



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**CORSO DI LAUREA IN CHIMICA**

**COMPLESSI DI ORO(I) E ORO(III): UNA POTENZIALE  
APPLICAZIONE NELLA LOTTA CONTRO IL TUMORE  
AL SENO**

**Relatore: Prof. Andrea Biffis**

**Laureanda: Benedetta Gabbin**  
n.matricola 2000324

Anno Accademico 2022/2023



*Nobody queues for a flat rollercoaster*



# INDICE

<b>ABBREVIAZIONI</b>	7
<b>1-INTRODUZIONE-COMPLESSI METALLICI IN MEDICINA</b>	11
<b>2-OBIETTIVO DELLA TESI</b>	15
<b>3-L'ORO: IL PIU' NOBILE TRA I METALLI, Caratteristiche e proprietà</b>	16
<b>4-MECCANISMI DI AZIONE BIOLOGICA</b>	19
4.1 DESIGN RAZIONALE DI METALLOFARMACI	19
4.2 L'AZIONE BIOLOGICA DEI COMPLESSI DI ORO	20
4.3 DNA: UNO DEI PRINCIPALI TARGET	20
4.4 INIBIZIONE DI TRXR	21
4.5 INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' MITOCONDRIALE	24
4.6 MODIFICA DI STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE	26
4.7 IL GLUCOSIO E IL SUO METABOLISMO	27
4.8 INIBIZIONE DI TOPOISOMERASI	28
4.9 LUMINESCENZA FINALIZZATA ALL'INDAGINE BIOLOGICA	28
<b>5-CANCRO AL SENO E CURE ANTITUMORALI A BASE DI ORO</b>	30
5.1 CANCRO AL SENO: GENERALITA'	30
5.2 AuPhos-19	31
5.2.1 AuPhos-19 interrompe il metabolismo nelle cellule TNBC e attivazione di AMPK	31
5.2.2 AuPhos-19 induce disfunzione dei mitocondri, interrompendo i processi mitocondriali	32
5.3 TRASTUZUMAB	33
5.3.1 ACDs	33
5.3.2 Trastuzumab: caratteristiche e meccanismo d'azione	33
5.3.3 Come viene utilizzato?	36
5.4 ATTIVITA' ANTITUMORALE MULTI-MIRATA DI COMPOSTI AZO-LO/FOSFINA ORO (I) NELLE CELLULE DEL CANCRO AL SENO	36
5.4.1 Caratteristiche, proprietà e sintesi	36
5.4.2 Sintesi complessi 1-4	37
5.4.3 I complessi e la loro attività	38
5.4.4 Meccanismi d'azione	38
<b>6-CONCLUSIONI</b>	40
<b>BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA</b>	43
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	47



## ABBREVIAZIONI

<b>A17</b>	Linea cellulare di adenocarcinoma al seno
<b>ACC</b>	Acetil-CoA Carbossilasi
<b>ADC</b>	Anticorpo monoclonale farmaco-coniugato
<b>ADCC</b>	Citotossicità anticorpo dipendente cellulo-mediata
<b>AGC</b>	Coniugati a base di oro anticorpale
<b>AIE</b>	Aggregation-Induced Emission
<b>AIF</b>	Fattore che induce apoptosi
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>AMPK</b>	Sistema di proteine chinasi AMP dipendenti
<b>APAF-1</b>	Proteina citoplasmatica legata ad apoptosi
<b>ATF</b>	Apo transferrina
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfato
<b>BODIPY</b>	Boro-dipirrometene
<b>BLA</b>	Biologics Licence Application
<b>BSA</b>	Albumina sierica bovina
<b>BT-474</b>	Linea cellulare di adenocarcinoma al seno
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DHFR</b>	Diidrofolato reduttasi
<b>DMF</b>	Dimetilformammide
<b>DMSO</b>	Dimetilsolfossido
<b>DNA</b>	Acido Desossiribonucleico
<b>EPR</b>	Enhanced Permeability and Retention
<b>ER</b>	Estrogeno
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GSR</b>	Glutadione reduttasi
<b>G2/M</b>	Punto di controllo del danno del DNA nel ciclo cellulare
<b>HCC1837</b>	Cellule di cancro al seno
<b>HER2</b>	Epidermal Growth Factor Receptor 2
<b>HR</b>	Hormone Receptor
<b>mAb</b>	Anticorpo monoclonale
<b>MAPK</b>	Protein chinasi mitogeno attivate
<b>MCF-7</b>	Linea cellulare cancro al seno
<b>MDA-MB-231</b>	Linea cellulare di adenocarcinoma al seno
<b>MDA-MB-468</b>	Linea cellulare di adenocarcinoma al seno
<b>MMP</b>	Potenziale della membrana mitocondriale
<b>MOA</b>	Meccanismo di azione
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondriale
<b>mtROS</b>	Stress ossidativo mitocondriale
<b>mTOR</b>	Rapamicina (proteina chinasi)
<b>MTT</b>	Bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>NHC</b>	Carbene N-eterociclico
<b>NME</b>	New Molecular Entities
<b>OCR</b>	Oxygen Consumption Rate
<b>OXPHOS</b>	Fosforilazione ossidativa
<b>PARP</b>	Poli ADP-ribosio polimerasi

<b>PBS</b>	Tampone fosfato salino
<b>PDTA</b>	Percorso Diagnostico Terapeutico Assistenziale
<b>PR</b>	progesterone
<b>PTP</b>	Permeability Transition Pore
<b>P53</b>	Proteina tumorale, fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare
<b>P73</b>	Proteina tumorale, fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare
<b>P27</b>	Proteina che regola il ciclo cellulare
<b>ROS</b>	Specie reattive dell'ossigeno
<b>SKBR3</b>	Linea cellulare di adenocarcinoma al seno
<b>TCEP</b>	Tris-(2-carbossietil)fosfina
<b>THF</b>	Tetraidrofurano
<b>TNBC</b>	Triple-Negative Breast Cancer
<b>TPE</b>	Tetrafeniletene
<b>TRX</b>	Tioredoxina
<b>TRXR</b>	Tioredoxina reduttasi
<b>NADPH</b>	Nicotinammide adenine dinucleotide fosfato
<b>4T1</b>	Linea cellulare di adenocarcinoma al seno







# 1. INTRODUZIONE - COMPLESSI METALLICI IN MEDICINA

L'importanza dei complessi metallici è stata ed è, tutt'oggi, altamente riconosciuta in campo medico. Nonostante la tavola periodica conti più di 60 elementi, stabili all'aria e all'acqua, potenzialmente utili in ambito farmaceutico, solo una decina di essi vengono utilizzati all'interno di farmaci. La *medicinal inorganic chemistry* annovera attualmente un gran numero di composti metallici usati come agenti curativi e diagnostici.

Sin dal 2500 a.C. in Cina, veniva utilizzato l'oro come agente terapeutico, per il trattamento di vaiolo e ulcere della pelle, sottoforma del cosiddetto "oro potabile", ossia complessi di oro, altri metalli e zolfo.<sup>1</sup> Dalla scoperta dell'oro, infatti, le persone pensarono avesse una natura immortale, confermata dalla sua resistenza alla corrosione chimica, e l'hanno associato alla longevità. Ne consegue l'uso dell'oro per la ricerca della longevità stessa. Questa ossessione e ricerca sconsiderata per l'oro da parte di persone e alchimisti ne ha notevolmente stimolato lo sviluppo e l'uso in varie medicine contribuendo all'evoluzione della scienza e della tecnologia in questo campo.

Gli anni '60 del Novecento segnarono la scoperta dei metallofarmaci. Cisplatino (cis-diamminodichloroplatino(II)) (fig.1) e Carboplatino (fig.2) [diammino(ciclobutano-1,1-dicarbossilato-O,O)platino(II)] sono due dei farmaci chemioterapici più comunemente utilizzati per il trattamento di una vasta gamma di tipi di cancro, quali cancro ai testicoli, ovarico, vescica, melanoma, tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC), cancro del polmone a piccole cellule (SCLC), linfomi e mielomi. La loro azione è mirata all'inibizione della sintesi del DNA cellulare. In particolare, Cisplatino si lega alla posizione N7 della guanina, e in misura minore all'adenina, attraverso la formazione di un legame covalente coordinativo con il doppietto elettronico libero dell'atomo di azoto. La chiusura ad anello, attraverso la formazione di un secondo legame con DNA, forma una serie di addotti che piegano il DNA, svolgendo l'elica. Questa distorsione del DNA

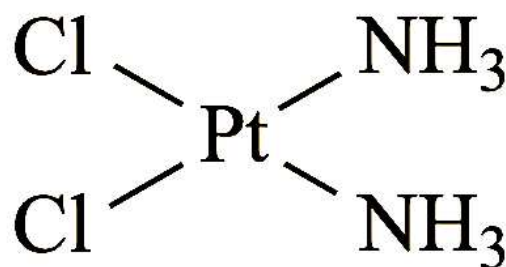


Figura 1 - molecola di Cisplatino

ne impedisce la replicazione e la trascrizione, che porta infine ad apoptosi.

Tuttavia, il farmaco non è in grado di distinguere perfettamente le cellule sane da quelle tumorali, ed inoltre tende ad accumularsi in alcuni tessuti provocando così una serie di effetti collaterali, quali nefrotossicità, ematogenesi e neurotossicità. Anche la resistenza dovuta alla terapia antitumorale è uno dei principali ostacoli al successo clinico di questi composti.

Migliaia di analoghi del platino sono stati sviluppati e specializzati per l'attività antitumorale nel tentativo di superare queste limitazioni e di ampliare la gamma di tumori curabili. Tra questi solo uno è stato approvato dalla FDA<sup>A</sup>: ossaliplatino<sup>2</sup> ([1R,2R-diamminocicloesano] [etandioato-O,O] platino(II)) (fig.3) un complesso idrosolubile impiegato nel trattamento del cancro coloretale. Gli idrogeni delle ammine sono sostituiti da leganti mono- o bi-dentati che modulano gli effetti elettronici, sterici e di basicità. Le differenze osservate nella farmacologia dell'ossaliplatino, comparate a cisplatino e carboplatino, sono state recentemente attribuite alla sua capacità di causare la morte cellulare inducendo stress da biogenesi, piuttosto che un meccanismo di risposta al danno al DNA.

Il passaggio dai farmaci di platino(II) agli analoghi al platino(IV) risulta sempre più attraente e vantaggioso; in seguito all'ossidazione da Pt(II) a Pt(IV), si nota la conversione da una geometria quadrata tetracoordinata ad una geometria ottaedrica esacoordinata, con l'aggiunta di due leganti in posizione assiale. Ciò rende i complessi più inerti cineticamente, consentendogli una somministrazione orale. Una volta all'interno delle cellule tumorali, il complesso ideale del platino (IV) verrà attivato da una riduzione a due elettroni che produce un rilascio simultaneo del farmaco citotossico Pt(II) e di due leganti assiali. Vengono, in questo modo, limitati gli eventi citotossici solo alle cellule tumorali.

I ricercatori hanno esteso i loro studi ad altri composti metallici, quali i composti dell'oro.

A FDA: "Food and Drug Administration", ente governativo statunitense che si occupa della regolamentazione dei prodotti alimentari e farmaceutici

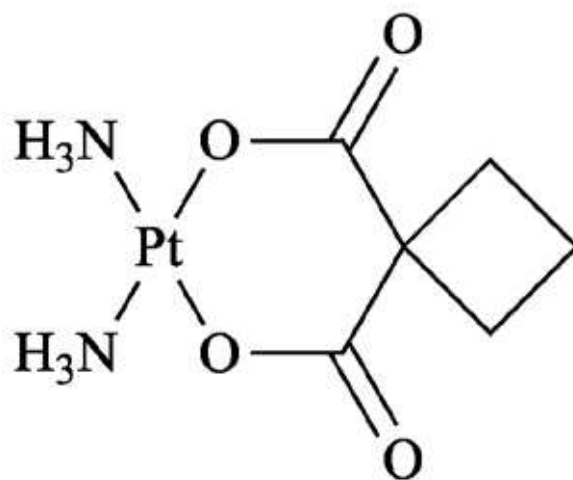


Figura 2 - molecola di Carboplatino

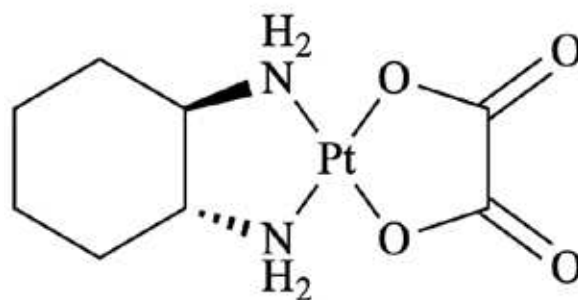


Figura 3 - molecola di Ossaliplatino

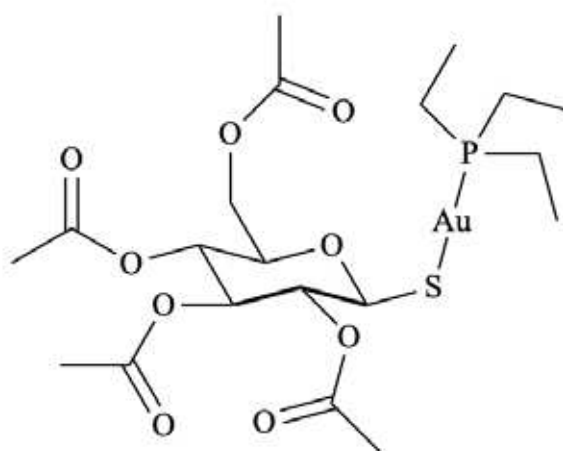


Figura 4 - molecola di Auranofin

Quest'ultimi sono stati inizialmente applicati al trattamento dell'artrite reumatoide, un'inflammatione cronica e sistemica, il cui primo sintomo è l'inflammatione delle giunture. Col tempo l'inflammatione causa la progressiva distruzione della cartilagine e il rigonfiamento delle giunture, limitando i movimenti e causando forti dolori. L'Auranofin, (2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-(thio-κS)-D-glucopiranosio)(trietil-fosfina)oro(I) (fig.4) composto di oro(I) con leganti fosfina e tiolato in una disposizione lineare, è un farmaco antiartritico somministrato per via orale, studiato anche per le sue proprietà antiproliferative. Negli ultimi anni, i progressi della tecnologia hanno permesso di utilizzare tecniche molecolari per identificare nuovi meccanismi di azione di Auranofin. L'inibizione doppia delle vie infiammatorie e degli enzimi redox del tiolo da parte di Auranofin lo rende un nuovo candidato per la terapia del cancro. L'evidenza sperimentale indica anche che i legami Au-S e Au-P potrebbero rompersi quando la molecola attraversa l'intestino durante l'assorbimento. L'Auranofin è tossico nei confronti di parassiti, cellule leucemiche e cellule cancerogene inibendo gli enzimi tioredox come la tioredossina riduttasi (TrxR) e la tioredossina glutatione riduttasi (TGR) a causa della presenza di selenio sotto forma di selenocisteina in TrxR.

È stato inoltre dimostrato che esso inibisce direttamente la neovascolarizzazione, con conseguente diminuzione dell'afflusso di sangue alle neoplasie.

Auranofin è stato indicato per indurre apoptosi in parecchie linee cellulari neoplastiche con danno ossidativo. La molecola aumenta la produzione di ROS<sup>B</sup> (i suoi livelli alti possono provocare danni e apoptosi) sia nelle linee cellulari neoplastiche che nei carcinomi umani in coltura.

È un esempio classico di “riposizionamento del farmaco” in cui un farmaco utilizzato per il trattamento di una malattia specifica, in questo caso l'artrite reumatoide, è studiato per altre terapie, in questo caso il cancro.

Si sviluppa l'esigenza di cercare nuovi composti aventi una maggiore attività, tale da ovviare al problema della resistenza, e con tossicità ridotta. In particolare, approcci avanzati rivelarono il destino dei composti metallici nei sistemi biologici dimostrando che il metallo è in gran parte associato alla frazione proteica. Ciò si verifica in genere per la maggior parte degli agenti antitumorali a base di oro, per i quali il DNA non sembra essere un bersaglio rilevante.

L'area dei complessi aurei con attività anticancro si è sviluppata rapidamente negli ultimi anni e l'evoluzione del settore è stata regolarmente riassunta. I composti dell'oro sono promettenti agenti sperimentali per il trattamento del cancro. Infatti, durante gli ultimi due decenni, diversi composti dell'oro hanno dimostrato di manifestare eccezionali proprietà antiproliferative in vitro contro linee cellulari tumorali umane selezionate, e alcuni di essi hanno ottenuto risultati notevolmente buoni anche in alcuni modelli tumorali in vivo.

La stabilità dei farmaci a base di oro in condizioni fisiologiche rimane una sfida per lo sviluppo di agenti terapeutici efficaci. La natura del legante coordinato al centro dell'oro determina notevolmente i profili farmacocinetici di entrambi i composti dell'oro(I) e dell'oro(III). Rispetto ai complessi a base di platino, i composti dell'oro negli stati di ossidazione di +I e +III possiedono una migliore selettività e potenza verso le cellule tumorali rispetto alle cellule normali a causa della loro debole attività di legame al DNA e maggiore affinità verso i gruppi solfidrilico, tiolo e selenocisteina di diversi target proteici. In breve, i benefici biologici dei composti dell'oro sono dovuti a una serie di interazioni complesse fra metallo, componenti

B ROS: specie e composti reattivi dell'ossigeno ad elevata attività ossidante e con spiccata tendenza a donare atomi di ossigeno ad altre sostanze

cellulari e geni. Tuttavia, come molti altri farmaci, i composti dell'oro inducono effetti collaterali tossici deleteri. Ricerche future, basate su studi sperimentali e in silico, ad esempio studi di docking molecolare, devono essere orientate verso l'individuazione selettiva delle cellule tumorali per migliorare l'efficacia di questi composti e ridurre al minimo le risposte biologiche indesiderate.

## **2. OBIETTIVO DELLA TESI**

Questa tesi si propone di contribuire a tale discussione attraverso l'analisi approfondita dei complessi di Au(I) e Au(III) come antitumorali, nello specifico con attività contro il tumore al seno. L'obiettivo è quello di fornire un'analisi esaustiva e di esaminare i meccanismi d'azione e i complessi innovativi che mirano a colpire i bersagli di interesse.

### 3. L'ORO: IL PIU' NOBILE TRA I METALLI

#### Caratteristiche e proprietà

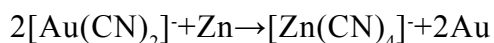
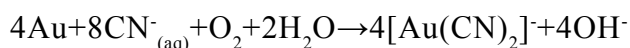
L'oro (Au) è un metallo di transizione con numero atomico 79, appartenente al gruppo 11, periodo 6, blocco d, con configurazione elettronica  $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^1$ . Di seguito (Tabella 1) sono riportate le proprietà principali dell'elemento<sup>3</sup>, che giustificano la sua chimica per lo più covalente.

Massa atomica (uma)	196.97
Raggio atomico (Å)	2.14
Raggio ionico (Å)	0.85
Elettronegatività (Pauling)	2.54
Affinità elettronica (kJ/mol)	223.00
$E_{1^{\circ}\text{ionizzazione}}$ (kJ/mol)	889.30
$E_{2^{\circ}\text{ionizzazione}}$ (kJ/mol)	1980.00
$T_{\text{fusione}}$ (°C) (specie elementare)	1064
$T_{\text{ebollizione}}$ (°C) (specie elementare)	2856

Tabella 1 - proprietà chimiche e fisiche di Au

Si tratta di un metallo di colore giallo lucente. Il pregio dell'oro consiste fondamentalmente nella sua rarità ed inalterabilità.

L'oro possiede una struttura cristallina cubica a facce centrate (fig.5) ed è il più malleabile e il più duttile di tutti i metalli. In natura si presenta sotto forma di metallo libero o silvanite ( $\text{Au}_2\text{Te}$ ). Viene estratto con metodi meccanici e di complessazione con lo ione cianuro, secondo la reazione che segue:



In termini di reattività, l'oro è il più inerte tra tutti i metalli; esso non reagisce con  $\text{O}_2$ , S, resiste ad acidi, basi e agenti atmosferici, a qualsiasi temperatura. Per questo viene definito "metallo nobile". Resta inalterato all'azione di  $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  fino a  $100^\circ\text{C}$  ed anche a  $\text{HBr}$ ,  $\text{HI}$  e  $\text{HF}$ . Solo gli alogeni, in un certo intervallo di temperatura e pressione, possono attaccarlo, secondo la seguente reazione:

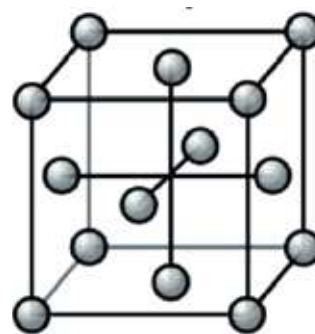


Figura 5 - Reticolo cubico a facce centrate (CFC)

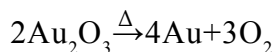
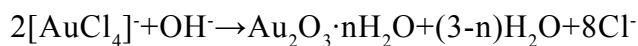




L'oro viene attaccato da acqua regia, una miscela di acido nitrico e acido cloridrico in rapporto volumetrico 1:3, come segue:



Grazie alla reazione del complesso  $[\text{AuCl}_4]^-$  con ioni ossidrilici è possibile ottenere ossidi poco stabili, i quali a  $T > 160^\circ\text{C}$  riportano il metallo allo stato elementare:

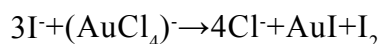


Nella sua forma elementare quindi, l'oro appare come un metallo giallo brillante con un'elevata resistenza alle condizioni difficili. Gli effetti relativistici, che portano alla stabilizzazione degli elettroni di valenza 6s e alla destabilizzazione degli elettroni 5d, danno origine a molte delle proprietà fisiche e chimiche dell'oro, compreso il suo colore distintivo.

In generale, l'oro esiste in diversi stati di ossidazione, che vanno da +I a +V, tra i quali oro(I) (sali aurosi) e oro(III) (sali aurici) sono le forme più comuni impiegate per studi biologici. A causa però del carattere nobile dell'elemento, qualsiasi composto dell'oro viene facilmente ridotto a metallo e si comporta pertanto di norma da agente ossidante.

Au(I), con configurazione elettronica a guscio chiuso  $5d^{10}$ , è uno ione grande e con piccola carica, di conseguenza facilmente polarizzabile. Si tratta di un tipico acido di Lewis soft che ha una spiccata tendenza a formare complessi stabili con leganti come  $\text{CN}^-$ , e leganti soft facilmente polarizzabili contenenti zolfo ( $\text{RS}^-$ ,  $\text{R}_2\text{S}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), fosforo ( $\text{PR}_3$ ) e selenio. Si tratta di composti lineari, trigonali o con geometrie di coordinazione tetraedriche.

Essendo Au(I) instabile, in soluzione esistono solo ioni complessi di Au, mentre allo stato solido risultano abbastanza stabili (in assenza di acqua) alcuni composti insolubili come gli alogenuri, il cianuro e il solfuro. Il monocloruro di oro, AuCl o cloruro auroso, si scioglie nelle soluzioni acquose di cloruri alcalini formando lo ione complesso dicloroaurato,  $(\text{AuCl}_2)^-$ , abbastanza stabile, come lo sono i corrispondenti sali allo stato solido (per esempio dicloroaurato di sodio  $\text{NaAuCl}_2$ ). Il monoioduro di oro, AuI o ioduro auroso, è una polvere gialla ottenibile per reazione in soluzione acquosa tra ioduro di potassio e acido cloroaurico:



Au(III) ha una configurazione  $5d^8$ . Esso solitamente predilige una geometria planare tetracoordinata planare quadrata, con preferenza per atomi donatori hard, tra cui ossigeno e azoto, a causa della sua natura hard. Anche nello stato di ossidazione +III l'oro esiste solo sotto forma di ioni complessi in soluzione acquosa oppure di composti insolubili; tra questi il triossido di dioro,  $\text{Au}_2\text{O}_3$ , citato in precedenza, solubile negli acidi cloridrico e nitrico. Il triidrossido di oro  $\text{Au}(\text{OH})_3$  ha carattere anfotero, per cui viene disciolto dagli idrossidi alcalini con formazione dello ione diossoaurato ( $\text{AuO}_2^-$ ), o tetraidrossoaurato ( $\text{Au}(\text{OH})_4^-$ ), e dagli acidi alogenidrici con formazione di ioni tetraalogenoaurato. Au(III) è stabile anche sottoforma di triclورو di oro,  $\text{AuCl}_3$  (o cloruro aurico), il quale presenta un comportamento chimico analogo a quello del tribromuro di oro,  $\text{AuBr}_3$  o bromuro aurico, solido rosso di struttura dimera.<sup>4</sup>

Au(III) risulta, inoltre, isoelettronico con Pt(II) e, come il platino, forma complessi quadrato-planari. Si è quindi inizialmente ipotizzato che l'Au(III) fornirebbe una buona alternativa a Pt(II), con modalità di azione simile per il trattamento anti-cancro. Tuttavia, a causa dell'ambiente intracellulare riducente, la tendenza del centro di Au(III) ad essere ridotto ad Au(I) o di Au(0) rende la scelta dei leganti particolarmente rilevante.

Anche Au(I) in soluzione acquosa è instabile e tende a dismutare a Au(0) e Au(III). Molti dei suoi composti sono altamente tossici a causa dell'alto potenziale ossidante (es.  $\text{HAuCl}_4$  ed i suoi sali), ma è possibile minimizzare la tossicità utilizzando leganti appropriati in grado di stabilizzare il centro metallico. Attività e tossicità dei complessi dipendono anche dal carattere idrofilo/lipofilo che deve essere ben bilanciato, in modo da avere una solubilità sufficiente in ambiente fisiologico e una lipoficità tale da consentire l'ingresso della molecola all'interno delle cellule. Anche lo stato di ossidazione influisce sulla tossicità del metallo, d'altra parte Au(III) è un forte ossidante e quindi potenzialmente tossico. Au(I) è termodinamicamente più stabile e meno ossidante di Au(III), risultando così meno tossico per l'organismo.

## 4. MECCANISMI DI AZIONE BIOLOGICA

### 4.1 DESIGN RAZIONALE DI METALLOFARMACI

Il design razionale di farmaci a base metallo è un'idea abbastanza nuova di sviluppo di nuove entità chimiche. Nella maggioranza dei casi i complessi metallici somministrati sono dei “profarmaci”, molecole che non risultano attive se non nel momento in cui raggiungono il bersaglio desiderato. Esse subiscono quindi una trasformazione, o meglio attivazione, prima di raggiungere il sito d'azione, tra cui specialmente riduzione o ossidazione dello ione metallico, sostituzione di leganti, o reazioni dei leganti tramite gruppi funzionali lontani dal metallo. Risulta pertanto di notevole importanza individuare il preciso meccanismo di azione di questi farmaci, prendendo in considerazione sia gli aspetti relativi alla reattività del complesso metallico, i quali controllano la stabilità del complesso in ambiente biologico, sia gli aspetti relativi ai percorsi biochimici che governano l'*uptake* cellulare, il metabolismo e l'escrezione.<sup>5</sup>

I principali caratteri che influenzano l'attività e le interazioni di questi farmaci riguardano:

- Numero di coordinazione, tipicamente compreso tra 4 e 6 per i metalli di transizione
- Geometria, tra cui lineare ( $\text{Au}^{\text{I}}$ ), quadrato-planare ( $\text{Pt}^{\text{II}}$ )
- Stati di ossidazione
- Tipo e proprietà dei leganti
- Stabilità termodinamica, con un ampio intervallo di forza di legame metallo-legante
- Stabilità cinetica, ampio intervallo di tempo di vita del legame metallo-legante (ns-anni)
- Stabilità nucleare

Un valore significativo è assunto inoltre dal problema della selettività, cioè dell'*uptake* preferenziale del composto nel tessuto o organo bersaglio. La selettività può essere spontanea (o passiva) o indotta. Il principale meccanismo di selettività spontanea verso i tessuti tumorali sfrutta il cosiddetto effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). Molecole di determinate dimensioni, in particolare nanoparticelle e farmaci macromolecolari, tendono ad accumularsi nel tessuto tumorale molto più di quanto non facciano nei tessuti normali. I vasi sanguigni nei tumori solidi sono “bucherellati” e quindi macromolecole o nanoparticelle con diametro compreso fra 60 e 400 nm possono extra-vasare, godendo così di un meccanismo passivo di selettività per i tumori. In alternativa, si ricorre a sistemi attivi. Il cosiddetto *active targeting* consiste nel funzionalizzare la molecola (o la superficie di una nanoparticella) con opportuni *targeting vectors* (molecole o macromolecole) che ne favoriscano la concentrazione nel tessuto bersaglio, tipicamente un tumore.

## 4.2 L'AZIONE BIOLOGICA DEI COMPLESSI DI ORO

Il cancro è una condizione patologica caratterizzata dalla proliferazione non controllata di cellule che hanno la capacità di infiltrarsi nei normali organi e tessuti dell'organismo, alterandone la struttura e il funzionamento. Comporta una serie di alterazioni della funzione cellulare ed è spesso associata a infiammazioni persistenti e incontrollate nel microambiente tumorale che porta alla propagazione del cancro. Il metabolismo cellulare alterato è essenziale per la crescita e la sopravvivenza delle cellule del tumore in un microambiente specifico.

Con l'intento di sviluppare farmaci a base metallica, la sfida intrinseca di molti ricercatori è stata quella di individuare e comprendere i meccanismi d'azione delle entità chimiche in questione, migliorandone l'efficacia di interazione e trasporto, per mostrare attività antitumorale.

L'oro è considerato un valido candidato, grazie a diverse proprietà fondamentali; a partire dalle dimensioni molto piccole delle nanoparticelle di oro, le quali tendono ad essere attratte dalle cellule tumorali che necessitano di nutrimento per alimentare la propria crescita tumultuosa; esse si accumulano nel tumore, risparmiando quasi completamente le cellule sane. In secondo luogo, risulta importante la particolare interazione delle particelle d'oro con la luce, le quali, una volta irraggiate, si scaldano fino a danneggiare irreversibilmente le cellule tumorali. Questo approccio può essere ulteriormente potenziato dal fatto che l'oro è un metallo ricco di elettroni, il che implica che esso interagisca con i raggi X, rendendo il tessuto tumorale più sensibile alla radioterapia.

Per lungo tempo però, i complessi del metallo anticancro sono stati progettati in modo tale da riprodurre le principali caratteristiche del cisplatino, in termini di struttura e reattività, considerando il DNA il bersaglio primario. Tuttavia, grazie a recenti tecnologie bio-analitiche più potenti e avanzate, è stato affermato che i farmaci a base di metalli, tra cui principalmente l'oro, interagiscono con diversi obiettivi biomolecolari, in particolare proteine, influenzando così diversi processi biologici distinti al di là del DNA e del suo funzionamento.

In questa trattazione vengono esposti i principali meccanismi di azione biologica coinvolti nell'alterazione della proliferazione e della nascita delle cellule tumorali.

## 4.3 DNA: UNO DEI PRINCIPALI TARGET

Essendo il DNA al centro della genetica, esso regola la maggior parte dei processi biochimici. Le cellule tumorali portano generalmente copie extra di DNA come conseguenza dell'anormale replicazione del DNA, che permette un approccio al DNA come bersaglio. Sono stati studiati diversi complessi metallici, in particolare di oro(III), i quali portando una grande carica positiva, possiedono una maggiore affinità verso il DNA relativamente carico negativamente. Questi complessi presentano attività reversibili verso il DNA e sono fortemente influenzati dalla natura dei leganti dell'oro. I complessi portatori di piridile, bipyridile e leganti poliamminici

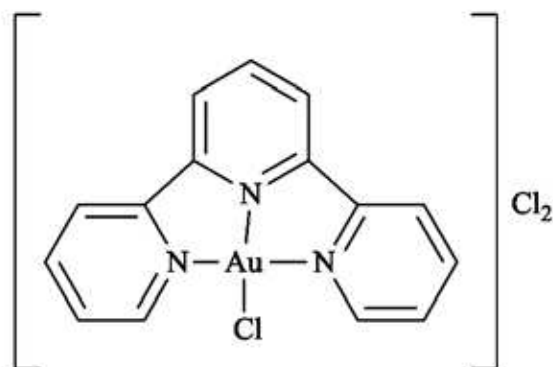


Figura 6 - Struttura di  $[Au(terpyridyl)Cl]Cl_2$

instaurano interazioni deboli e reversibili verso il DNA quando il DNA subisce processi di auto-riparazione. Tuttavia, complessi di leganti terpiridinici con l'oro (III), quale ad esempio  $[\text{Au}(\text{terpridyl})\text{Cl}]\text{Cl}_2$  (fig.6) hanno dimostrato un'interazione più forte e irreversibile, comparabile al DNA. Il complesso interagisce con la struttura G-Quadruplex (sequenza di acidi nucleici ricca di Guanina in grado di formare struttura a quattro filamenti) in diversi siti di legame, inibendo telomerasi (ribonucleoproteina che aggiunge sequenza ripetitive di DNA) che bloccano il legame enzima-DNA, o addirittura prevenendo la formazione del G-Quadruplex. Una serie, inoltre, di ditiocarbammati di oro(III) quali  $\text{Au}(\text{S}_2\text{CNMe}_2)\text{X}_2$  (fig.7) e  $\text{Au}[\text{S}_2\text{CN}(\text{Me})\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OEt}]\text{X}_2$  (fig.8) (con X = Cl o Br) ha dimostrato di formare addotti Au(III)-DNA con una cinetica più veloce di quelle mostrate dal cisplatino, che portano ad effetti citotossici ed infine a meccanismi di morte.<sup>6</sup>

Oltre a questi risultati, anche i complessi di Au(I) sono egualmente conosciuti per la loro attività di inibizione verso gli enzimi implicati nella replica del DNA. Il legame diretto del composto di oro(I) verso il DNA delle cellule tumorali provoca la formazione di un addotto del DNA, che genera una popolazione di cellule del DNA danneggiate e porta ulteriormente alla sua frammentazione quando i meccanismi di auto-riparazione non funzionano. Queste cellule danneggiate del DNA, una volta arrestate alla fase G2/M, regolano le proteine pro-apoptotiche, P53 o P73, avviando così la via di apoptosi per eliminare le cellule nocive.<sup>7,8</sup>

#### 4.4 INIBIZIONE DI TRXR

La Tioredossina (Trx) è una proteina ubiquitaria, formata da 105 amminoacidi con un peso molecolare di 12.5 kDa, contenente un sito attivo ditiolo-disolfuro; essa è indispensabile al mantenimento dell'ambiente redox cellulare.

Tioredossina reductasi (TrxR) (fig.9) è un particolare isoenzima, appartenente alla famiglia di proteine piridina nucleotide-disolfuro ossidoreductasi, che incorpora nella sua struttura un atomo di selenio, sottoforma del residuo amminoacidico seleno-cisteina (Sec), grazie al quale catalizza la sua interazione redox con Trx. La TrxR, infatti, catalizza la riduzione della Trx attraverso il NADPH come segue (fig.10):<sup>9,10,11</sup>

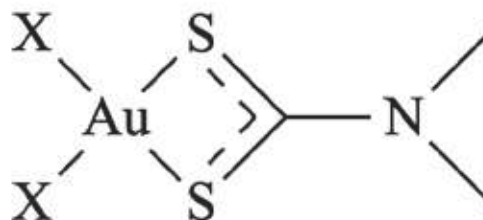


Figura 7 - Struttura di  $\text{Au}(\text{S}_2\text{CNMe}_2)\text{X}_2$

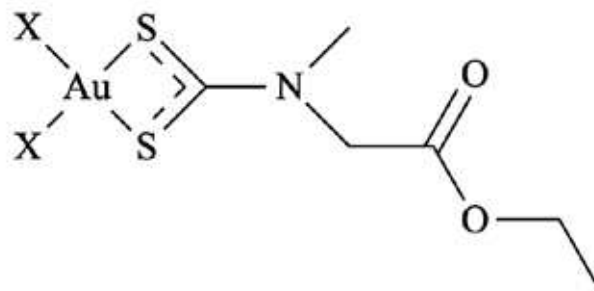


Figura 8 -  $\text{Au}[\text{S}_2\text{CN}(\text{Me})\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OEt}]\text{X}_2$

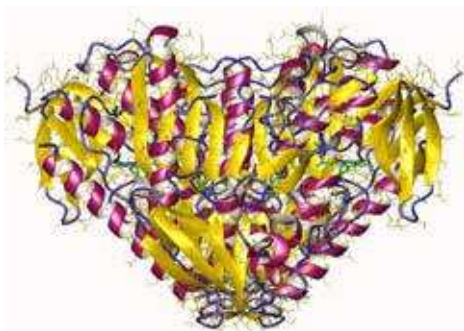


Figura 9 - Rappresentazione grafica di TrxR

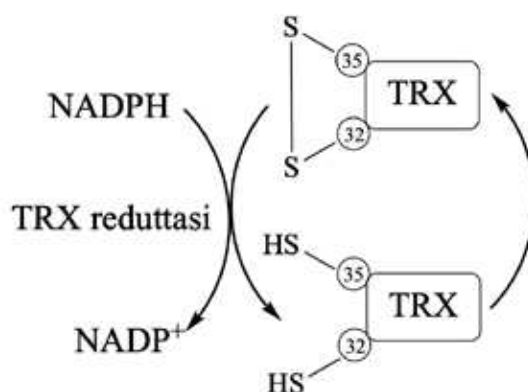
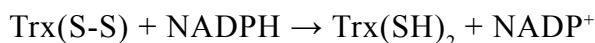


Figura 10 - Schema di reazione della riduzione di Trx attraverso NADPH



Questa è un evento essenziale per le cellule tumorali per sintetizzare i fattori di trascrizione necessari per la loro proliferazione, sopravvivenza, invasione e metastasi. Una sostituzione di Sec con Cys va a ridurre notevolmente la bioattività di questi enzimi; ciò è dovuto probabilmente alla  $pK_a=5.2$  del selenolo nel sito attivo inferiore a quella del gruppo tiolo,  $pK_a=8.0$ . Pertanto, il gruppo selenolo presente in Sec (interamente dissociato a pH fisiologico) forma un nucleofilo migliore rispetto al gruppo tiolo (non dissociato). Di conseguenza, il sistema mitocondriale di tioredossina protegge la propagazione delle cellule del cancro, contribuendo alla resistenza chemioterapica.

I meccanismi di controllo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo del tumore. Le cellule tumorali sono note per generare più ROS delle cellule normali. Risulta quindi importante evidenziare che il ROS non solo contribuisce alla progressione tumorale amplificando l'instabilità genomica, ma le cellule trasformate utilizzano segnali ROS per guidare la proliferazione. Trx è un attore chiave nel controllo dello stress ossidativo, in quanto lega ROS prima che le cellule possano essere danneggiate, favorendone un aumento di proliferazione, inibizione di apoptosi e angiogenesi (sviluppo di nuovi vasi sanguigni). Il sistema tioredox, infatti, è stato recentemente suggerito come un bersaglio terapeutico per la terapia al cancro, considerandolo un obiettivo per lo sviluppo di nuovi farmaci. L'inibizione di TrxR potrebbe stimolare la produzione di ROS, perturbare l'omeostasi redox cellulare e, infine, indurre l'apoptosi cellulare.

È stato ben documentato che i complessi di oro(I) sono potenti inibitori di TrxR. La natura di

un acido di Lewis soft e di una specie tiolo-reattiva motiva la capacità di mirare al sistema tio-redossina ricco di tiolo e selenocisteina. A partire da Auranofin, uno dei primi farmaci inibitori di Trx, si dimostrò che l'efficienza di complessi fosfinici di oro(I), per inibire Trx e TrxR alla concentrazione nanomolare, è principalmente dovuta all'alta affinità di oro verso i calcogenuri che promuove il legame selettivo e irreversibile dell'oro al dominio di Sec di TrxR. Come conseguenza dell'inibizione di TrxR, l'enzima reduttasi è convertito in ossidasi che provoca un'alta produzione e l'accumulo di ROS, seguito dalla perossidazione lipidica e dal danno ossidativo alle cellule.

Diversi ricercatori, tra cui nello specifico Gandin<sup>12</sup> affiancata dal suo gruppo di ricerca, affermarono che la coordinazione di ditiocarbammati e altri leganti tiolo dimostra una maggiore potenza inibitoria; ciò si spiega in termini di lipofilia, che permette di permeare prontamente la membrana cellulare per interagire con il dominio di Trx.

Nonostante sia stato riportato, nel 1998, che i complessi di Au(III) richiedono una concentrazione 1000 volte superiore rispetto a quelli di Au(I) per produrre effetti inibitori su TrxR, diversi complessi di oro(III) quali [Au(Dien)Cl]Cl<sub>2</sub> (fig.11, 1), Au(py<sup>dmb</sup>-H)(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (fig.11, 2), [Au(bpy<sup>dmb</sup>-H)(OH)][PF<sub>6</sub>] (fig.11, 3) e [Au(bpy<sup>dmb</sup>-H)(2,6-xilidina)][PF<sub>6</sub>] (fig.11, 4) hanno mostrato promettenti dosaggi inibitori nel range micromolare, mentre Au(S<sub>2</sub>CNMe<sub>2</sub>)X<sub>2</sub> (fig.7) e Au[S<sub>2</sub>CN(Me)CH<sub>2</sub>C(=O)OEt]X<sub>2</sub> (fig.8) (X = Cl o Br), hanno mostrato inibizione di TrxR a concentrazioni nanomolari. La potenza inibitoria dei composti dell'oro è in gran parte influenzata dallo stato di ossidazione del centro metallico e dalla labilità del legante coordinato. L'oro(III), infatti, avendo carattere "hard", presenta una probabilità relativamente inferiore con il sito attivo di Sec di TrxR.<sup>13</sup>

Effettuiamo un confronto con glutadione reduttasi (GSR), una proteina strutturalmente e funzionalmente correlata a TrxR, ma che sfrutta gruppi sulfidrilici per la sua catalisi in quanto priva di selenolo. Essa richiede una maggiore concentrazione di complesso di oro per essere inibita; ciò conferma l'alta selettività dei composti di oro per i selenoenzimi.

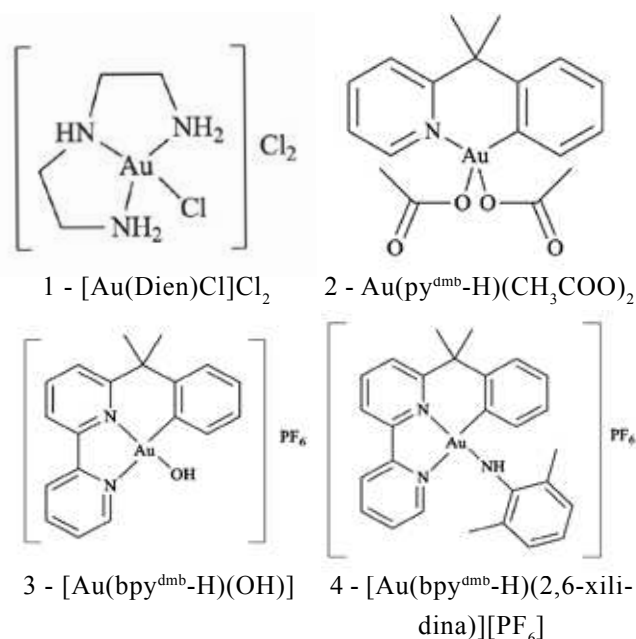


Figura 11 - Struttura dei complessi di oro(III) (1-4), inibitori di TrxR

#### 4.5 INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' MITOCONDRIALE

Studi meccanicistici sui composti di Au(I) hanno rivelato che i mitocondri rientrano tra i siti biologici più probabilmente mirati tra gli organelli cellulari. Essi sono responsabili della produzione di energia necessaria alla cellula per crescere e riprodursi; svolgono un ruolo essenziale nel metabolismo energetico e nella produzione di adenosintrifosfato (ATP), fosforilazione ossidativa, omeostasi sull'assorbimento/rilascio del calcio, produzione di nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) e sintesi di DNA. L'inibizione dell'attività mitocondriale attraverso la regolazione del potenziale e della permeabilità della membrana mitocondriale e l'inibizione delle attività proteiche è essenziale per determinare l'induzione o l'inibizione dell'apoptosi; le cellule tumorali presentano attività mitocondriali elevate. La diversa natura dei leganti influenza i diversi meccanismi molecolari di azione dei complessi dell'oro nei mitocondri.

Innanzitutto, si è studiato come i tiolati di Au(I) (che possiedono una maggiore affinità per regioni cellulari ricche di gruppi sulfidrilici) e i complessi fosfinici di oro(I) (con maggiore affinità per proteine contenenti tiolo o selenocisteine, ricche di selenio) funzionino da cationi lipofili delocalizzati, con il conseguente accumulo nei mitocondri delle cellule cancerose. Lo stato di ossidazione +I dell'oro conduce alla coordinazione diretta di quest'ultimo al dominio selenolato del sito attivo della tioredossina riduttasi mitocondriale, provocando la crescita del potenziale interno della membrana mitocondriale.

La membrana dei mitocondri, composta da un doppio strato di fosfolipidi e da proteine, si suddivide in:

- Membrana interna, con numerose introflessioni e creste che ne aumentano la superficie, composta all'80% da proteine, impermeabile
- Membrana esterna, regolare e liscia, ricca di lipidi, proteine e porine, permeabile

I due strati sono connessi da un poro di transizione di permeabilità della membrana (PTP), la cui apertura è regolata dal potenziale di membrana. I fattori che inducono l'apoptosi (AIF, ad esempio procaspase-9<sup>C</sup> e citocromo c<sup>D</sup>) sono localizzati nella membrana interna e in condizioni normali rimangono inalterati, ma non appena le cellule sono esposte a segnali di morte cellulare, l'aumento dell'attività del ROS risulta nel successivo aumento del potenziale esterno, seguito da una riduzione di quello interno. Questo drastico cambiamento di potenziale si traduce in una maggiore permeabilità della membrana esterna, consentendo a AIF di traslocare dai mitocondri al citosol, dando il via alla cascata di segnalazione di apoptosi. Più semplicemente, è noto che i mitocondri convertono molecole di nutrienti in ATP nel processo di fosforilazione ossidativa (OXPHOS) (fig.12).

---

C Procaspase-9: proenzima inattivo

D Citocromo c: piccola emoproteina, in grado di catalizzare diverse reazioni



Durante questo processo avviene il trasferimento di elettroni da elettroni-donatori a elettroni-accettori, l'ultimo dei quali è  $O_2$ . Queste reazioni redox, compiute da una serie di proteine complesse collocate nella membrana interna, rilasciano energia che viene usata per pompare dei protoni attraverso la membrana stessa dei mitocondri generando un gradiente di pH e di potenziale elettrico ai suoi due lati. Questa energia consente ai protoni di ritornare all'interno, secondo potenziale, fluendo attraverso ATP-sintasi (enzima, motore molecolare, una pompa ionica) (fig.13). Sebbene la catena di trasferimenti elettronici nei mitocondri, che porta alla riduzione tetra-elettronica di  $O_2$  ad  $H_2O$ , sia molto efficiente, la "perdita" accidentale di elettroni può portare alla produzione di specie parzialmente ridotte di  $O_2$ , come ione superossido (riduzione con 1 elettrone) e perossido (riduzione con 2 elettroni), cioè ROS.

L'accumulo di cationi lipofili sul lato interno della membrana interna ne altera il potenziale e la permeabilità.<sup>14</sup>

Un altro meccanismo esplorato riguarda l'attivazione della via dell'apoptosi P38-MAPK<sup>15</sup>; essa innesca l'attivazione di caspasi iniziatrici, quali caspasi-3, caspasi-7 e caspasi-6 (proteasi con Cys nel sito attivo), nonché di DNasi (nucleasi in grado di scindere enzimaticamente DNA), per la frammentazione di DNA seguita dalla morte delle cellule.

È stato dimostrato che alcuni complessi di Au(I), quali  $[Au(d2pypp)_2]^+$  (fig.14, 1) e  $[(i-Pr_2Im)_2Au]^+$  (fig.14, 2), si accumulano preferenzialmente nei mitocondri delle cellule tumorali e, guidati dall'elevato potenziale di membrana mitocondriale, inducono selettivamente apoptosi nelle cellule del cancro al seno, ma non in quelle normali del seno stesso. Confrontandoli con  $[Au(dppe)_2]^+$  (fig.14, 3), si nota come quest'ultimo provochi necrosi e non apoptosi a causa dell'elevata lipofilità, mostrando come l'attento design dei leganti risulti fondamentale per garantire una maggiore selettività.<sup>16</sup>

Inoltre, una vasta gamma di composti di Au(I) con piridil fosfina e leganti NHC può causare la morte cellulare tramite mitocondri da diversi percorsi, alcuni dei quali richiedono l'azione di PTP.

Nonostante una grande varietà di composti di Au(III), tra cui ditiocarbammati, siano potenti inibitori dell'attività mitocondriale, è importante notare come la maggior parte dei composti attivi di Au(III) potrebbero essere specie di Au(I) prodotte dalla riduzione *in vivo* di Au(III).

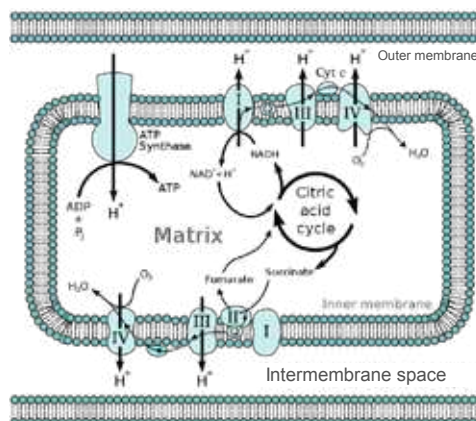


Figura 12 - processo di OXPHOS

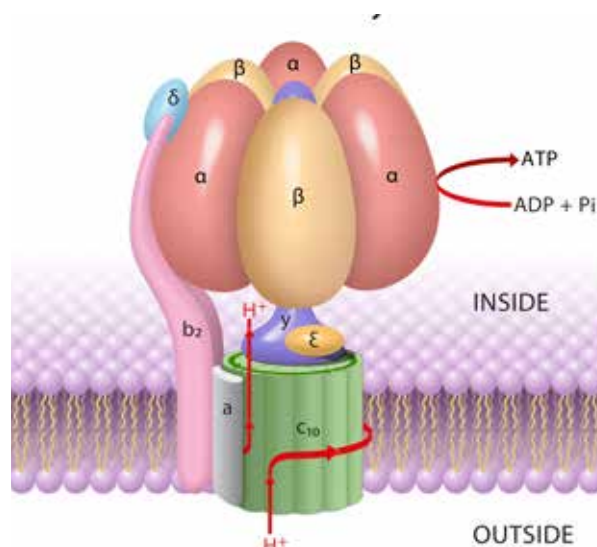


Figura 13 - Struttura ATP sintasi

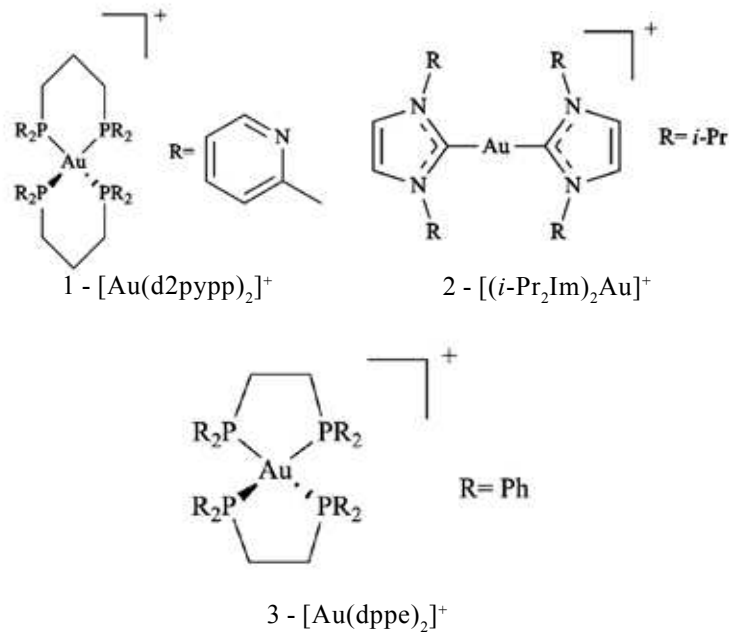


Figura 14 - Struttura dei complessi 1-3 che portano ad apoptosi delle cellule tumorali, tramite via mitocondriale

#### 4.6 MODIFICA DI STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE

Le proteine rappresentano di protagonisti indiscussi nello svolgimento delle funzioni essenziali dell'organismo. Se uno ione metallico, sotto forma di metallofarmaco, si legasse ad una proteina, potrebbe comprometterne irreversibilmente l'attività biologica, creando scompensi e conseguente morte cellulare. Le specie d'oro attivate sono, ad esempio, in grado di coordinare strettamente tioli, imidazoli e selenoli facenti parte delle catene laterali di molte proteine, compromettendone così il funzionamento.

Lo studio delle proteine permette di identificare quelle implicate in uno specifico disordine. Studi comparativi di interazione proteomica o proteina-proteina, assistiti da analisi bioinformatiche, possono diventare cruciali per decifrare il vero meccanismo di un certo farmaco a base di metalli. Uno strumento essenziale per studiare la biologia del cancro e i meccanismi dei farmaci antitumorali è la proteomica, ovvero lo studio delle proteine, sia nelle forme appena trascritte dai geni sia nelle isoforme o eventuali modifiche post-traduzionali che possono verificarsi nella cellula dopo la trascrizione.

Diversi studi hanno dimostrato che i composti dell'oro influenzano il metabolismo delle proteine, il quale coinvolge svariati enzimi, quali ad esempio i proteasomi (fig.15).

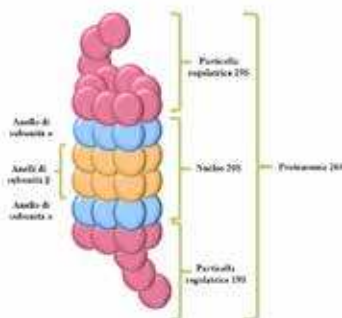


Figura 15 - Struttura del proteasoma

La via di ubiquitina-proteasoma (complesso proteolitico responsabile della degradazione intracellulare delle proteine danneggiate, coinvolte nel mantenimento e nella regolazione di vari processi cellulari), risulta essenziale per il regolamento del ciclo cellulare, apoptosi e angiogenesi, motivo per cui gli inibitori dei proteasomi stanno diventando oggetto di ricerche anti-cancro intense.

È stato dimostrato che composti ditiocarbammato di oro(III) presentando effetti inibitori in cellule intatte di cancro al seno di MDA-MB-231. L'inibizione del proteasoma da parte di questo composto è stata confermata dalla diminuzione dell'attività proteasomica, dall'aumento dei livelli di proteine ubiquitinate e dalla proteina bersaglio proteasoma P27. L'induzione dell'apoptosi da parte di questo composto ditiocarbammato di oro(III) è stata confermata sia nella linea cellulare MDA-MB-231 che nei tumori trattati da saggi multipli che misurano caratteristiche cellulari e biochimiche.<sup>17</sup>

#### 4.7 IL GLUCOSIO E IL SUO METABOLISMO

Tutte le cellule necessitano di un apporto costante di energia per sopravvivere, anche le cellule tumorali, le quali presentano un elevato fabbisogno energetico, dovuto ai loro alti tassi di proliferazione. La capacità delle cellule tumorali di variare i modelli metabolici cellulari, conosciuta come riprogrammazione metabolica, è caratterizzata da un assorbimento sregolato del glucosio, notevolmente diverso da quello esibito dalle cellule normali.

Il glucosio è uno zucchero semplice, un monosaccaride aldeidico, utilizzato come principale fonte di energia dalle cellule degli organismi viventi. Il metabolismo del glucosio nell'uomo si suddivide in glicolisi aerobica e anaerobica. L'ossidazione aerobica è il processo mediante il quale il glucosio viene ossidato a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O in presenza di ossigeno, con formazione di ATP. L'ossidazione aerobica del glucosio si suddivide in diversi stadi, a partire dalla decomposizione del glucosio a piruvato, a sua volta ossidato e decarbossilato nei mitocondri per produrre acetil-CoA (coenzima); segue il ciclo dell'acido tricarbossilico e la fosforilazione ossidativa. Da quando è stato scoperto che il metabolismo del glucosio nelle cellule tumorali avviene principalmente attraverso la glicolisi aerobica, un numero crescente di ricercatori si è concentrato sulla comprensione del ruolo del metabolismo del glucosio nella crescita, proliferazione e metastasi delle cellule tumorali. Le cellule tumorali metabolizzano il glucosio in modo diverso da quelle normali, con attività circa 200 volte maggiore rispetto alle cellule sane, permettendo alla cellula tumorale di sopravvivere anche in mancanza di ossigeno (la metabolizzazione completa del glucosio nell'organismo necessita di ossigeno come accettore di elettroni), di produrre essenziali per la rapida crescita (fosfolipidi, proteine), e di produrre un ambiente circostante estremamente favorevole per la sua sopravvivenza. La glicolisi anaerobica causa la produzione di acido lattico che viene riversato nell'ambiente circostante e favorisce l'infiltrazione nei tessuti sani e la protezione della cellula dall'azione del sistema immunitario; esso funge da "carburante" per la crescita tumorale e regola il microambiente tumorale.

Interferire con la glicolisi delle cellule neoplastiche può rappresentare una strategia potenzialmente efficace per contrastare la crescita delle cellule tumorali. I composti dell'oro hanno strutture elettroniche speciali, stati di riduzione-ossidazione (redox) variabili e attività biologiche speciali. Esperimenti *in vitro* hanno confermato che alcuni composti di Au(I) e Au(III) possono influenzare il metabolismo del glucosio.<sup>18</sup>

## 4.8 INIBIZIONE DI TOPOISOMERASI

Le topoisomerasi sono enzimi, facenti parti della classe delle isomerasi, che regolano il metabolismo del DNA, determinando una modifica del grado di superavvolgimento.<sup>19</sup> Si dividono in due categorie principali: topoisomerasi I, in grado di rompere un singolo filamento di DNA e determinarne una sua torsione intorno al filamento integro, e topoisomerasi II, che agisce tagliando entrambi i filamenti di DNA. Esse risultano quindi essenziali nella replicazione del DNA. Grazie a questa loro proprietà, risultano un obiettivo importante nella chemioterapia al cancro.

Lo studioso Tiekink ha dimostrato che i tiolati di complessi fosfinici di oro(I) inibiscono la topoisomerasi I del DNA a concentrazioni inferiori a 2  $\mu\text{M}$  impedendo all'enzima di rilassare il plasmide pBR322 superavvolto del DNA. Non vi è comunque alcuna prova certa che questo meccanismo possa ragionevolmente essere sostenuto.<sup>20</sup>

## 4.9 LUMINESCENZA FINALIZZATA ALL'INDAGINE BIOLOGICA

La tecnica della luminescenza è stata sempre più sviluppata, negli ultimi decenni, per indagini biologica, sfruttando la visualizzazione in tempo reale, l'elevata sensibilità e osservazioni dirette dell'assorbimento e distribuzione intracellulare. I *bioprobes* (=biosensori) luminescenti rappresentano un mezzo analitico molto utilizzato in *bio-imaging* e *bio-sensing*.

Purtroppo, la maggior parte dei sistemi antitumorali contenenti Au non riportano proprietà di sonda guidate dalla luminescenza, il che è probabilmente dovuto alla loro natura non emissiva. L'emissione luminosa di alcuni complessi di Au<sup>I</sup>-NHC è spesso associata all'introduzione di leganti fluorescenti tradizionali, quali antrile, pirenile, cumarina o BODIPY; si tratta però di fluorofori tipici di *quenching* (fenomeno attraverso il quale viene smorzata la fluorescenza, dovuto a molecole che assorbono energia) causato da aggregazione (ACQ) e la loro emissione è spesso attenuata ad elevate concentrazioni o nello stato aggregato, il che limita la loro applicazione in *bio-imaging* e *bio-sensing*.

Fortunatamente, la scoperta di luminogeni ad emissione indotta dall'aggregazione (AIEgens) permette di superare questi ostacoli; in particolare i bioprobes a base di AIE godono di diverse superiorità, tra cui la luminosità robusta negli aggregati, l'elevata resistenza al fotosbiancamento, il grande Stokes Shift e l'eccellente biocompatibilità. Considerando le tipiche caratteristiche AIE del tetrafeniletene (TPE) e la sua eccellente stabilità, facile modifica e la spiccata capacità antitumorale dei complessi Au<sup>I</sup>-NHC, si prevede che l'incorporazione del TPE nell'Au<sup>I</sup>-NHC permetterebbe di sfruttare tutti i vantaggi di AIEgens e dei complessi di Au<sup>I</sup>.

In primo luogo, sono state progettate le molecole (fig.16) in base alle seguenti considerazioni:

- l'unità TPE AIE-attiva è stata introdotta nel framework NHC per dotare i sistemi risultanti di proprietà AIE
- diversi leganti coordinati con Au, con distinta capacità di donazione elettronica, tra cui un legante fosfina (PPh<sub>3</sub>, 1), due diversi leganti NHC (2 e 3), legante acetiluro (4), e legante cloruro labile (1e) sono stati selezionati per ottenere il confronto di specie neutre complesse e cationiche
- i leganti puri 1d sono stati utilizzati per il confronto per determinare il ruolo critico dell'atomo di Au nelle prestazioni antitumorali

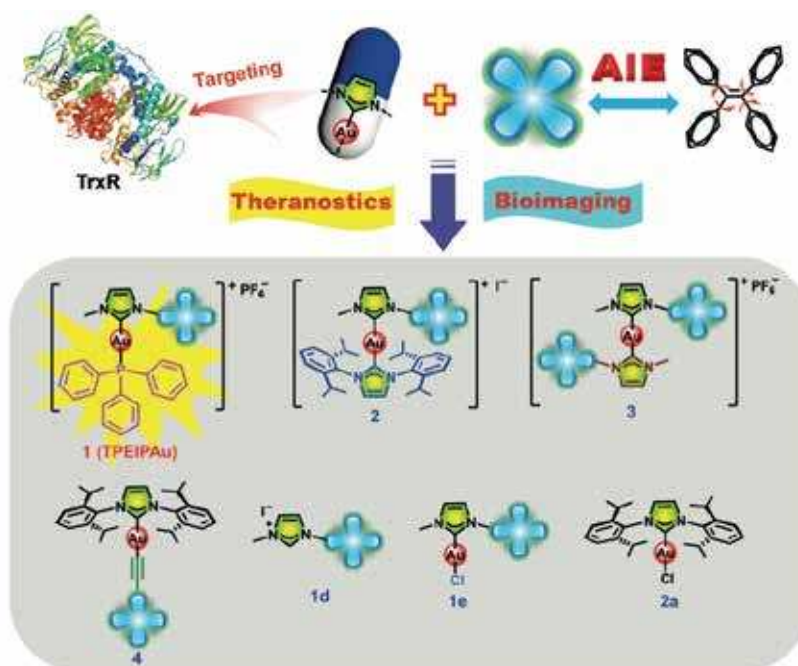


Figura 16 - Struttura dei complessi di Au e unità TPE AIE

I complessi rappresentati (1-4) mostrano tutti un'elevata stabilità in condizioni ambientali e risultano solubili in solventi organici, quali cloroformio, diclorometano, tetraidrofurano (THF) e dimetilformammide (DMF).

Non si notano interazioni aurofiliche e intermolecolari nelle loro strutture a causa degli effetti sterici dati dalle ingombranti unità TPE che adottano una tipica configurazione ad elica.

Come anticipato, i complessi 1-4 e i composti di contrasto 1d e 1e tutti hanno mostrato proprietà tipiche dell'AIE a causa dell'introduzione di unità TPE AIE-attive.

Dall'analisi delle loro soluzioni diluite in CH<sub>3</sub>CN (1-3) o THF (4, 1d e 1e) si nota come esse non fossero emissive. Tuttavia, con l'aggiunta di 80 vol % di acqua nelle rispettive soluzioni di CH<sub>3</sub>CN o THF, le miscele risultanti aumentano la fotoluminescenza blu (PL) con la massima lunghezza d'onda di emissione a circa 470 nm. Da notare che queste bande di PL osservate rappresentano la luminescenza tipica originata da gruppi TPE, in modo che potremmo presumibilmente escludere i contributi da aurofilia o metallo.

Notando inoltre che i composti da 1-3 e 1e presentano dimensioni relativamente più piccole rispetto agli aggregati 4 e 1d, i quali sono più inclini a riunirsi, si presume che gli aggregati 1-3, più piccoli e stabili, siano più favorevoli per l'assorbimento cellulare.

I complessi 1-3 sono favoriti per l'accumulo in cellule tumorali e potrebbero permettere la bio-rappresentazione specifica delle cellule tumorali, grazie anche alla loro elevata fotostabilità. In confronto, i complessi 4, 1d e 1e sono completamente inefficaci e non permettono l'individuazione di alcun segnale fluorescente.

Grazie al saggio MTT (3-(4,5- dimetil-2-tiazoli)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) sono state testate le proprietà antiproliferative del composto 1 contro varie cellule tumorali, tra cui in primis la linea cellulare MCF-7, constatando una notevole diminuzione della vitalità cellulare delle cellule tumorali.<sup>21</sup>

# 5. CANCRO AL SENO E CURE ANTITUMORALI A BASE DI ORO

## 5.1 CANCRO AL SENO: GENERALITA'

Il tumore della mammella rappresenta la neoplasia maligna più frequente tra le donne ed è una malattia eterogenea, contraddistinta da molteplici caratteristiche istopatologiche e molecolari. Il tumore al seno si sviluppa principalmente da due tipologie di cellule epiteliali: le cellule dei lobuli (piccole ghiandole deputate alla produzione del latte, tumori lobulari) e dei dotti lattiferi (le quali portano il latte dal lobulo al capezzolo, tumori duttali).

A seconda della loro capacità di invadere altri tessuti rispetto a quello da cui hanno avuto origine, i tumori possono essere descritti come “non invasivi” (tumore benigno) o “invasivi” (tumore maligno). Inoltre, dal punto di vista della sua evoluzione, il tumore viene classificato in 5 categorie diverse, definite stadi.

Dal punto di vista molecolare, i sottotipi di tumore al seno si differenziano in base all'espressione di specifici recettori (proteine presenti sulla membrana cellulare che si legano a determinati ormoni prodotti dall'organismo attivando la cellula e promuovendo la sua moltiplicazione) sulla superficie delle cellule:

- tumore della mammella positivo per il recettore del fattore di crescita dell'epidermide 2 (*epidermal growth factor receptor 2*, HER2), caratterizzato da una sovraespressione della proteina HER2 sulla superficie delle cellule. HER2 è il recettore del fattore di crescita epidermico umano che stimola la crescita del recettore della tirosin-chinasi, sulla superficie delle cellule tumorali.
- tumore della mammella positivo per i recettori ormonali (HR, *hormone receptor*). Le cellule producono grandi quantità di recettori dell'estrogeno (ER) o del progesterone (PR), responsabili della crescita tumorale.
- tumore della mammella triplo negativo (TNBC, *triple-negative breast cancer*), caratterizzato da un'espressione ridotta o assente delle proteine ER, PR e HER2 nelle cellule, che non inducono la crescita delle cellule tumorali.
- tumori *basal like*, caratterizzati dall'aumentata espressione delle citocheratine mioepiteliali basali (CK5/6 e CK17)

Di seguito verranno trattati tre diversi complessi, e i loro metodi di azione, per la cura di diversi sottotipi di tumore alla mammella.

## 5.2 AuPhos-19

AuPhos-19 è un complesso ciclometallato di Au(III) caratterizzato dal legante sigma donatore chirale, una chinossalina, un'anello a sei atomi con una gruppo carbonilico in posizione para rispetto ad Au, a cui sono condensati un benzene e un anello piridinico. (fig.17) Si tratta di un composto sintetizzato e caratterizzato come un composto di oro monomero.

Diversi studi hanno indagato sull'utilizzo di questo complesso come inibitore cancro-specifico delle cellule di TNBC, che ne ostacola la proliferazione attraverso diverse linee cellulari, tra cui MDA-MB-468, MDA-MB-231, 4T1 e HCC1937.<sup>22</sup>

Obiettivo di questa sezione è la comprensione del meccanismo di azione (MOA) del complesso di interesse. AuPhos-19 si localizza nei mitocondri e inibisce la loro respirazione per indurre una significativa attivazione di AMPK. L'accumulo di ROS nei mitocondri, la depolarizzazione selettiva delle cellule tumorali della membrana dei mitocondri e il danneggiamento del DNA dei mitocondri forniscono un'ulteriore indicazione che AuPhos-19 perturba la funzione dei mitocondri come meccanismo d'azione, come analizzeremo in seguito.

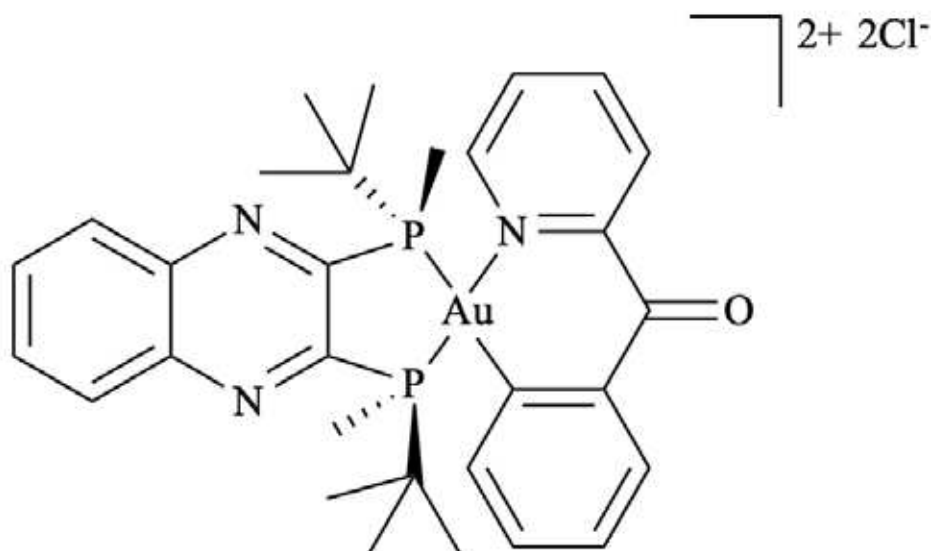


Figura 17- Struttura molecolare di AuPhos-19

### 5.2.1 AuPhos-19 interrompe il metabolismo nelle cellule TNBC e attivazione di AMPK

AuPhos-19 interferisce con il profilo metabolico di TNBC. È stato infatti dimostrato come le cellule MDA-MB-468 e 4T1 mostrino una maggiore dipendenza dal metabolismo ossidativo, rispetto alla glicolisi, tra le linee cellulari TNBC; risultano perciò più sensibili ad AuPhos-19. AuPhos-19 induce una diminuzione dose-dipendente della respirazione massima mitocondriale e della produzione di ATP. L'esaurimento dei livelli di ATP porta all'attivazione di AMPK, una chinasi proteica attivata con AMP (adenosina monofosfato), il quale viene utilizzato come indicatore per i livelli di energia, attivato in caso di carenza di essa. Di conseguenza l'esaurimento di OCR (*oxygen consumption rate*=tasso di consumo di ossigeno) causato da AuPhos-19 provoca l'inibizione della respirazione mitocondriale (OXPHOS) in TNBC.

È noto che gli effetti di attivazione di AMPK includono l'inibizione del bersaglio mammario di rapamicina (mTOR), che è importante per la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali,

nonché l'inibizione dell'enzima acetil CoA (ACC), enzima limitatore di velocità per la sintesi di acidi grassi, necessario per la tumorigenesi. È stata mostrata l'attivazione di AMPK in risposta all'inibizione di OXPHOS da parte di AuPhos-19 nelle celle MDA-MB-468 e MDA-MB-231, combinata con una diminuzione dell'espressione mTOR e dell'inibizione dell'ACC.

### **5.2.2 AuPhos-19 induce disfunzione dei mitocondri, interrompendo i processi mitocondriali**

A supporto della tesi secondo cui i mitocondri OXPHOS siano un bersaglio per AuPhos-19, è stato analizzato l'effetto di AuPhos-19 sul potenziale della membrana mitocondriale (MMP); emerge come esso depolarizzi fortemente le cellule MMP in MDA-MB-468 e MDA-MB-231. La depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale è correlata alla produzione di specie di ossigeno reattivo mitocondriale (mtROS); notando un aumento significativo di mtROS si può confermare l'avvenuta perturbazione da parte di AuPhos-19.<sup>23</sup>

Un'ulteriore conferma è fornita dall'analisi del numero di copie di mtDNA. La sua posizione prossimale alla catena respiratoria lo rende suscettibile di danno indotto da mtROS. Dati raccolti da diverse ricerche hanno indicato che AuPhos-19 ha ridotto il numero di copie di mtDNA.

In aggiunta, è stato studiato l'effetto di AuPhos-19 per indurre apoptosi in TNBC; si osserva notevole aumento di espressione di PARP (marcatore chiave di apoptosi) e un rilascio di citocromo c nelle cellule tumorali. Citocromo c provoca l'attivazione della proteasi apoptotica attivando il fattore-1 (APAF-1), il quale attiva a sua volta caspasi-9 (iniziatore), caspasi-3 (esecutore), portando alla morte cellulare apoptotica.<sup>24</sup>

A supporto di quanto affermato sono stati esaminati l'accumulo e la posizione di AuPhos-19 nelle cellule viventi, notando come i suoi effetti citotossici siano dovuti, principalmente, alla capacità di questa piccola molecola di penetrare all'interno della membrana cellulare.

È stato infatti dimostrato come il composto di interesse si accumula nei mitocondri grazie al carattere cationico lipofilo della molecola che permette di attraversare il doppio strato lipidico della membrana mitocondriale. A sostegno di ciò si è provveduto ad una modifica della molecola data da una funzionalizzazione con un alchino come mostrato in seguito (fig.18), per generare AuPhos-19-AP (*AP=Alkyne-probe*).

Grazie alla sua visualizzazione in fluorescenza, comparata con la molecola madre, è stato dimostrato come essa abbia inibito la proliferazione in vitro delle cellule MDA-MB-468 e diminuito il consumo di ossigeno.



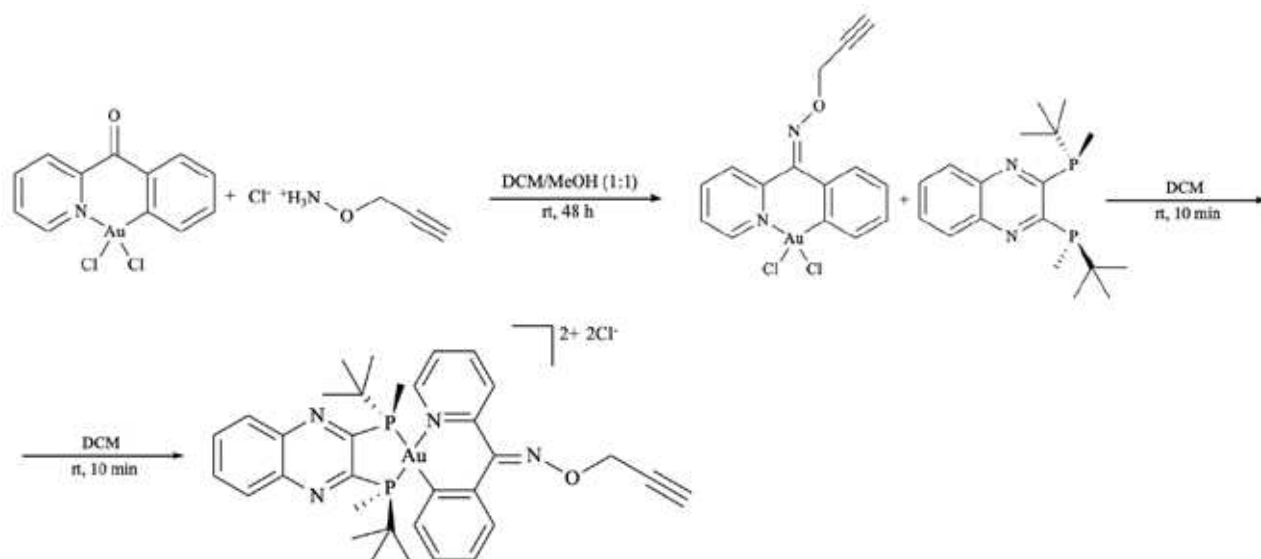


Figura 18- Reazione di funzionalizzazione di AuPhos-19

### 5.3 TRASTUZUMAB

Il trastuzumab è un anticorpo monoclonale (mAb) (anticorpo diretto verso uno e un solo antigene), che trova impiego nel trattamento di alcune forme di tumore al seno, in particolare nei tumori della mammella HER2-positivi; agisce riconoscendo le cellule tumorali e impedendo loro di crescere e riprodursi.

In questo paragrafo si tratterà di come un anticorpo monoclonale farmaco-coniugato (ADC) rappresenti un approccio terapeutico promettente per la chemioterapia del cancro.<sup>25</sup>

#### 5.3.1 ACDs

Gli ACDs sono in grado di combinare la specificità antigene-target degli anticorpi monoclonali con la potenza citotossica dei farmaci chemioterapici.

È noto che le cellule tumorali umane presentano antigeni tumore-specifici, unici o sovra espressi, ai quali mAb può legarsi specificamente. Questi ultimi infatti possono indurre una risposta immunologica o inibire le vie cellulari di segnalazione. Nonostante ciò, l'efficacia di questi anticorpi è limitata dalla morte cellulare che possono provocare; è stato studiato come l'aggiunta di piccole porzioni molecolari citotossiche possa aumentarne l'efficacia.

Inoltre, l'uso di mAbs come veicoli mirati, dà luogo a trattamenti chemioterapici più selettivi, rispetto ad altri farmaci citotossici che non discriminano i tessuti tumorali e quelli sani.

#### 5.3.2 Trastuzumab: caratteristiche e meccanismo d'azione

Trastuzumab è stato il primo ADC approvato da FDA come standard di cura del tumore al seno HER2-positivo in fase avanzata.

Il primo ADC basato su un frammento di carbene N-eterociclico di oro, coniugato ad un anticorpo Trastuzumab ingegnerizzato, è Thiomab. Tuttavia, la coniugazione diretta dell'atomo d'oro alla cisteina libera di Thiomab (legame Au-S-cisteina) può portare a problemi di stabilità. In conseguenza a ciò si ricorre all'introduzione di linkers, i quali svolgono un ruolo rilevante nella stabilità dell'ADC durante il periodo di preparazione, conservazione e circolazione

sistemica. Essi facilitano ulteriormente il rilascio mirato intracellulare includendo funzionalità appropriate. Di seguito vengono riportati due diversi percorsi di strategia sintetica di composti di oro che contengono  $[\text{Au}(\text{PPh}_3)]^+$  e un linker (fig.19):<sup>26,27</sup>

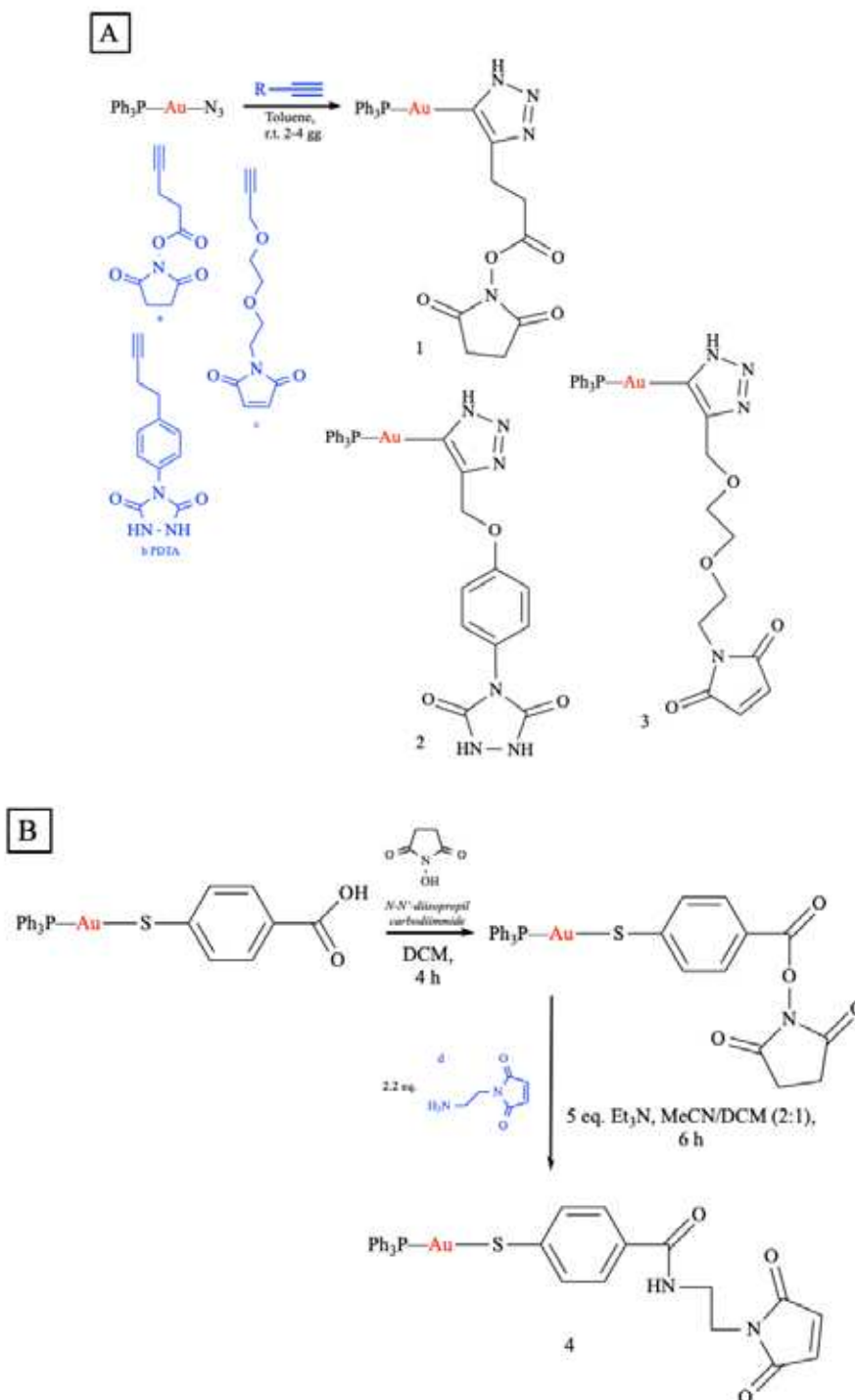


Figura 19- Strategie sintetiche (A e B) per la sintesi dei composti (1-4) per la coniugazione con anticorpi monoclonali

Reazione 1: reazione di cicloadizione copper-free (senza Cu) tra un alchimo terminale linker e un complesso di azide dell'oro

Reazione 2: formazione di legami ammidici tra un linker con un'ammina terminale e un composto di tiolato d'oro contenente un gruppo libero carbossilato ( $[\text{Au}(\text{mba})(\text{PPh}_3)]$ ).

In particolare, i composti 1 e 4 risultano adatti alle reazioni di bioconiugazione all'anticorpo anti-HER2, quale Trastuzumab:

- composto 1: il gruppo estereo reagisce con residui di Lys in Trastuzumab
- composto 4: il gruppo maleimidico reagisce con i residui di Cys in Trastuzumab (disponibili dopo la riduzione dei legami disolfuro intercatena)

Due nuovi coniugati a base di oro anticorpale (AGCs) sono stati così ottenuti come rappresentato in Figura 20: Tras-1 e Tras-4:

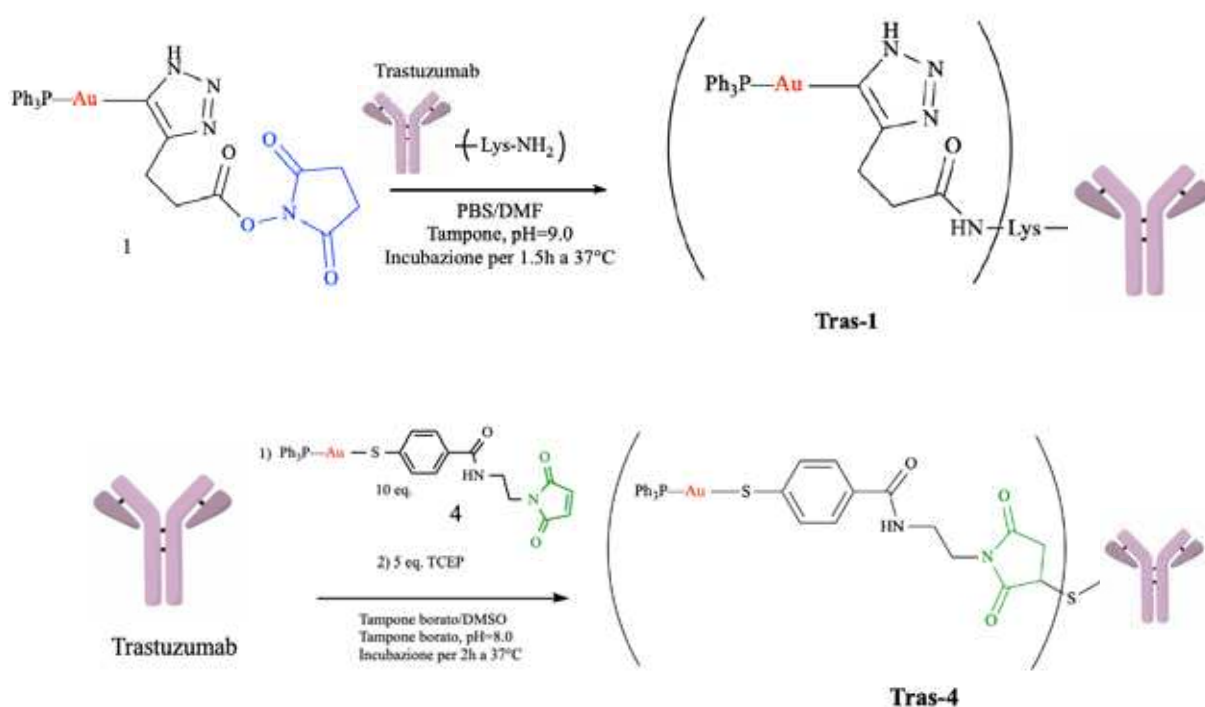


Figura 20- Preparazione di nuovi coniugati Trastuzumab-oro, Tras-1 e Tras-4

Gli AGC, Tras-1 e Tras-4, hanno mostrato una maggiore citotossicità rispetto ai linker d'oro (1 e 4) o Trastuzumab singolo, nelle linee cellulari MCF-7 e BT-474 positive HER2.

Per quanto riguarda il suo meccanismo d'azione, Trastuzumab si lega con un'elevata affinità e specificità al subdominio IV, una regione perimembranosa del dominio extracellulare di HER2. Il legame di Trastuzumab con HER2 inibisce la segnalazione ligando-indipendente di HER2 e impedisce la scissione proteolitica del suo dominio extracellulare, un meccanismo di attivazione di HER2. Conseguentemente, il trastuzumab ha dimostrato, sia in vitro che nell'animale, di essere in grado di inibire la proliferazione delle cellule tumorali umane che iperesprimono HER2. Inoltre, il trastuzumab è un potente mediatore della citotossicità anticorpo dipendente cellulo-mediata (ADCC).

### 5.3.3 Come viene utilizzato?

La sua applicazione principale consiste nel trattamento dei tumori HER2 positivi da soli o in combinazione con chemioterapia, bloccanti ormonali o inibitori della tirosina chinasi.

La terapia sviluppata, seppur innovativa, non è tuttavia priva di effetti collaterali, in particolare a livello di tossicità cardiaca. Poiché con l'interruzione del trattamento generalmente gli effetti collaterali cardiaci regrediscono, è possibile concludere che i benefici della terapia superano comunque di gran lunga i suoi effetti indesiderati.

## 5.4 ATTIVITÀ ANTITUMORALE MULTI-MIRATA DI COMPOSTI AZOLO/FOSFINA ORO (I) NELLE CELLULE DEL CANCRO AL SENO

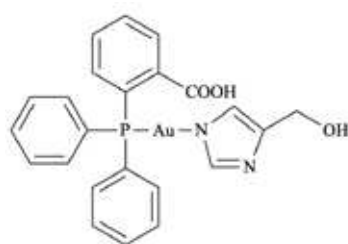
È stata studiata una classe di composti a base di imidazolo e fosfina oro(I) come buoni potenziali candidati per la terapia anticancro al seno; essi, infatti, sono stati sintetizzati per testare la loro attività citotossica sulle linee cellulari BC, per verificare un'attività complessiva per questi complessi d'oro per i sottotipi di BC e delineare una correlazione tra la struttura e l'attività antitumorale.<sup>28</sup>

### 5.4.1 Caratteristiche, proprietà e sintesi

I composti di interesse sono costituiti da azoli, tra cui imidazolo o pirazolo, e tre tipologie di trifenilfosfina. Essi possiedono legami N-Au-P o Cl-Au-P attorno al metallo centrale (Au(I)), differenziandosi per la presenza di gruppi polari protici o aprotici negli azoli e di gruppi fosfina.

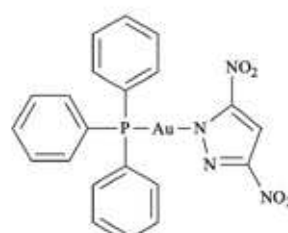
I composti sono caratterizzati da un azolo polare e una trifenilfosfina lipofila, la cui polarità e abilità di formare legami è stata rafforzata dall'introduzione di gruppi idrofili come i gruppi COOH e/o OH.

I complessi in questione sono i seguenti (fig.21):



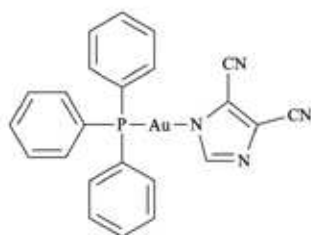
2-COOH-Ph<sub>2</sub>PAuIm(OH)

Figura 21.1-2-COOH-Ph<sub>2</sub>PAuIm(OH)



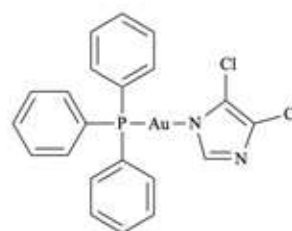
Ph<sub>3</sub>PAuPz(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

Figura 21.2-Ph<sub>3</sub>PAuPz(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>



Ph<sub>3</sub>PAuIm(CN)<sub>2</sub>

Figura 21.3-Ph<sub>3</sub>PAuIm(CN)<sub>2</sub>



Ph<sub>3</sub>PAuIm(Cl)<sub>2</sub>

Figura 21.4-Ph<sub>3</sub>PAuIm(Cl)<sub>2</sub>

Figura 21- Complessi 1-4 azolo/fosfina di oro(I)

### 5.4.2 Sintesi complessi 1-4:<sup>29,30</sup>

#### Complesso 1 [(4-idrossi-metil)imidazolo-1H-oro(I)-(acido 2-benzoico-difenilfosfina)]:

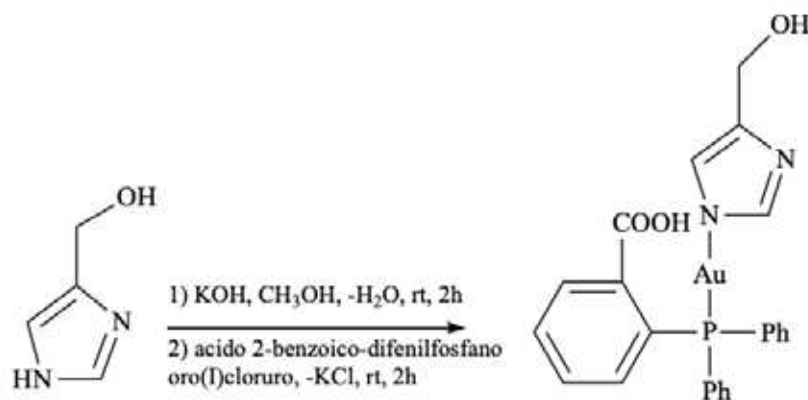


Figura 22- Sintesi 2-COOH-Ph<sub>2</sub>PAuIm(OH)

#### Complesso 2 [(3,5-dinitropirazolo-1H-oro(I)-(trifenilfosfina)]:

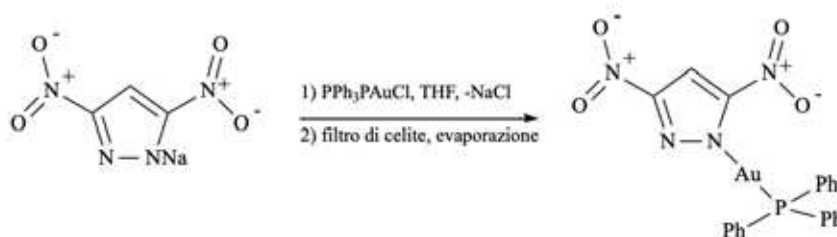


Figura 23- Sintesi Ph<sub>3</sub>PAuPz(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

#### Complesso 3 [(3,5-dicianoimidazolo-1H-oro(I)-(trifenilfosfina)]:

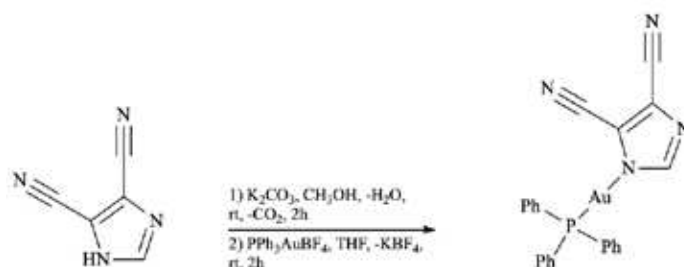


Figura 24- Sintesi Ph<sub>3</sub>PAuIm(CN)<sub>2</sub>

### Complesso 4 [(3,5-dicloroimidazolo-1H-oro(I)-(trifenilfosfina)]:

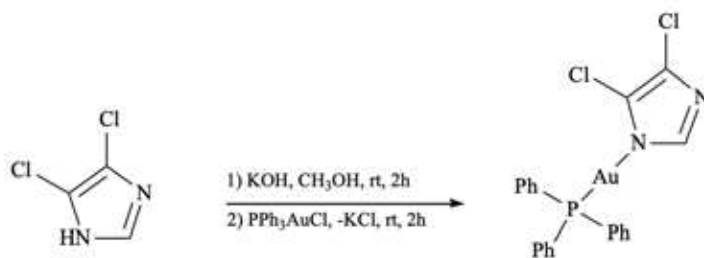


Figura 25- Sintesi  $\text{Ph}_3\text{PAuIm}(\text{Cl})_2$

#### 5.4.3 I complessi e la loro attività

Dall'analisi dei composti precedentemente illustrati si nota come il composto 1 contenga gruppi idrofili come -OH e -COOH rispettivamente nel legante azolico e fosfinico, il composto 2 invece presenta un legante 3,5-nitropirazolato, mentre i composti 5 e 6 presentano una doppia sostituzione sul legante imidazolato, rispettivamente con gruppi -CN e -Cl.

Solo i composti che presentano un ambiente P-Au-N e non esibiscono né l'idrossile né gruppi carbossilici nei leganti sono stati trovati attivi in cellule tumorali SKBR3, A17 e MDA-MB231, ovvero i composti 3 e 4. Quindi, la presenza di gruppi funzionali protici polari ostacola in qualche modo l'attività citotossica. In conseguenza di ciò si può concludere che la presenza di leganti con siti donatori di legame idrogeno nei composti dell'oro(I) introduce in qualche modo un ostacolo per l'attività in vitro dei complessi sintetizzati.

Soffermandosi sul composto 2, purtroppo, nonostante sia risultato essere citotossico e rapidamente attivo, era meno stabile nello stato fisiologico, probabilmente per la presenza di gruppi nitro reattivi.

#### 5.4.4 Meccanismi di azione

Un tassello importante per la discussione è l'analisi dei meccanismi molecolari alla base degli effetti antitumorali dei complessi di interesse.

Innanzitutto, sono stati individuati sia DHFR che TrxR come obiettivi adatti all'approccio multiplo dei leganti nella progettazione di farmaci antitumorali. Si tratta di enzimi coinvolti nella proliferazione cellulare e nella progressione del cancro, utili alla sopravvivenza delle cellule tumorali.

La famiglia di enzimi TrxR rappresenta, come già illustrato (Cap.4.4) un target ottimale per i farmaci antitumorali dell'oro, sulla base della forte affinità dell'atomo d'oro con tiolati/selenoalti, che causa la modifica del residuo accessibile di selenocisteina nel sito attivo di TrxR. Per contro, DHFR non presenta residui di selenocisteina; i complessi in questione però sono in grado di mirare all'enzima diidrofolato redutasi, inibendo la sua attività enzimatica, basandosi sulla competizione reversibile con il substrato in associazione al sito attivo.

I composti 3 e 4, per l'appunto, esercitano un'attività inibitoria multi-mirata sia riguardo TrxR che DHFR. La presenza dello ione oro(I) soft, conferisce selettività verso il residuo di selenocisteina nel sito attivo TrxR, mentre il gruppo fosfano idrofobico e la porzione di azolato

anfipatico possono facilmente inserirsi nella tasca di legame del substrato del DHFR. L'attività specifica del DHFR per le tre linee di cellule tumorali SKBR3, A17 e MDA-MB231 è stata notevole.<sup>31</sup>

Per acquisire ulteriori informazioni circa l'azione dei composti analizzati, si può evidenziare come questi legano fortemente le proteine plasmatiche, o proteina sieriche, quali BSA (albumina sierica bovina) e ATF (apo transferrina) (proteina plasmatica per il trasporto di ioni ferro). In primo luogo, è stata confermata la capacità di BSA di legare complessi dell'oro e fungere da trasportatore; grazie a degli studi più recenti invece è stata presa in considerazione anche ATF per il trasporto dei composti dell'oro, anche se già rappresentava il trasportatore preferito per gli ioni metallici.

L'attività biologica dell'ATF è strettamente legata alle sue interazioni con i recettori della transferrina (tfr) che regolano l'assorbimento cellulare; i TfRs sono sovraregolati nella superficie delle cellule tumorali e quindi possono essere utilizzati come bersaglio selettivo nella progettazione di farmaci antitumorali.

Infine, come già approfondito (Cap.4.4), i composti di azolato/fosfina oro(I) non mostrano alcun forte legame con il DNA.

In conclusione, è possibile affermare che due dei composti dell'oro qui considerati (3 e 4) confermano le loro forti attività antitumorali in vitro per quanto riguarda le cellule BC, sottotipi aggressivi, attraverso meccanismi multitarget: è stata valutata la loro azione attraverso l'inibizione degli enzimi TrxR e DHFR e il loro legame alle proteine trasportatori come BSA e ATF.

## 6. CONCLUSIONI

L'elaborato proposto fornisce una panoramica generale delle principali classi di complessi di oro(I) e oro(III) utilizzati come potenziali farmaci contro il tumore al seno. Sono stati difatti approfonditi i loro principali meccanismi d'azione, con particolare attenzione a nuove strategie volte ad aumentare la selettività dei complessi aurei antiproliferativi verso i loro obiettivi cellulari.

Per lungo tempo gli scienziati hanno fatto affidamento al DNA come bersaglio primario dei farmaci antitumorali a base metallo, fino a che, negli ultimi decenni, i complessi di oro sono stati indicati per mirare a diverse vie metaboliche e bersagli, quali TrxR, mitocondri, proteine, metabolismo del glucosio e topoisomerasi.

Approfondire i possibili farmaci per la cura del tumore al seno risulta di notevole interesse in quanto si tratta del cancro più diffuso in Italia, rappresentando il 30,3% dei tumori che colpiscono le donne, e il 14,6% di tutti i tumori diagnosticati nel paese<sup>32</sup>. Nonostante il considerevole tasso di incidenza, negli ultimi anni la mortalità è in diminuzione, ciò grazie ai nuovi approcci e studi farmacologici e chimici verso nuove molecole ed entità chimiche. La trattazione proposta infatti, illustra ampiamente tre tipologie di complessi di oro, aventi diverso meccanismo di azione, quali AuPhos-19, Trastuzumab e i complessi fosfinici a base di imidazolato di oro(I).

Prestando attenzione al grafico in Figura 26, si osserva che, secondo le indagini e l'approvazione di nuovi farmaci da parte di FDA del 2022, sia NMEs che BLAs si stanno notevolmente sviluppando principalmente in area oncologica; il motivo è legato al fatto che il numero di pazienti che godrebbe del beneficio delle nuove cure sarebbe ampiamente maggiore rispetto ad altre aree terapeutiche.<sup>33</sup> Ciò dimostra l'instancabile e irrefrenabile ricerca.

I recenti studi circa la natura e il meccanismo d'azione dei farmaci a base di oro assicurano quindi il compimento di continui sforzi, con il fine ultimo di sviluppare agenti anticancro sempre più efficaci, che sfruttano diversi meccanismi d'azione per interrompere il meccanismo cellulare delle cellule tumorali, riducendo al minimo le risposte biologiche indesiderate.



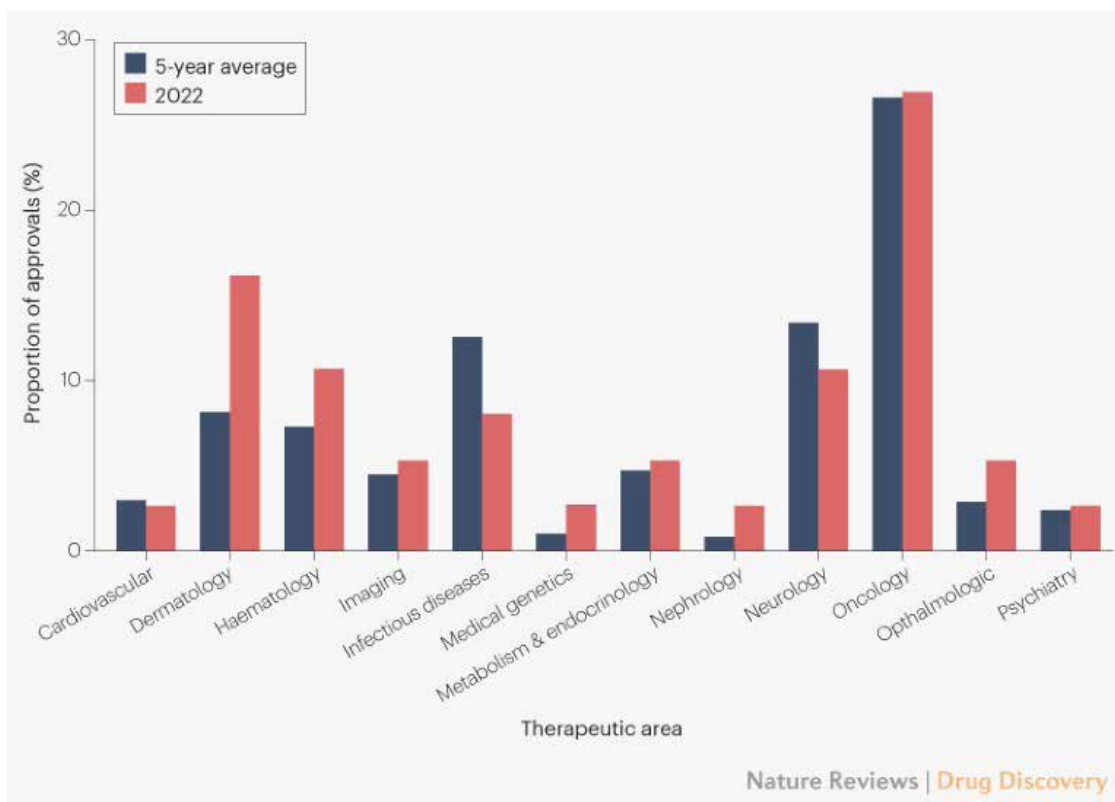


Figura 26- Distribuzione farmaci NMEs e BLAs, negli ultimi anni, per aree terapeutiche (FDA 2022)



# BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- 1 Z. Huaizhi and N. Yuantao, *Gold Bull.*, **2001**, 34, 24–29.
- 2 K.M. Deo et al., *Platinum coordination compounds with potent anticancer activity*, *Coord. Chem. Rev.*, **2018**.
- 3 <https://www.lenntech.it/periodica/elementi/au.htm>; accesso in rete 29/05/2023.
- 4 Weller, M.; Overton, T.; Rourke, J.; Armstrong, F. *La chimica inorganica di Atkins*; Zanichelli editore, Bologna, **2021**, 510-512.
- 5 Crichton, R.R. *Biological Inorganic Chemistry*, Elsevier Science, **2008**, 339-352.
- 6 Yeo, C.I.; Ooi, K.K.; Tiekink, E. R. T., *Gold-Based Medicine: A Paradigm Shift in Anti-Cancer Therapy*; Jalan University, Malaysia, **2018**, 12.
- 7 Yeo, C.I.; Ooi, K.K.; Akim, A.M.; Ang, K.P.; Fairuz, Z.A.; Halim, S.N.B.H.; Ng, S.W.; Seng, H.-L.; Tiekink, E.R.T. *The influence of R substituents in triphenylphosphinegold(I) carbonimidothioates, Ph<sub>3</sub>PAu[SC(OR)=NPh] (R = Me, Et and iPr), upon in vitro cytotoxicity against the HT-29 colon cancer cell line and upon apoptotic pathways*. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 127, 24–38.
- 8 Ooi, K.K.; Ang, K.P.; Abdah, M.A.; Cheah, Y.K.; Yeo, C.I.; Siti Nadiah, A.H.; Seng, H.L.; Tiekink, E.R.T. *Phosphane-gold(I) thiolates, Ph<sub>3</sub>PAu[SC(O-R)=NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Me-4] for R = Me, Et and iPr, induce apoptosis, cell cycle arrest and inhibit cell invasion of HT-29 colon cancer cells through modulation of the nuclear factor  $\kappa$ B activation pathway and ubiquitination*. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 20, 855–873.
- 9 Hickey, J.L.; Ruhayel, R.A.; Barnard, P.J.; Baker, M.V.; Berners Price, S.J.; Filipovska, A. *Mitochondria-targeted chemotherapeutics: The rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols*. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12570–12571.
- 10 Urig, S.; Becker, K. *On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy*. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, 16, 452–462.
- 11 Powis, G.; Kirkpatrick, D.L. *Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy*. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2007**, 7, 392–397.

- 12** Galassi, R.; Burini, A.; Ricci, S.; Pellei, M.; Rigobello, M.P.; Citta, A.; Dolmella, A.; Gandin, V.; Marzano, C. *Synthesis and characterization of azolate gold(I) phosphane complexes as thioredoxin reductase inhibiting antitumor agents*. Dalton Trans. **2012**, 41, 5307–5318.
- 13** Yeo, C.I.; Ooi, K.K.; Tiekink, E. R. T., *Gold-Based Medicine: A Paradigm Shift in Anti-Cancer Therapy*; Jalan University, Malaysia, **2018**, 15.
- 14** Berners-Price, S.J.; Filipovska, A. *Gold compounds as therapeutic agents for human diseases*. Metallomics, **2011**, 3, 863–873.
- 15** Wang, B.; Jiang, H.; Ma, N.; Wang, Y. *Phosphorylated-p38 mitogen activated kinase expression is associated with clinical factors in invasive breast cancer*. Springerplus, **2016**, 5, 934–940.
- 16** S. J. Berners-Price and A. Filipovska, *Metallomics*, **2011**, 3, 863–873.
- 17** Nobili, S.; Mini, E.; Landini, I.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. *Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies*, **2010**, 563–564.
- 18** L. Kou, S. Wei and P. Kou, *Front. Chem.*, **2021**, 9, 733463.
- 19** Bae, S.K.; Gwak, J.; Song, I.S.; Park, H.S.; Oh, S. *Induction of apoptosis in colon cancer cells by novel topoisomerase I inhibitor*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **2011**, 409, 75–81.
- 20** Beretta, G.L.; Perego, P.; Zumino, F. *Targeting topoisomerase I: Molecular mechanisms and cellular determinants of response to topoisomerase I inhibitors*. Biochem. Pharmacol. **2008**, 10, 1243–1256.
- 21** J. Zhang, H. Zou, J. Lei, B. He, X. He, H. H. Y. Sung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, L. Zheng and B. Z. Tang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2020**, 59, 7097–7105.
- 22** Chibuzor, O.; Jong Hyun, K.; Ofori S.; Mertens, R.T.; Gukathasan, S.; Awuah, S.G. *Gold(III)-P-chirogenic complex induces mitochondrial dysfunction in triple-negative breast cancer*, iScience, **2022**.
- 23** Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., and Green, D.R. *Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario*. Cell Death Differ, 13, **2006**, 1396–1402.
- 24** Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., and Kroemer, G. *Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria*. Cell Death Differ. 13, **2006**, 1423–1433.
- 25** Curado, N.; Dewaele-Le Roi, G.; Poty, S.; Lewis, J.S.; Contel, M. *Trastuzumab gold-conjugates: synthetic approach and in vitro evaluation of anticancer activities in breast cancer cell lines*, The Royal Society of Chemistry, **2019**.
- 26** H. Ban, J. Gavriluk and C. F. Barbas III, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 1523.

- 27** H. Ban, M. Nagano, J. Gavriilyuk, W. Hakamata, T. Inokuma and C. F. Barbas III, *Biconjugate Chem.*, **2013**, 24, 520.
- 28** Galassi, R.; Luciani, L.; Gambini, V.; Vincenzetti, S.; Lupidi, G.; Amici, A.; Marchini, C.; Wang, J.; Pucciarelli, S. *Multi-Targeted Anticancer Activity of Imidazolate Phosphane Gold(I) Compounds by Inhibition of DHFR and TrxR in Breast Cancer Cells*, *Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 8, **2021**.
- 29** Galassi, R., Burini, A., Ricci, S., Pellei, M., Rigobello, M. P., Citta, A. *Synthesis and characterization of azolate gold(I) phosphane complexes as thioredoxin reductase inhibiting antitumor agents*, *Dalton Trans.*, 41, **2012**, 5307–5318.
- 30** Galassi, R., Oumarou, C. S., Burini, A., Dolmella, A., Micozzi, D., Vincenzetti, S. *A study on the inhibition of dihydrofolate reductase (DHFR) from Escherichia coli by gold(I) phosphane compounds. X-ray crystal structures of (4,5-dichloro-1H-imidazolate-1-yl)-triphenylphosphane- gold(I) and (4,5-dicyano-1H-imidazolate-1-yl)-triphenylphosphane- gold(I)*, *Dalton Trans.*, 44, **2015**, 3043–3056.
- 31** Raimondi, M. V., Randazzo, O., La Franca, M., Barone, G., Vignoni, E., Rossi, D., *DHFR inhibitors: reading the past for discovering novel anticancer agents*, *Molecules* 24, **2019**, 1140–1159.
- 32** <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-del-seno>), accesso in rete 29/05/2023.
- 33** <https://www.nature.com/articles/d41573-023-00001-3>, accesso in rete 29/05/2023.



# RINGRAZIAMENTI

Vorrei riservare questo spazio finale della mia tesi di laurea ai ringraziamenti verso tutti coloro che hanno contribuito, con il loro instancabile supporto, alla realizzazione della stessa, accompagnandomi e appoggiandomi in questo percorso per me nuovo.

Un sentito ringraziamento va al mio relatore Andrea Biffis che mi ha seguito, con costante disponibilità e gentilezza, in ogni step della realizzazione dell'elaborato, fin dalla scelta dell'argomento. La ringrazio soprattutto per la trasparenza, l'umanità e per la passione che trasmette con l'insegnamento della sua disciplina.

Non posso non ringraziare te, Fede, non solo una sorella, ma anche il mio sostegno, il mio alleato, il mio intrattenimento, il mio pubblico, la mia critica, la mia più grande fan, la mia migliore amica e una compagna di vita per sempre. Avere una sorella gemella è un'esperienza forte, impagabile, insostituibile, ed io ho la fortuna di vivere tutto ciò. La scuola ci ha sempre voluto dividere, sin dall'inizio, ma proprio da quel primo giorno di asilo, a soli tre anni e mezzo, quando mi hai trovato tra migliaia di bambini, ho capito che nessuno poteva mettersi tra di noi; d'altronde quando io e te siamo spalla a spalla, chi ha una chance contro di noi? Insieme abbiamo riso, pianto, ci siamo divertite, abbiamo litigato e subito fatto pace; perché il nostro amore è così, è puro e durevole come l'oro, che resiste a qualsiasi agente esterno e il cui valore accresce con gli anni.

Mamma e papà, senza il vostro supporto, il vostro sostegno, i vostri insegnamenti e le nostre litigate non sarei mai arrivata ad essere chi sono. Grazie per non avermi mai fatto mancare nulla, materialmente, ma soprattutto emotivamente; non mi avete viziato, come molti pensano, ma avete semplicemente fatto dei sacrifici spinti dall'amore. Nonostante i sacrifici potessero essere enormi, li avete affrontati sempre con il sorriso. In voi due vive e cresce l'amore, che mi avete trasmesso non solo verso gli altri, ma anche verso le passioni e i sogni. Spero che questo piccolo traguardo possa rendervi fieri di me, sarò sempre il vostro orso, grazie.

Ai miei nonni Elda, Mirella e Rizieri e tutti gli zii e cugini, che hanno incrociato la loro vita con la mia lasciandomi qualcosa di buono. Grazie per esserci stati, ognuno a modo suo, in questo percorso intenso ed entusiasmante, nel bene e nel male. È impossibile trovare le parole giuste per ringraziarvi, a farlo saranno le emozioni che si mescolano in un bagaglio di affetto sincero e gratitudine per tutti voi.

Ale, il mio compagno di vita da ormai più di cinque anni, il mio migliore amico, il mio consulente, la mia spalla. Quando ho pensato che tutto fosse impossibile, mi hai spinto a credere in me stessa fino in fondo, sempre. Mi fa stare bene sapere che ci sei, anche se qualcosa va male,

perché anche quando sbaglio tu mi guardi con gli stessi occhi. Nonostante le urla, le litigate, le mille paranoie, la parte di te insopportabile e la parte di me instabile, nonostante chi ha voluto mettersi tra di noi, grazie per esserci sempre tra tutta questa gente, perché tu sei tu. E grazie alla tua famiglia, che ormai è diventata un po' anche la mia, in particolar modo a te Nico che mi hai ispirato per la stesura di questa tesi, perché con la tua forza e il tuo coraggio sei uscito a testa alta da un'esperienza più grande di tutti noi.

Giulia, la mia seconda gemella da sempre e l'unica che forse ha capito qualcosa del mio elaborato. Grazie per essere stata la mia compagna di studi, anche se non venivi mai a lezione, il mio braccio destro di pettegolezzi e chiacchierate, gli unici occhi che ho sempre cercato in quell'aula per tutti questi tre anni. Grazie per la tua schiettezza, la tua genuinità e anche per la tua timidezza, che mi fa sembrare logorroica. Ti voglio bene.

Fra, il filo che ci unisce è invisibile, ma noi sappiamo che esiste ed è rigido e stabile. Alle scuole elementari ci siamo odiate, ma in fondo sapevamo già che era amore e odio. Nonostante i diversi screzi e momenti difficili che abbiamo attraversato e nonostante ora non abitiamo più nella stessa città, so benissimo che ci saremo sempre l'una per l'altra, perché sappiamo capirci, ascoltarci ma soprattutto dirci la verità. Un'amicizia come la nostra rimane tale, anche se vissuta da lontano.

Ai miei amici, a chi c'è sempre stato e a coloro che sono ormai più distanti, grazie perché senza di voi sarei stata sui libri perdendomi ciò che la vita ci riserva. Divertirci insieme, goderci il caldo dell'estate e il gelo dell'inverno, ridere delle risate degli altri fino a piangere, passare le serate migliori anche solo stando a parlare per ore ed ore, e mille altri sono i motivi per cui sono appagata e felice di avervi al mio fianco. In primis ringrazio te, Teo, che con la tua calma, generosità ed infinita bontà hai colorato le mie giornate di colori luminosi e caldi. E grazie a te Lapo, siamo andati a convivere un po' troppo presto, ma non avrei desiderato altro che un fratello maggiore premuroso, attento e vero come te.

Infine, tutti si aspetterebbero un ringraziamento verso me stessa, come di consueto, ma siccome la banalità non mi calza a pennello, ci tengo a ringraziare per ultima, ma non per importanza, la Benny bambina, che ha creduto in sé stessa e nei suoi sogni sin da subito. Anche se è stata una strada sempre in salita, ha imparato ad apprezzare sé stessa, perché è importante amarsi prima di riuscire ad amare gli altri. Lei ha creduto in poche cose, ma l'ha fatto fino in fondo. Ha sempre vissuto la sua vita da prima attrice, senza risparmiarsi, limitarsi o farsi fermare da niente e nessuno, perché raggiungere un traguardo, come quello che ha raggiunto, o meglio che ho raggiunto ora, anche se piccolo, è la più grande soddisfazione di una vita intera, un pezzo mancante di un puzzle che non sarà mai completo, ma che rappresenterà la versione migliore di me.