 2: Struttura molecolare del tetratiomolibdato d'ammonio.

#### 4.1 Tetratiomolibdato di ammonio (ATTM)

Lo sviluppo di ATTM come farmaco chelante del rame, per il trattamento delle malattie umane con sovraccarico di rame, nasce dalla scoperta dell'interazione Cu-TTM nella nutrizione degli animali ruminanti. A metà degli anni '30, molti rapporti clinici dimostrarono che in molti luoghi del mondo i ruminanti avevano sviluppato una carenza di rame dopo aver ingerito un alto livello di molibdeno di origine vegetale, nonostante ci fosse un'adeguata quantità di rame presente nel pascolo. Gli animali mostrarono molteplici sintomi come anemia, perdita di appetito, crescita lenta, diminuzione della resa del latte e disturbi riproduttivi. Questi problemi di salute furono risolti con la semplice aggiunta di sale di rame nella dieta. In verità, questa carenza clinica di rame era dovuta all'antagonismo tra il rame cellulare e i sali minerali di molibdeno (Mo) e di zolfo (S). L'interazione tra Mo e S porta alla formazione dei tiomolibdati. Bisogna notare che la stabilità, la chimica redox e l'affinità di legame con i metalli sono fortemente influenzate da agenti esterni, come pH, controcatoni, riducenti e ossidanti; perciò è necessario intraprendere uno studio chimico del TTM<sup>[10]</sup>.

#### 4.2 Sintesi dell'ATTM

Oggi l'ATTM viene facilmente sintetizzato facendo passare il gas H<sub>2</sub>S in soluzioni acquose ammoniacali di molibdato (MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) (figura 3). L'ossigeno sostituito dallo zolfo viene liberato sotto forma di acqua. Questo processo è seguito dal cambio di sequenza dei colori ad ogni passaggio, da MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (incolore) a MoS<sub>4</sub><sup>2-</sup> (rosso brillante) passando per MoO<sub>3</sub>S<sup>2-</sup> (giallo), MoO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>2-</sup> (arancione) e MoOS<sub>3</sub><sup>2-</sup> (arancione-rosso). Tutti gli intermedi, anioni ossitiomolibdato, MoO<sub>x</sub>S<sup>2-4-x</sup> (x=1-3), sono in equilibrio. L'equilibrio viene spostato verso il composto finale, MoS<sub>4</sub><sup>2-</sup>, a seconda della concentrazione di ioni S<sup>2-</sup> nella soluzione di reazione<sup>[10]</sup>.

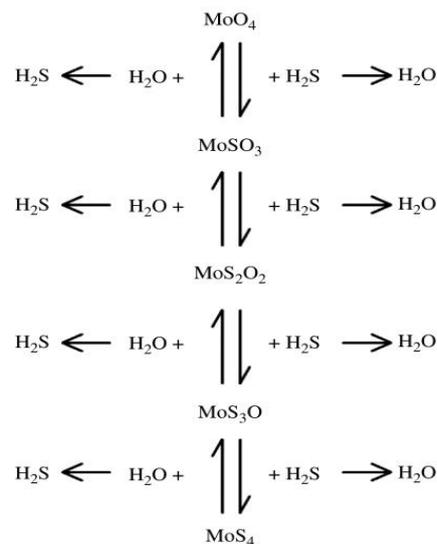


Figura 3: reazioni coinvolte nella produzione dell'ATTM a partire dal molibdato<sup>[11]</sup>.

### 4.3 Struttura, legami e stabilità dell'anione TTM

La struttura dell'anione  $\text{MoS}_4^{2-}$  è tetraedrica. L'atomo centrale di molibdeno è presente al suo massimo stato di ossidazione (+6) e coordina quattro ioni solfuro ( $\text{S}^{2-}$ ). I quattro legami Mo—S sono uguali con una distanza media di legame pari a 2,19 Å. Questa lunghezza di legame è intermedia tra la lunghezza del legame singolo e quella del doppio legame, suggerendo che il sistema è altamente delocalizzato. La lunghezza del legame Mo-S nell'anione  $\text{MoS}_4^{2-}$  è influenzata dalle interazioni del legame a idrogeno ( $\text{H}\cdots\text{S}$ ) tra lo zolfo presente nell'anione  $\text{MoS}_4^{2-}$  e l'idrogeno nei controcationi. È stata valutata l'importanza delle interazioni H—S nell'allungamento delle distanze dei legami Mo-S in una serie di complessi di  $\text{MoS}_4^{2-}$  arrivando alla conclusione che la distanza del legame Mo-S può essere regolata con precisione dalla forza e dal numero di legami a idrogeno. TTM mostra una stabilità maggiore in soluzione basica. A pH neutro in soluzione acquosa, idrolizza lentamente (reazione inversa) per produrre ossiderivati  $[\text{MoO}_x\text{S}_{4-x}]^{2-}$  ( $x=1-3$ ). È stato notato che la velocità di formazione di TTM dipende dalla concentrazione di protoni ( $[\text{H}^+]$ ) mentre la velocità di idrolisi (reazione inversa) aumenta con la diminuzione del pH ma risulta indipendente da  $[\text{H}^+]$  a  $\text{pH} > 8$ . Sulla base di queste osservazioni, il meccanismo proposto per la formazione di TTM dal molibdato prevede che l'ossigeno del molibdato venga prima protonato da  $\text{H}_2\text{S}$  e successivamente il nucleofilo  $\text{HS}^-$ , appena formato attacchi l'atomo centrale di molibdeno, liberando acqua. Nella reazione inversa, la molecola di  $\text{H}_2\text{O}$  in arrivo attacca il molibdeno e trasferisce protoni all' $\text{S}^{2-}$ , liberando  $\text{H}_2\text{S}$ . Si ritiene che le reazioni di formazione e idrolisi del TTM coinvolgano un percorso associativo piuttosto che un percorso dissociativo in cui il complesso attivato è associato al legame idrogeno e al trasferimento di protoni<sup>[10]</sup>.

Tre caratteristiche di TTM sono importanti:

- la lunghezza del legame Mo-S intermedia tra doppio e singolo legame;
- lo stato di ossidazione più alto del Mo (VI);
- l'energia vicina tra l'orbitale 3p di S e l'orbitale 4d di Mo che rappresentano congiuntamente l'insolita chimica redox osservata.

Queste caratteristiche sorprendenti consentono il flusso elettronico interno non spontaneo da  $\text{S}^{2-}$  a  $\text{Mo}^{\text{VI}}$ , manifestato principalmente dal carattere p del legame Mo-S. Le influenze esterne possono interrompere il carattere p dei legami Mo-S, portando alla chimica redox interna<sup>[12]</sup>.

### 4.4 Legame chelante del TTM

La proprietà più importante di TTM è che costituisce un legante bidentato verso un'ampia gamma di ioni metallici di transizione, per produrre complessi con una varietà di architetture. Lo ione TTM,  $\text{MoS}_4^{2-}$ , contiene molibdeno nel suo massimo stato di ossidazione. Tuttavia il molibdeno può essere ridotto per dare il complesso dimerico  $\text{Mo}_2\text{S}_8^{2-}$  attraverso una reazione che comporta il trasferimento interno di elettroni dal solfuro al molibdeno. Questo flusso interno di elettroni da  $\text{S}^{2-}$  a  $\text{Mo}^{\text{VI}}$  è dovuto principalmente al carattere p del legame Mo-S. Pertanto, influenze esterne possono

interrompere il carattere p nei legami Mo-S portando alla chimica redox interna. Durante questa reazione redox, l'S<sup>2-</sup> dapprima dona elettroni all'ossidante esterno e di conseguenza si ossida a specie radicaliche reattive (S<sup>•-</sup>). Questo disturba il carattere p nei legami Mo-S e facilita il trasferimento interno di un elettrone dall'altro S<sup>2-</sup> a Mo<sup>VI</sup> per produrre Mo<sup>V</sup> ridotto e ioni persolfuro ossidati (S<sub>2</sub><sup>2-</sup>) (figura 4)<sup>[10]</sup>.

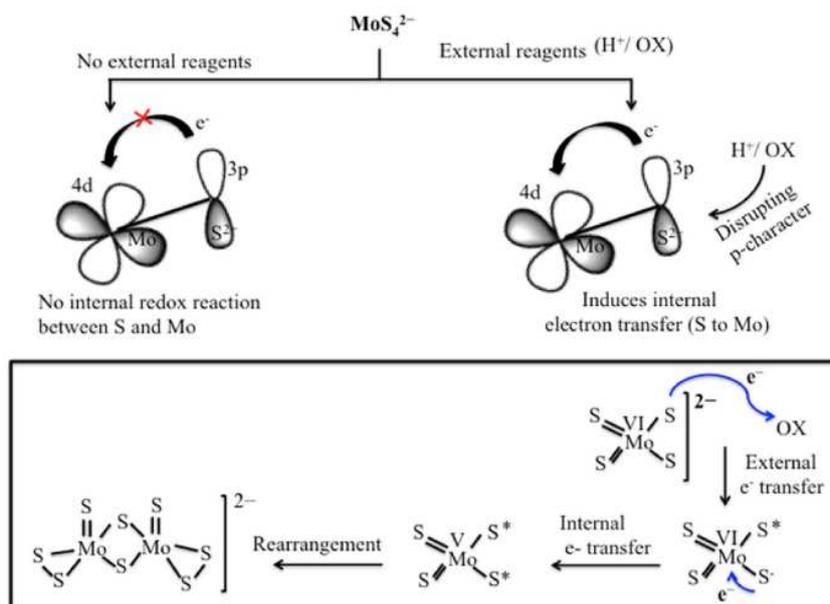


Figura 4: meccanismo proposto per la reazione redox interna di TTM indotta da ossidante/acido<sup>[10]</sup>.

Tuttavia, quando il TTM reagisce con i sali di Cu(II) in soluzioni acquose, inizia una reazione redox tra TTM e Cu(II) per produrre un complesso insolubile (figura 5).

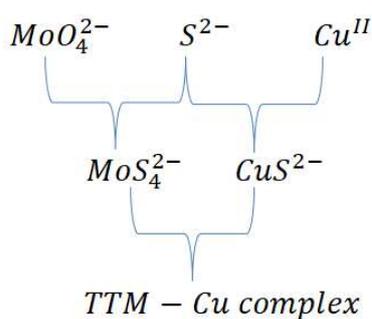


Figura 5: formazione di un complesso insolubile tra TTM e sali di rame<sup>[12]</sup>.

In realtà il TTM reagisce con il sale Cu(II) inorganico in acqua per produrre un composto polimerico insolubile: il tiomolibdato di ammonio rameoso,  $[\text{NH}_4(\text{CuMoS}_4)]_n$ , in cui le unità

CuS<sub>4</sub> e MoS<sub>4</sub> sono collegate tetraedricamente tramite bordi per produrre una struttura simile a una catena<sup>[13]</sup>, come si può visualizzare nella seguente Figura 6:

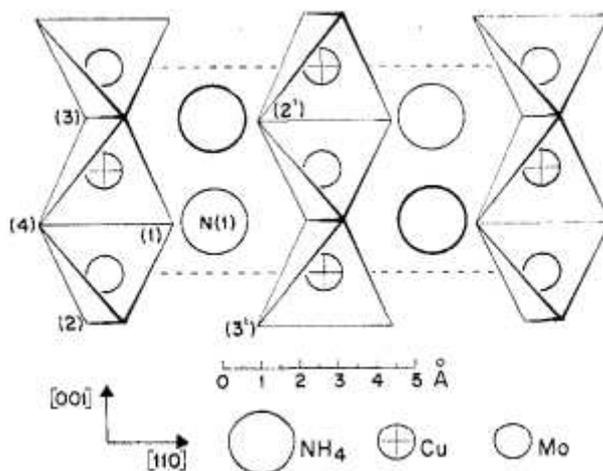
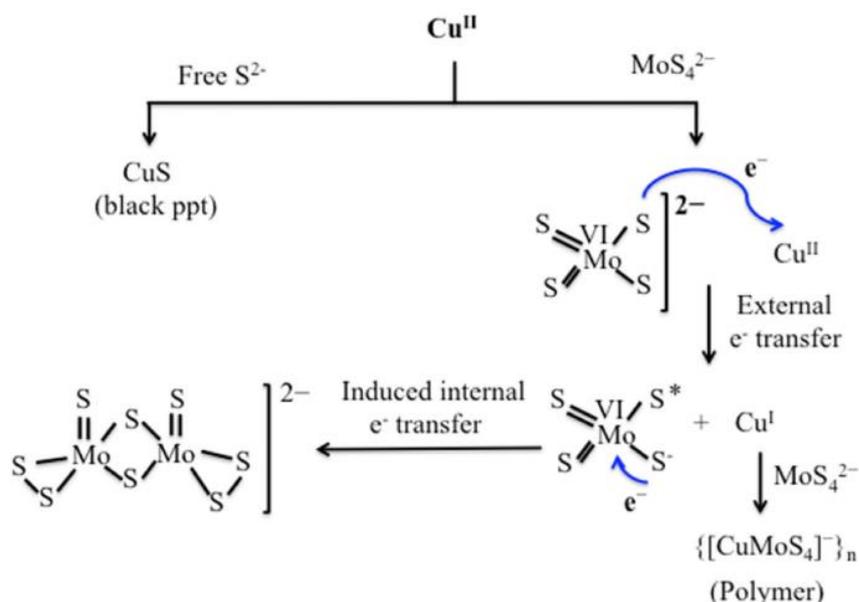


Figura 6: ogni atomo di metallo è coordinato tetraedricamente con quattro atomi di zolfo. Questi diversi tetraedri sono impilati alternativamente, e ciascuno condivide i bordi opposti con due tetraedri vicini per formare infinite catene anioniche. Le cariche elettriche su queste catene sono bilanciate da ioni ammonio distribuiti tra loro<sup>[13]</sup>.

Generalmente, S<sup>2-</sup> in TTM prima riduce il Cu<sup>II</sup> a Cu<sup>I</sup> e di conseguenza viene ossidato a S<sub>2</sub><sup>2-</sup>. Dopo un sottile cambiamento nella geometria, si verifica il trasferimento interno di elettroni da S<sup>2-</sup> a Mo<sup>VI</sup> in MoS<sub>4</sub><sup>2-</sup> per produrre il complesso dimerico Mo<sub>2</sub>S<sub>8</sub><sup>2-</sup>. Si può concludere che una riduzione elettronica di ciascun centro metallico (Cu<sup>II</sup> a Cu<sup>I</sup> e Mo<sup>VI</sup> a Mo<sup>V</sup>) è mediata dall'ossidazione di due ioni solfuro. Il TTM non reagito o in eccesso si lega immediatamente con il Cu<sup>I</sup> appena formato per produrre il complesso polimerico {[CuMoS<sub>4</sub>]}<sub>n</sub><sup>[10]</sup> (figura 7).



*Figura 7: Meccanismo proposto di riduzione di  $\text{Cu}^{\text{II}}$  a  $\text{Cu}^{\text{I}}$  mediante TTM e formazione del complesso TTM- $\text{Cu}^{\text{I}}$ <sup>[10]</sup>.*

È evidente che le due caratteristiche importanti di TTM sono:

- i. capacità chelante, in quanto lega un'ampia gamma di cationi di metalli di transizione per produrre una varietà di architetture;
- ii. possibilità di stabilizzare nei complessi i bassi stati di ossidazione degli ioni metallici, attraverso il trasferimento interno di elettroni da  $\text{S}^{2-}$  allo ione metallico. Ad esempio, TTM reagisce con un sale  $\text{Cu}^{\text{II}}$  inorganico in acqua per produrre la specie polimerica insolubile  $[\text{NH}_4(\text{CuMoS}_4)]_n$ .

Generalmente, TTM ha un'affinità di legame maggiore verso  $\text{Cu}^{\text{I}}$  rispetto a  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Per questo motivo si osserva che TTM riduce dapprima  $\text{Cu}^{\text{II}}$  a  $\text{Cu}^{\text{I}}$  e, successivamente, lega  $\text{Cu}^{\text{I}}$  per generare complessi  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -TTM.

Nel complesso, TTM svolge un duplice ruolo: uno riducente e uno connettore, con la capacità di colmare due, tre o quattro centri metallici, portando a semplici strutture lineari o molto più complesse<sup>[12]</sup>.

#### 4.5 Antagonismo Mo-Cu

TTM riduce il rame in eccesso, producendo un cluster stabile non catalitico, Mo/S/Cu, attraverso un'interazione tra rame e tiomolibdato, nota come antagonismo Mo-Cu. Durante questa interazione il rame interagisce con il tetratiomolibdato per formare un complesso Cu-Mo-S che presenta una stabilità così elevata da impedire al rame di essere disponibile per l'attività fisiologica. È stato dimostrato che a seconda del solvente, dei leganti e dei controcatoni, si formano diversi tipi di cluster (figura 8)<sup>[14]</sup>.

Il TTM reagisce con il sale  $\text{Cu}^{\text{II}}$  inorganico in acqua per produrre la specie polimerica insolubile  $[\text{NH}_4(\text{CuMoS}_4)]_n$ . Le interazioni tra  $[\text{MoS}_4]^{2-}$  e  $\text{CuX}$  ( $\text{X}=\text{Cl}$ ,  $\text{Br}$  e  $\text{I}$ ) producono cluster polinucleari anche in solventi organici. TTM utilizza tutti gli ioni solfuro e lega  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , con conseguente polimerizzazione.

Quando al  $\text{Cu}^{\text{I}}$  sono attaccati leganti forti come nitrili, fosfina o diimmine aromatiche, questi ultimi bloccano la formazione del polimero e producono complessi eterometallici di- o trinucleari. È interessante notare che quando si usa il controcatone voluminoso  $[\text{PPh}_4]^+$ , si ottiene il composto bi-eterometallico monomerico  $(\text{PPh}_4)_2[\text{NCCu}(\text{MoS}_4)]$ , mentre quando si usa  $[\text{NMe}_4]^+$ , si ottiene il composto tri-eterometallico monomerico  $(\text{NMe}_4)_2[\text{NCCu}(\text{MoS}_4)\text{CuCN}]$ . Inoltre, il cluster più piccolo  $[\text{MoS}_4\text{CuCl}]^{2-}$  viene trasformato in un cluster più grande  $[\text{Mo}_3\text{Cu}_6\text{S}_{14}]^{4-}$  tramite auto-riarrangiamento in presenza di una soluzione acquosa di idrossido di tetraetilammonio in DMF/*i*-propanolo. Infine, due

equivalenti  $\text{MoS}_4^{2-}$  si legano con  $\text{Cu}^I$  per formare l'ammasso trinucleare lineare  $[(\text{MoS}_4)\text{Cu}(\text{MoS}_4)]^{3-}$ <sup>[10]</sup>:

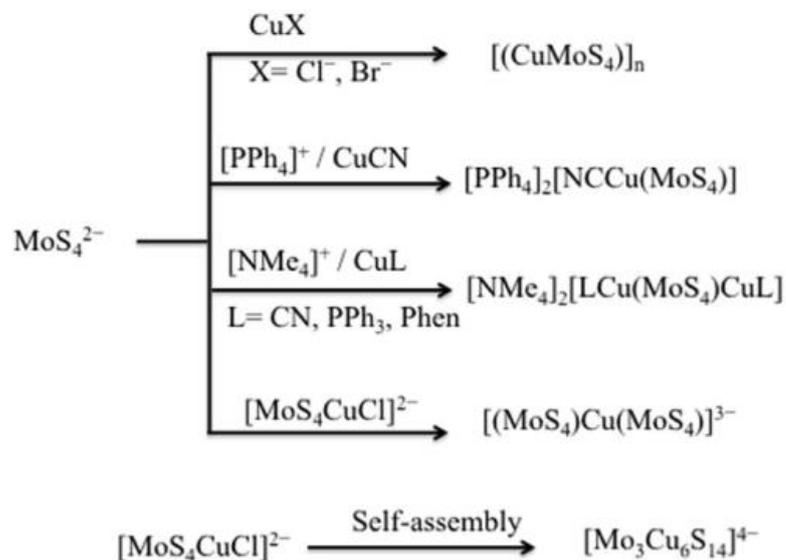


Figura 8: Formazione dei diversi cluster Mo/Cu/S per interazione tra TTM e  $\text{Cu}$ <sup>[10]</sup>.

#### 4.6 Farmaco

Il TTM ha effetti benefici sui malati di cancro agendo nel tratto gastrointestinale e nel sangue. Quando viene somministrato con il cibo (tratto gastrointestinale), si lega al rame contenuto negli alimenti, nella saliva e nel succo gastrico, per formare un complesso tripartito stabile, attraverso interazioni specifiche e non specifiche (interazioni covalenti e non covalenti). I quattro atomi di zolfo di TTM consentono interazioni non covalenti con residui di amminoacidi nelle proteine (interazione  $\text{Mo-S}\cdots\text{H}$ /elettrostatica, interazione ione-ione negativa e positiva) e interazioni covalenti con  $\text{Cu}$  (TTM-Cu) nelle proteine formando il complesso tripartito, proteina-Cu-TTM, che non viene assorbito ma escreto nella bile.

Nel sangue invece, TTM forma un complesso tripartito stabile con l'albumina sierica e il rame libero nel sangue. Tale complesso viene lentamente metabolizzato dal fegato e infine viene escreto nella bile. I meccanismi d'azione sono praticamente identici ed entrambi portano ad una conseguente diminuzione del livello di rame<sup>[10]</sup>.

#### IONOFORI DEL CU NELLA TERAPIA DEL CANCRO

Gli ionofori di  $\text{Cu}$  sono ampiamente studiati per le loro attività antitumorali. Essi promuovono il trasporto di ioni metallici attraverso il doppio strato lipidico, portando all'accumulo di questi ultimi nella cellula. Per quanto riguarda il rame, l'assorbimento di

$\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$  da parte delle cellule è strettamente modulato dalla proteina di membrana CTR1, che funge da trasportatore. In quanto famiglia di ionofori di rame, i ditiocarbammati (DTC) sono composti a base di zolfo e di solito formano complessi lipofili neutri con  $\text{Cu}^{2+}$ , che facilitano l'aumento dell'assorbimento di Cu nelle cellule tumorali e inducono l'apoptosi cellulare, generando ROS. Tra questi, il disulfiram (DSF, figura 9) è il composto più ampiamente studiato<sup>[9]</sup>.



Figura 9: Struttura molecolare del disulfiram (DSF).

## 5.1 Disulfiram o DSF

Il DSF, o tetraetiltiuram disolfuro, è stato sviluppato alla fine del XIX secolo per la produzione industriale di gomma. Nel 1947 fu scoperto il suo potenziale come vermicida quando chelante di ferro, rame e zinco. Causava tossicità nei parassiti danneggiando gli enzimi respiratori contenenti rame. Successivamente, DSF fu usato come farmaco anti-alcolismo.

## 5.2 Chimica e farmacocinetica del disulfiram

Il disulfiram è una polvere cristallina biancastra che è insolubile in acqua ma ha solubilità variabile in solventi organici come etanolo ed etere. DSF è una molecola relativamente piccola con un peso molecolare di 296,54 g/mol, una densità di 1,30 g/cm<sup>3</sup> e un punto di fusione di 70°C–72°C<sup>[15]</sup>.

Sia il DSF che il suo metabolita, il dietilditiocarbammato (DDC), sono stabili in ambienti basici, ma instabili in condizioni acide. Il DSF, dopo essere stato assorbito in circolo, viene immediatamente scomposto in monomeri DDC dal sistema della glutazione reduttasi nei globuli rossi. Il DDC libero si lega rapidamente ai tioli delle proteine, in particolare alle albumine, per formare disolfuri<sup>[15]</sup>. Sia DSF che DDC sono forti chelanti di ioni metallici bivalenti di transizione formando complessi stabili, come mostrato in figura 10.



Figura 10: struttura del Disulfiram (DSF), del suo metabolita dietilditiocarbammato (DDC) e del suo complesso con il rame  $\text{Cu}(\text{DDC})_2$  o (CuET). I gruppi tiolo intatti in DS o DDC sono indispensabili per la chelazione di DS o DDC con il rame, una reazione che provoca la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) <sup>[15]</sup>.

Il complesso metallico, bis(dietilditiocarbammato)-rame ( $\text{Cu}(\text{DDC})_2$ ), è un precipitato scuro che è più stabile in ambienti acidi. Il gruppo sulfidrilico intatto in DSF e DDC è essenziale e indispensabile per la chelazione degli ioni dei metalli di transizione bivalenti <sup>[15]</sup>.

### 5.3 Meccanismi antitumorali del disulfiram

Il meccanismo antitumorale della DSF sembra essere Cu-dipendente. Poiché le cellule tumorali contengono elevate quantità di rame, attraverso il trasporto transmembrana mediato da CTR1 DSF può formare un complesso con il rame che penetra nelle cellule tumorali. Ciò consente al DSF di mirare specificamente a queste cellule e non alle normali cellule sane che esprimono bassi livelli di rame. La reazione tra DSF, DDC e Cu provoca la generazione di ROS extracellulari, che a loro volta inducono l'apoptosi nelle cellule tumorali. Quello che è stato scoperto è che la citotossicità di DSF/Cu non è dovuta esclusivamente alla reazione di questi due reagenti, perché anche il prodotto finale può svolgere un ruolo importante nella morte cellulare. In particolare, il complesso di rame  $\text{Cu}(\text{DDC})_2$  si accumula nelle cellule tumorali e induce la generazione di ROS che porta all'apoptosi. La generazione di ROS sia extracellulari che intracellulari si basa completamente sul gruppo sulfidrilico che chela il rame (figura 11) <sup>[15]</sup>.

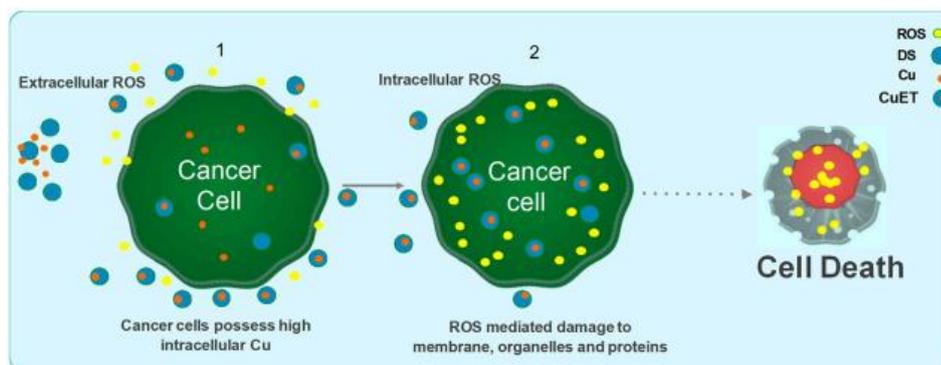


Figura 11: Meccanismo dell'attività antitumorale indotta da DSF/Cu. La reazione tra DSF e Cu genera ROS extracellulari e danneggia le proteine di membrana. La formazione del complesso CuET all'esterno della cellula e il trasporto di CuET attraverso il doppio strato lipidico, oltre all'aumento dell'afflusso di Cu attraverso il trasportatore CTR1, innesca ulteriormente il danno mitocondriale mediato da ROS intracellulare e il danno al DNA. Il tutto influisce negativamente sulla sopravvivenza delle cellule tumorali <sup>[15]</sup>.

#### 5.4 La reazione chimica tra DSF e Cu<sup>2+</sup>

L'attività antitumorale del DSF è stata dimostrata fortemente dipendente dalla formazione del complesso Cu(DDC)<sub>2</sub>. In condizioni in vitro, una miscela di DSF e Cu si traduce immediatamente in una forma intermedia altamente ossidata di DDC denominata bis(dialkyliminium)-tetrathiolane dication (Bitt-4<sup>2+</sup>). Successivamente, in ambiente acquoso, una piccola quantità di DSF decompone spontaneamente liberando un gran numero di elettroni che riducono prontamente il rimanente DSF in DDC, con conseguente chelazione di Cu<sup>2+</sup> per generare CuET con una resa teorica del 93% (figura 12)<sup>[16]</sup>:

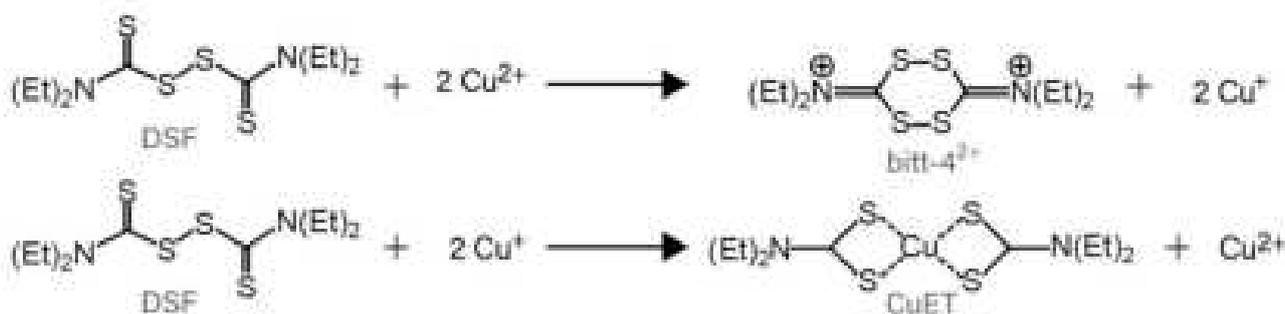


Figura 12: reazione intermedia nel processo di coordinazione di DSF e Cu<sup>[16]</sup>.

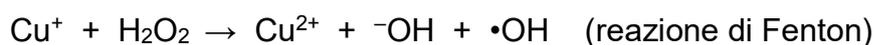
L'intermedio Cu<sup>+</sup> può generare ROS attraverso la reazione di Fenton. La tossicità mediata da DSF/Cu si basa su un duplice effetto, vale a dire il danno ossidativo causato da Cu<sup>+</sup> generato dalla reazione del complesso DSF/Cu nella fase iniziale e la tossicità di lunga durata mediata da CuET e ad alto rendimento nella fase successiva.

#### 5.5 Cu media il danno da stress ossidativo

Con un potenziale redox di appena 0,158 V tra Cu<sup>2+</sup> e Cu<sup>+</sup> in acqua, il Cu può eseguire reazioni cicliche redox e promuovere la formazione di ROS; il danno ossidativo indotto è considerato la causa principale della tossicità del rame. In presenza di radicale superossido o di specie biologiche riducenti (come l'acido ascorbico o il GSH), il Cu<sup>2+</sup> può essere ridotto a Cu<sup>+</sup><sup>[17]</sup>, come riportato dalle seguenti reazioni:



Appena formato Cu<sup>+</sup> funge da catalizzatore per la decomposizione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta dalle cellule durante i processi metabolici, per formare ·OH tramite reazione di Fenton:



Il più potente radicale libero ossidante,  $\cdot\text{OH}$ , estrae idrogeno da importanti macromolecole biologiche per formare radicali liberi proteici e radicali liberi lipidici, causando rotture del filamento di DNA e ossidazione delle basi. Il travolgente danno ossidativo causato dall'accumulo di Cu può superare la capacità di buffering dei ROS delle cellule tumorali, portando all'apoptosi<sup>[16]</sup>.

### 5.6 Attività antitumorale di CuEt

CuEt può colpire il sito legante lo zinco (II) della proteina N,PL4 per uccidere le cellule cancerose attraverso danni ossidativi. Inoltre svolge un'altra importante attività antitumorale:  $\text{H}_2\text{S}$ , un gasotrasmettitore dei mammiferi, supporta la proliferazione e la bioenergetica delle cellule tumorali e viene prodotto da particolari enzimi come la cistationina  $\beta$ -sintasi (CBS) e la cistationina  $\gamma$ -liasi (CSE); CuET non solo rallenta la biosintesi di  $\text{H}_2\text{S}$ , ma reagisce direttamente con esso, riducendone di conseguenza il livello e attenuando la proliferazione delle cellule tumorali. Inoltre, è stato recentemente riportato che CuET previene la progressione del cancro del colon riducendo la glicolisi aerobica, che è un meccanismo metabolico specifico del tumore<sup>[16]</sup>.

### 5.7 Strategie per aumentare la selettività degli ionofori Cu

Sono state sviluppate diverse strategie per migliorare la selettività degli ionofori del Cu, con il grande vantaggio di ottenere molecole di farmaco mirate verso bersagli precisi, al fine di ridurre la tossicità verso le cellule sane. Una valida soluzione consiste nel sintetizzare un proionoforo, una molecola che deve essere attivata per rilasciare lo ionoforo metallico. È importante, quindi, individuare una delle caratteristiche nelle cellule tumorali, che può essere sfruttata per progettare proionofori. Le cellule tumorali sono caratterizzate da un'alterata produzione di ROS, rispetto alle cellule normali: l'alta espressione di ROS è causata dal metabolismo alterato e dalla segnalazione oncogenica per mantenere il loro fenotipo maligno. Pertanto, una strategia sofisticata consiste nell'attivare un proionoforo coinvolgendo  $\text{H}_2\text{O}_2$ : questo approccio si basa sull'evidenza che i livelli di  $\text{H}_2\text{O}_2$  sono più alti nelle cellule tumorali che nelle cellule normali, rendendo l' $\text{H}_2\text{O}_2$  un buon bersaglio per sviluppare proionofori antitumorali. Per convalidare questo approccio, è stato utilizzato, un composto antitumorale naturale, la naftazarina (5,8-diidrossi-1,4-naftochinone), di cui i due gruppi ossidrilici sono stati protetti con il gruppo boronato per ottenere PNap, come mostrato in figura 13. Tuttavia, l'efficacia terapeutica è limitata dall'elevata espressione di sostanze riducenti (ad es. GSH) nelle cellule tumorali. Per aumentare le prestazioni, si è proposto di diminuire contemporaneamente i livelli intracellulari di GSH. L'ossidazione carbonio-boro è una strategia in forte sviluppo per

ottenere il rilascio di profarmaci mirati al cancro. PNap, somministrato con Cu, è stato in grado di uccidere selettivamente le cellule tumorali<sup>[9]</sup>.

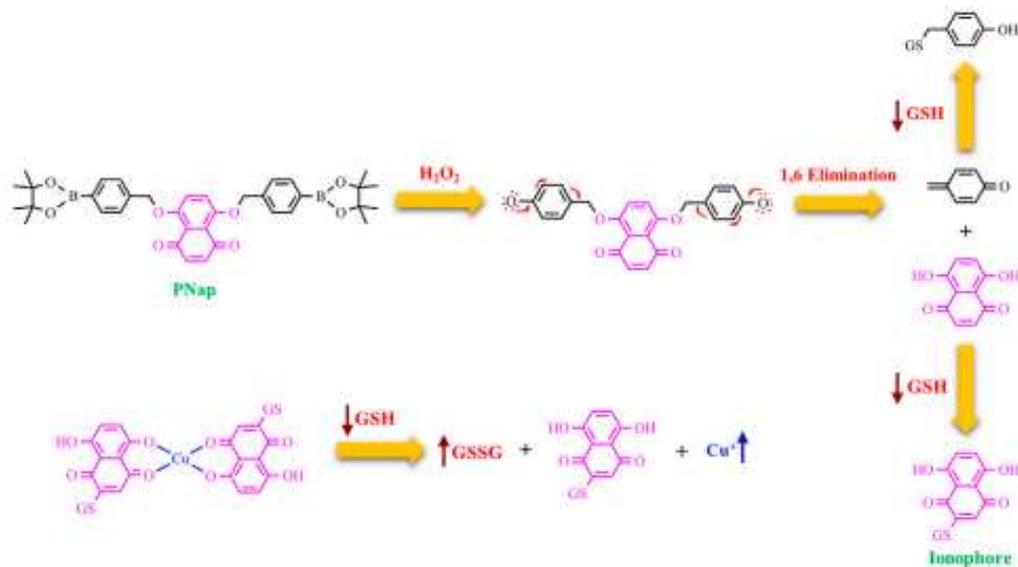


Figura 13: Struttura chimica di PNap e meccanismo proposto per il rilascio di Nap per azione di  $H_2O_2$  e eliminazione spontanea di 1,6 benzile. Nap viene alchilato dal GSH e agisce come uno ionoforo di Cu. Le frecce evidenziano i processi che avvengono a livello intracellulare (deplezione di GSH e accumulo di Cu)<sup>[9]</sup>.

L'attivazione sito-specifica dei profarmaci può essere ottenuta anche mediante terapie con profarmaci enzimatici (EPT). In questi approcci, i profarmaci sono tipicamente progettati per ottenere un rilascio quantitativo del farmaco in seguito all'azione di un enzima specifico. In particolare, una delle strategie EPT consiste nello sfruttare enzimi che:

- 1) si trovano solo nelle cellule tumorali;
- 2) sono sovraespressi nelle cellule tumorali;
- 3) cambiano la loro localizzazione cellulare durante la trasformazione cellulare maligna;
- 4) modificano la loro funzione nelle cellule maligne<sup>[9]</sup>.

## CONCLUSIONE

La ricerca di nuovi metalli, farmaci o complessi metallici che colpiscano i tumori è ancora un campo di grande interesse nel settore farmaceutico. Il ruolo fondamentale del Cu nell'aiutare la progressione del cancro e la sua omeostasi anormale, lo rendono un bersaglio emergente. Si sono avuti importanti progressi nello sviluppo di complessi di coordinazione a base di Cu per le terapie antitumorali. Questo elaborato si è concentrato su due composti di rame appartenenti a due famiglie che prevedono meccanismi di azione differenti: come chelante del rame è stato studiato il tetratiomolibdato di ammonio (ATTM), uno dei farmaci anti-rame con meno tossicità (ricordiamo che ATTM è un chelante altamente specifico di Cu e le sue attività antitumorali sono principalmente incentrate sull'inibizione dell'angiogenesi nei tumori prendendo di mira più percorsi). Infine, come ionoforo del rame è stato studiato il DSF, che ha dimostrato di essere citotossico per le cellule tumorali e di avere la capacità di sradicare le popolazioni di cellule staminali tumorali (CSC) in vari tumori con poca o nessuna tossicità per le cellule normali.

La ricerca sta avanzando con piccoli passi nel campo nemico del cancro. Questo perché ogni singolo cancro è intrinsecamente eterogeneo. Non è facile individuare quali geni sono mutati nel cancro e quali sono le mutazioni responsabili; è chiaro, quindi, che se in generale un problema va risolto all'origine, nel caso dei tumori diventa impossibile individuare l'origine.

Sicuramente sono stati fatti grandi passi in avanti, ma è anche vero che ancora c'è tanto da capire sul cancro e ci si accorge di questa realtà soprattutto quando ci si trova di fronte ai casi di metastasi, in cui salvare il paziente diventa impossibile. Rimane il fatto che, al di là della sua natura biologica, ogni tumore è una storia personale fatta di paura, ansia, fragilità e silenziosa preoccupazione. La risposta a questa sofferenza che, in un modo o nell'altro riguarda tutti da vicino, è la conoscenza. La ricerca deve ancora avanzare, continuando ad approfondire i meccanismi molecolari e le strategie che rendono il cancro un nemico difficile da sconfiggere. Solo quando tutti i singoli pezzi che compongono il puzzle dell'atlante globale del cancro saranno perfettamente incastrati, solo allora si potrà finalmente mettere la parola fine a questa lunga battaglia.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] <https://ilbolive.unipd.it/it/news/brevettata-molecola-rame-contro-tumori>
- [2] Di Fiore, P. P. *Il prezzo dell'immortalità*; il Saggiatore S.r.l, Milano **2020**, 18-166, 375-377
- [3] Arnesano, F.; Nardella, M.; Natile G. *Platinum drugs, copper transporters and copper chelators*, **2018**, 255
- [4] Siffeen, Z.; Sartaj T.; Farukh A. *Biochemical pathways of copper complexes: progress over the past 5 years*, **2021**, 1086
- [5] Almeida da Silva, D.; De Luca A; Squitti, R.; Rongioletti, M.; Rossi, L.; Machado, C.; Cerchiaro, G. *Copper in tumors and the use of copper-based compounds in cancer treatment*, **2021**, 2-6
- [6] <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/ricerca-di-base/angiogenesi>
- [7] Lelièvre, P.; Sancey, L.; Coll, J.L.; Deniaud, A.; Busser, B. *The Multifaceted Roles of Copper in Cancer: A Trace Metal Element with Dysregulated Metabolism, but Also a Target or a Bullet for Therapy*, **2020**, 9
- [8] Li, Y. *Copper homeostasis: Emerging target for cancer treatment*, **2020**, 1900-1905
- [9] Oliveri, V. *Selective Targeting of Cancer Cells by Copper Ionophores: An overview*, **2022**, 3, 6-7
- [10] Maiti, B. K. *A review on chemical and physical properties of tetrathiomolybdate (TTM) anion drug is useful for TTM treated diseases*, **2021**, 2-6
- [11] Gould, L.; Kendall, R.L. *Role of the rumen in copper and thiomolybdate absorption*, **2011**, 7
- [12] Maiti, B. K.; Moura, J. J. G. *Diverse biological roles of the tetrathiomolybdate anion*, **2020**, 3
- [13] Binnie, W. P.; Redman, M. J.; Mallio, W. J.; *On the Preparation, Properties, and Structure of Cuprous Ammonium Thiomolybdate*, **1969**, 1451
- [14] JAY, K.; RAMJEE, S.; ASHOK, K. Y. *A Microwave Assisted Synthesis of Heterometallic Metal Sulphur Assembly Mimicking the Model of Cu-Mo Antagonism*, **2020**, 1112
- [15] Kannappan, V.; Ali, M.; Small, B.; Rajendran, G.; Elzhenni, S.; Taj, H.; Wang, W.; Dou, P. *Recent Advances in Repurposing Disulfiram and Disulfiram Derivative as Copper-Dependent Anticancer Agents*, **2021**, 5-6
- [16] Lu, Y.; Pan, Q.; Gao, W.; Pu, Y.; Luo, K.; He, B.; Gu, Z. *Leveraging disulfiram to treat cancer: Mechanisms of action, delivery strategies, and treatment regimens*, **2022**, 2-5

[17] Olivieri, V. *Biomedical applications of copper ionophores*, **2020**, 2