

XVII CORSO DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

**Relazione annuale
IV anno**

**EFFETTI DELL' IMATINIB (GLIVEC®) IN LINEE
CELLULARI DI NEUROBLASTOMA UMANO**

**Dottorando: Deborah Pace
Tutor: prof. Ciro Isidoro**



DISCAFF 
Dipartimento di Scienze Chimiche,
Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche

IL GLIVEC®

COME NASCE

Glivec® è il farmaco schierato in prima linea nella cura della LMC (leucemia mieloide cronica) e nasce, a differenza di molti altri, come “farmaco su misura” per la cura di tale malattia. Infatti, non è stato testato casualmente su cellule neoplastiche per verificarne l'efficacia in seguito a semplici analogie strutturali ma è stato messo a punto, studiato e migliorato di volta in volta con l'unico obiettivo di renderlo un farmaco efficace nei confronti della LMC.

La storia di Glivec® (o Gleevec®, imatinib, STI 571, CGP 57148B) inizia con due ricercatori di Philadelphia: Peter Nowell della University of Pennsylvania School of Medicine, e David Hungerford dell'Institute for Cancer Research i quali furono in grado di identificare una mutazione genetica nei pazienti affetti da LMC nel 1960. I due ricercatori notarono la mancanza di una porzione di DNA in corrispondenza del cromosoma 22 che presto venne identificato come “Cromosoma Philadelphia” (Ph) e riscontrarono tale anomalia in almeno il 95% dei pazienti affetti da LMC. Inizialmente, tale scoperta venne considerata fondamentale ma limitata al campo delle anomalie genetiche relative ad una data tipologia di cancro (T. Tauchi et.al. 1995).

Il successivo passo avanti fu fatto tredici anni più tardi grazie al lavoro di Janet Rowley e di altri ricercatori della University of Chicago i quali capirono che il cromosoma “Philadelphia” derivava dalla traslocazione reciproca del braccio lungo del cromosoma 9 (9q) e di una parte del braccio lungo del cromosoma 22 (22q) t(9;22)(q34;q11). Questa traslocazione portava sia alla formazione di un nuovo cromosoma 22 di dimensioni ridotte (Fig. 1), che, a livello molecolare, alla formazione di un nuovo gene ibrido.

Tale gene derivava dalla fusione di un protooncogene cellulare denominato c-Abl, normalmente sito a livello della banda q34 del cromosoma 9, con le sequenze geniche situate in un ristretto segmento (di circa 5,8 Kb) sul braccio lungo del cromosoma 22 (q11), denominato appunto *Break-Point Cluster Region* (Bcr). Tale denominazione indicherebbe che in questo punto avvengono con maggiore frequenza riarrangiamenti del cromosoma (Rowley, 1973). Per effetto della rottura del segmento Bcr, la posizione 5' del gene Bcr, viene a giustapporsi in corrispondenza delle sequenze di DNA traslocate dell'oncogene c-Abl, creando, alla fine, un gene chimerico Bcr-Abl a livello del cromosoma 22 (Ph).

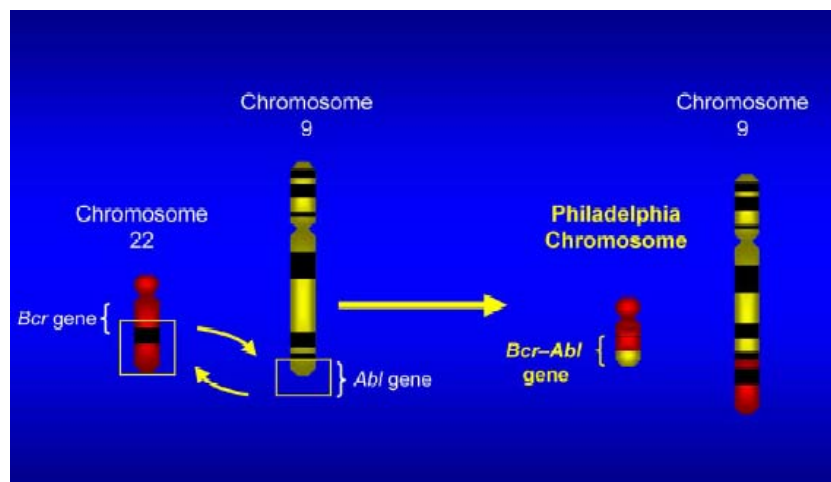


Fig. 1: Schema rappresentante la formazione del cromosoma Philadelphia tramite la traslocazione cromosomica (9;22) (q34:11).

Gli anni '70 furono anni importanti per i numerosi progressi fatti dalla ricerca nel campo della genetica, ma solo nei successivi anni '80 due ricercatori del California Institute of Technology, David Baltimore e Owen N. Witte identificarono la causa principale della LMC.

Certi che la causa alla base dello sviluppo della LMC fosse da attribuire ad un singolo enzima, medici e ricercatori si trovarono di fronte ad una nuova e rara opportunità. Il bersaglio genetico era chiaro e lo sviluppo di un farmaco che potesse bloccare Bcr-Abl poteva procedere razionalmente. Già dai primi anni '90 si iniziò a lavorare alla scoperta di un inibitore di Bcr-Abl grazie ad alcuni ricercatori della Novartis. I due ricercatori a capo di tale impresa, Nicolas Lydon e Alex Matter erano particolarmente ottimisti riguardo ad uno fra i numerosi e potenziali composti in esame, che però non rilevò alcun tipo di attività nei confronti di Bcr-Abl (Drucker B. J. et al 1996).

Il compito di migliorare questo promettente composto venne affidato a quattro scienziati: Juerg Zimmermann, Elisabeth Buchdunger, Helmut Mett e Thomas Meyer. Da subito essi modificarono, aggiunsero ed eliminarono porzioni della molecola in modo da alterare l'attività del composto originale contro Bcr-Abl.

Dopo due anni di accurata sperimentazione, il *team* trasformò finalmente il composto originale (un debole inibitore non specifico) in un inibitore selettivo di Bcr-Abl. Tale sostanza effettivamente bloccava l'enzima responsabile della notevole proliferazione dei globuli bianchi in pazienti affetti da LMC. Questo prezioso lavoro aprì la strada ad una nuova classe di composti con attività selettiva verso Bcr-Abl ed altre chinasi. I risultati di tale straordinaria impresa risalgono al biennio tra il 1993 e il 1995, e furono il punto di partenza di numerosi studi.

Infatti, arricchendo l'enorme impresa sperimentale di Zimmermann, Buchdunger, Mett e Meyer, la Novartis iniziò a collaborare nel 1994 con Brian Druker, un ematologo ed oncologo interessato allo studio delle tirosin chinasi e della LMC. Tale collaborazione aveva come obiettivo quello di definire l'attività di due composti in modelli cellulari di LMC. Da questi studi emerse che uno dei due composti finali a cui erano arrivati, quello che avrebbe in seguito preso il nome di Glivec®, mostrava *in vitro* attività selettiva verso la proteina Bcr-Abl, ma soprattutto che, sia *in vivo* che *in vitro*, bloccava la proliferazione delle cellule esprimenti Bcr-Abl. Inoltre, il composto non dimostrava attività citotossica significativa nei confronti delle cellule normali, questa peculiarità che lo distinse immediatamente dai precedenti trattamenti tradizionali antineoplastici (Carroll M. et al. 1997)

Negli anni successivi, furono condotte ulteriori ricerche supportate da prove cliniche, elaborazioni di sintesi chimiche, studi riguardanti la formulazione del farmaco, farmacocinetica e *screening* tossicologici. Tali studi portarono alla creazione di una classe di farmaci inibitori che nel 1996 venne pubblicata dagli scienziati della Novartis (Buchdunger et al. 1996). Nonostante i risultati delle prime somministrazioni orali e gli studi tossicologici fossero promettenti, ulteriori perfezionamenti erano indispensabili; pertanto lo sviluppo di Glivec® continuò grazie a Lydon messo a capo di un gruppo multidisciplinare di ricercatori che ricevettero nel 2001 il Warren Alpert Foundation Prize per il lavoro svolto su Bcr-Abl (Sawyers et al. 1999).

Il successo che si ottenne in tutto il mondo con il lancio di Glivec®, avvenuto proprio nei primi giorni del 2002, venne accolto anche in Italia con straordinario favore da medici e pazienti.

Questo farmaco segna una svolta radicale nella storia delle terapie oncologiche poiché è il primo farmaco in grado di bloccare selettivamente l'anomalia molecolare che provoca la leucemia mieloide cronica, patologia dagli esiti fino ad allora mortali.

Un prodotto rivoluzionario dunque, in primo luogo per l'eccezionale efficacia e tollerabilità, ma anche per l'estrema "semplicità" d'uso: si assume infatti per via orale e ciò consente ai pazienti di evitare i frequenti ricorsi alle strutture sanitarie, necessari con le terapie precedenti. Il fatto che Glivec® sia una delle maggiori innovazioni farmaceutiche degli ultimi anni è stato confermato, sempre nel 2002, dall'approvazione concessa dall'ente americano FDA (Food and Drugs Administration) e dall'europeo EMEA (European Medicines Agency) anche per il trattamento dei GIST, rari tumori dello stroma gastro-intestinale. Le autorità regolatorie europee hanno esteso l'indicazione del farmaco al trattamento di prima linea per tutti i pazienti affetti da leucemia mieloide cronica (Tauchi e Broxmeyer 1995).

MECCANISMO D'AZIONE E SELETTIVITA' CELLULARE DI GLIVEC®

Le 2-fenilaminopirimidine erano considerate i primi inibitori selettivi delle chinasi, in particolar modo della protein chinasi C (PKC) e dei recettori ad attività tirosin chinasi per Abelson (Abl) e Plateled Derived Growth Factor (PDGF-R) (Zimmermann et al. 1996). Anche in questo caso, come avviene per diversi farmaci in sperimentazione clinica, venne identificato un composto di partenza con attività inibitoria (*in vitro*) nei confronti delle proteine chinasi. L'attività inibitoria delle 2-fenilaminopirimidine verso Abl e PDGF-R venne in seguito migliorata sintetizzando una serie di composti chimicamente simili ed analizzandone la relazione struttura-attività.

Importante fu la sostituzione metilica dell'anello fenil-anilino in posizione 6 che garantì una potente inibizione delle chinasi Abl e PDGF-R e, allo stesso tempo, la perdita di attività nei confronti delle PKC. La classe delle 2-fenilaminopirimidine venne resa ottimale anche dal punto di vista della distribuzione, dell'assorbimento, del metabolismo e dell'eliminazione grazie all'introduzione di un gruppo N-metilpiperazinico (Fig. 2) (Lydon e Druker, 2004).

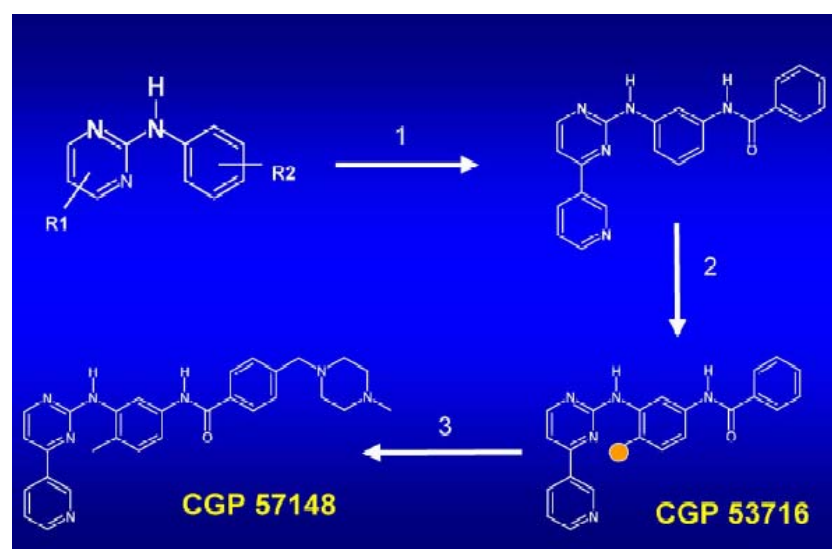


Fig. 2: Ottimizzazione della classe delle 2-fenilaminopirimidine: la modificazione iniziale della classe delle 2-fenilaminopirimidine le rende in grado di competere con l'ATP e di legarsi al sito di legame di quest'ultimo presente sulle proteine ad attività serin-treonin chinasi (1). La sostituzione metilica in posizione 6 sull'anello fenil-anilino determina una potente inibizione delle chinasi Abl e PDGFR ed annulla l'attività verso la famiglia delle PKC (2). Le proprietà ADME (riguardanti l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione) vengono finalmente rese ottimali grazie all'introduzione di un gruppo N-metilpiperazinico(3).

Glivec® è un derivato della 2-fenilaminopirimidina ed è una piccola molecola in grado di antagonizzare l'attività delle protein chinasi fra cui Bcr-Abl. Glivec® agisce in maniera specifica bloccando il sito di legame per l'ATP sulla chinasi Abl. Questo inibisce la capacità di Abl di trasferire gruppi fosfato dall'ATP e di fosforilare i residui di tirosina delle proteine substrato. Ciò impedisce la trasduzione di segnali energetici necessari per la proliferazione e l'induzione di apoptosi cellulare indotta da Abl.

In tal modo la via di trasduzione di uno specifico segnale attivata in modo anormale durante il processo di trasformazione leucemica viene inattivata da Glivec® mentre le normali vie restano inalterate (Manley et al. 2002).

Anche le Abl mutate vengono inibite da Glivec® ma, per la sovrabbondanza delle vie di trasduzione del segnale, tale fenomeno non sembra alterare i normali processi clinici.

Grazie agli studi fatti *in vitro* si è determinata la concentrazione di inibitore (IC₅₀) che porta ad un decremento del 50% della fosforilazione delle tirosine. Oltre ad essere un potente inibitore delle tirosin chinasi Bcr-Abl, Glivec® ha dimostrato di essere in grado di inibire altre due tirosin chinasi: PDGF-R e c-KIT, il recettore per Stem Cell Factor o Steel Factor (Geoffrey e Krystal, 2004).

Una delle sottofamiglie maggiormente studiate, con cui Glivec® è in grado di interagire, è quella dei recettori ad attività tirosin-chinasica di classe III. A tale sottofamiglia appartengono, per esempio, i recettori **PDGF-R**, **VEGF-R** (per il fattore di crescita vasculo-endoteliale VEGF) e **c-Kit** (per SCF, fattore di crescita per le cellule staminali).

TARGET DI GLIVEC® NELLE CELLULE DI LMC

L'incontrollata divisione e la duratura sopravvivenza cellulare sono il segno evidente della presenza di malignità e una delle caratteristiche riscontrate nelle cellule dei pazienti affetti da LMC. Tale malattia è dovuta ad uno specifico difetto cromosomico consistente nella traslocazione dei geni Bcr e Abl fra il cromosoma 22 e il 9. Il gene di fusione Bcr-Abl codifica per una proteina che è una tirosin chinasi costitutivamente attivata in grado di provocare l'abnorme proliferazione dei globuli bianchi del sangue caratteristica della LMC. Le molecole di ATP si legano al sito presente sulla chinasi Bcr-Abl inducendo una continua propagazione del segnale di propagazione cellulare.

Tali segnali coinvolgono complesse vie di attivazione della trascrizione e non tengono conto della regolazione del ciclo cellulare. La cellula Bcr-Abl trasformata è resistente all'apoptosi. Glivec® è stato progettato in modo tale da trovare e legare selettivamente la tasca ATP legante su Bcr-Abl. Legandosi a questo sito attivo, Glivec® interrompe il segnale a valle, provoca il blocco della proliferazione cellulare a cui segue l'apoptosi (Branford et al. 2002).

TARGET DI GLIVEC® NELLE CELLULE DI GIST

Nella maggior parte dei GIST (tumori dello stroma gastro-intestinale), le cellule interstiziali di Cajal, che mediano la peristalsi nel tratto superiore dell'intestino, sono soggette ad una crescita incontrollata dovuta a mutazioni riguardanti un gene codificante un loro recettore transmembrana detto Kit. Sebbene normalmente Kit venga attivato dal suo ligando, stem cell factor, queste mutazioni determinano un segnale citochino-indipendente che induce una crescita cellulare incontrollata e formazione di un tumore lungo tutto il tratto gastro-intestinale. Le molecole di ATP provvedono all'attivazione energetica della proteina Kit aberrante alimentando in

continuazione la propagazione del segnale fino al nucleo. Glivec® entra nella tasca di legame per l'ATP di questo recettore Kit mutato inibendo il segnale alterato ed inducendo così apoptosi nelle cellule di GIST.

Alcune vie nel microambiente tumorale sono particolarmente sensibili all'azione di Glivec® specialmente nel compartimento vascolare. Il tumore sviluppandosi stimola l'angiogenesi ovvero la formazione di nuovi vasi sanguigni grazie alla produzione di fattori di crescita come, per esempio VEGF e PDGF. Quest'ultimo in particolar modo si lega ai recettori per PDGF (α e β) sui periciti determinando così stabilità vascolare ed endoteliale della cellula. Ad ogni modo, questi nuovi vasi che si sono formati troppo rapidamente non sono del tutto integri e ciò porta ad un aumento di pressione del fluido interstiziale (IFP) all'interno dello stroma tumorale. L'aumento di IFP si suppone impedisca la fuoriuscita degli agenti chemioterapici all'interno della massa tumorale in crescita. Provato in studi preclinici, Glivec® ha come bersaglio il recettore per PDGF, impedendo ai periciti di supportare l'angiogenesi. Grazie ai pochissimi nuovi vasi si ha una minor perdita interstiziale. Come supposto, il decremento di IFP all'interno della massa tumorale favorisce un maggior assorbimento di agenti chemioterapici portando all'aumento della morte cellulare (Ando et al, 2005).

BERSAGLI MOLECOLARI

Come si è detto in precedenza, Glivec® agisce in maniera specifica bloccando il sito di legame per l'ATP sulle chinasi inibendo, così, la loro capacità di trasferire gruppi fosfato dall'ATP e di fosforilare i residui di tirosina delle proteine substrato. Ciò impedisce la trasduzione di segnali energetici necessari per la proliferazione e l'induzione di apoptosi cellulare.

In tal modo la via di trasduzione di uno specifico segnale attivata in modo anormale durante il processo di trasformazione leucemica viene inattivata da Glivec® mentre le normali vie restano inalterate.

Glivec® esercita un'importantissima attività inibitoria nei confronti dei recettori ad attività tirosin-chinasica di classe III fra cui il PDGF-R, capostipite di una famiglia contraddistinta da un dominio extracellulare contenente cinque regioni di omologia con le immunoglobuline. Il PDGF è un potente mitogeno per numerosi tipi cellulari, soprattutto di origine mesenchimale ed esercita attraverso il recettore β effetti sul cito-scheletro coinvolti nella generazione del movimento cellulare. Questa sottofamiglia comprende altri due recettori codificati da altrettanti oncogeni. Il prodotto dell'oncogene c-Kit è il recettore per SCF (fattore di crescita per le cellule staminali), conosciuto anche come fattore di Steel. Il recettore è espresso dalle cellule staminali emopoietiche, dai mastociti, dalle cellule germinali e dai melanociti. Alterazioni di tale recettore o del fattore corrispondente, che ne compromettano la funzione, sono noti come responsabili di difetti nella melanogenesi, nell'emopoiesi e di casi di sterilità nell'uomo e nel topo. Tale recettore ed il suo ligando verranno meglio presi in considerazione in seguito. Il recettore VEGF-R (per il fattore di crescita vascolo-endoteliale VEGF) è il prototipo di una sottofamiglia affine a quella dei recettori per il PDGF, caratterizzata dalla presenza di sette regioni extracellulari di omologia con le immunoglobuline. Tale recettore presenta la rimarchevole proprietà di essere espresso in modo strettamente tessuto-specifico nelle cellule endoteliali. L'interazione tra VEGF ed il suo recettore (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1, VEGFR-3/Flt-4) ha come risultato la stimolazione della mitogenesi delle cellule endoteliali e l'aumento della permeabilità vascolare. In seguito a tale legame viene indotta la transautofosforilazione ed attivata una serie di segnali a cascata che

vanno a coinvolgere Src, PLC γ , MAPK, STAT3 e STAT5. VEGF promuove la genesi vascolare embrionale e favorisce la crescita angiogenica grazie all'attivazione di VEGFR-2 sulle cellule endoteliali. L'attivazione di VEGFR-1 può limitare la proliferazione cellulare indotta dall'attivazione di VEGFR-2 e, quindi, limita l'angiogenesi indotta da VEGF (Yancopoulos et al. 2000).

Tra i vari bersagli di Glivec® è di fondamentale importanza la protein chinasi c-Abl espressa dal gene di fusione Bcr-Abl caratterizzante il cromosoma Philadelphia. Glivec® compete con il sito di legame per l'ATP della protein chinasi Bcr-Abl (e Abl) impedendo la fosforilazione delle tirosine proteiche coinvolte a valle della propagazione del segnale da parte di Bcr-Abl.

L'EFFICACIA DI GLIVEC®

In pazienti in fase cronica da LMC si è notato che l' 88% ottiene una buona risposta ematologica (HR) mentre il 49% mostra una risposta citogenetica (CR). La letteratura riguardante LMC sostiene che ci potrebbe essere una correlazione fra il raggiungimento di una risposta citogenetica e il miglioramento della sopravvivenza. HR e CR sono state raggiunte con Glivec® in ciascuna fase della LMC. Nella fase avanzata, grazie a Glivec® si è ottenuto un miglioramento in termini di sopravvivenza cellulare e una diminuzione della progressione tumorale (Druker et al. 1996).

DOSAGGI DI GLIVEC®

Glivec® viene somministrato in capsule da 100 mg. I pazienti in fase cronica da LMC ne assumono 400 mg al giorno mentre a quelli in fase avanzata viene raccomandata una dose iniziale di 600 mg.

La dose aumenta da 400 a 600 mg nei pazienti in fase cronica e da 600 a 800 mg (400 mg due volte al giorno) nei pazienti in fase avanzata o che presentano crisi blastiche che non dipendono dagli effetti collaterali del farmaco o da neutropenie o trombocitopenie dovute alla leucemia, ma ad altre circostanze quali la progressione della malattia, un non soddisfacente HR dopo gli ultimi tre mesi di trattamento, o in seguito ad una perdita di HR (Buchdunger et al. 1996).

EFFETTI COLLATERALI DI GLIVEC®

Glivec® è generalmente ben tollerato. La maggior parte degli effetti collaterali sono di lieve o moderata entità inclusi gli sgradevoli effetti gastrointestinali che vengono minimizzati assumendo il farmaco durante il pasto e con abbondante acqua. In seguito alle diverse somministrazioni fatte si può affermare che gli effetti collaterali più frequenti sono: edema agli arti inferiori, irritazione cutanea e dispepsia. L'incidenza di tali effetti è fortemente aggressiva in meno dell'1% dei casi fatta eccezione per l'irritazione cutanea e la nausea (Schindler et al. 2000).

IL NEUROBLASTOMA

Il nostro interesse è stato volto a capire quale potesse essere il corretto coinvolgimento di Glivec® nei neuroblastomi poiché era già un nostro modello di studio ed inoltre presentava gli stessi bersagli molecolari presenti nelle cellule di leucemia. Il neuroblastoma è una neoplasia del nevrasso a localizzazione extracranica altamente maligna e con elevata capacità metastatizzante che interessa originariamente i tessuti del sistema nervoso periferico. Rappresenta la principale neoplasia maligna solida della prima infanzia essendo responsabile di circa il 15% dei decessi per tumore in età pediatrica.

In alcuni pazienti, soprattutto nei bambini, il tumore può svilupparsi e metastatizzare oppure regredire spontaneamente per differenziamento cellulare (Brodeur et al. 1993), mentre negli adulti in genere il neuroblastoma si differenzia in ganglioneuroma. Allorquando vadano in contro a differenziamento le cellule di neuroblastoma assumono la morfologia tipica del neurone: a livello macroscopico si osserva la presenza del classico pirenoforo e di strutture simil assoniche come risultato di un profondo riarrangiamento molecolare a livello citoscheletrico (Haase et al. 1999). Le cellule di neuroblastoma umane presentano quindi due distinti fenotipi morfologici, uno neuroblastico (N-type), caratterizzato da processi neuritici e fenomeni biochimici tipici neurali, e uno epiteliale (S-type), con caratteristiche biochimiche di cellule di Schwann immature, gliali o melanociti. Un terzo fenotipo intermedio biochimicamente e morfologicamente tra N-type e S-type è indicato come I-type. Le cellule I-type possono essere considerate dei precursori multipotenti delle N-type e S-type, ma i "pathway" che portano a questa "trans-differenziazione" non sono, a tutt'oggi, chiariti (Melino et al. 1997).

In definitiva i neuroblastomi rappresentano un ottimo modello di studio per il differenziamento, un'opportunità unica per analizzare i segnali di maturazione di specifiche linee cellulari ed esaminare come alterazioni del meccanismo di differenziamento svolgano un ruolo fondamentale nella genesi e nello sviluppo tumorale (Israel, 1993). Il neuroblastoma è, con l'esclusione delle neoplasie del cervello, il tumore solido più frequente nei bambini rendendo conto del 8-10% di quelli tipici dell'infanzia. Studi epidemiologici mostrano come questo colpisca con incidenza maggiore il sesso femminile e i bambini di razza bianca (Voute et al. 1984).

La diagnosi avviene mediamente intorno ai 22 mesi ed alcuni studi mostrano la presenza di due picchi d'incidenza, uno antecedente il primo anno d'età ed un secondo tra i due e i quattro anni. Il riscontro diagnostico entro l'anno di vita è associato ad una buona probabilità di sopravvivenza per regressione della forma tumorale; in età più avanzata si evidenzia invece un'evoluzione a ganglioneuroma associata ad una prognosi meno favorevole.

I fattori predisponenti l'insorgenza di questa neoplasia sono tanto ambientali quanto ereditari. Una correlazione tra la comparsa del neuroblastoma ed esposizione a tossici ambientali non è stata ancora definita, ma alcuni studi suggeriscono una connessione marcata tra esposizione prenatale a idantoina, fenobarbitale e alcool ed il verificarsi della patologia neoplastica (Allen et al. 1980).

A tutt'oggi, non è stata identificata una sindrome genetica o un'anomalia congenita che possa essere associata alla predisposizione per il neuroblastoma, anche se il 22% dei bambini affetti da tale patologia sembra avere una predisposizione genetica di tipo autosomico dominante (questo vuol dire che è sufficiente la presenza del difetto in uno dei genitori perché sia trasmesso al figlio). Un'altra ipotesi "genetica" per l'insorgenza del neuroblastoma in bambini è legata ad un evento "mutazionale" intercorrente in cellule della linea germinale.

La teoria più accreditata per la forma tumorale in cui non è riscontrabile una base ereditaria è quella per cui la trasformazione neoplastica sia il risultato di due mutazioni post-zigotiche in una singola cellula oppure di una prezigotica seguita da una seconda post-zigotica (Brodeur et al. 1993). Mediante l'analisi del cariotipo, infatti, sono state evidenziate numerose anomalie: la principale è la delezione del braccio corto del cromosoma 1 che, associata all'amplificazione dell'oncogene myc, sul medesimo cromosoma, porta alla forma tumorale più maligna.

Risultati

Come si è detto in precedenza, Glivec® si è rivelato, in studi sia *in vitro* che *in vivo*, un ottimo antitumorale nei confronti della leucemia mieloide cronica.

Con i nostri studi abbiamo cercato di verificare se questa spiccata attività antineoplastica di Glivec® nei confronti di cellule di LMC fosse riscontrabile anche in un'altra neoplasia: il neuroblastoma, una patologia alla quale è imputabile il 15% dei decessi in età pediatrica.

Il primo obiettivo è stato quello di valutare su una linea di neuroblastoma umano, SK-N-BE, in condizioni basali, la vitalità cellulare dopo trattamento cronico con concentrazioni crescenti di Glivec®, comprese tra 500 nM e 30 µM. Parallelamente abbiamo voluto evidenziare i possibili effetti di un'esposizione di Glivec® in cellule sottoposte a differenziamento ottenuto mediante trattamento cronico (10 gg.) con acido retinoico (RA 10 µM), aggiunto quotidianamente al mezzo di coltura.

Un primo screening, è stato effettuato mediante il saggio dell'MTT che ha permesso di valutare l'efficacia e la potenza di Glivec® come agente antiproliferativo. Dal grafico si evidenzia che, nelle cellule della linea SK-N-BE non differenziata, si ha una significativa riduzione del numero di cellule tempo- e dose-dipendente, con un tipico andamento della curva dose-risposta di tipo sigmoidale. Il valore di IC₅₀ rilevato è di circa 3 µM (Fig. 3).

In maniera sorprendente, le cellule differenziate con RA e solo successivamente incubate per 24 ore con Glivec® mostrano un'assoluta resistenza ai suoi effetti antiproliferativi (rilevante probabilmente ai fini di potenziali applicazioni terapeutiche), particolarmente evidente a una concentrazione di Glivec® 10 µM (figura 4).

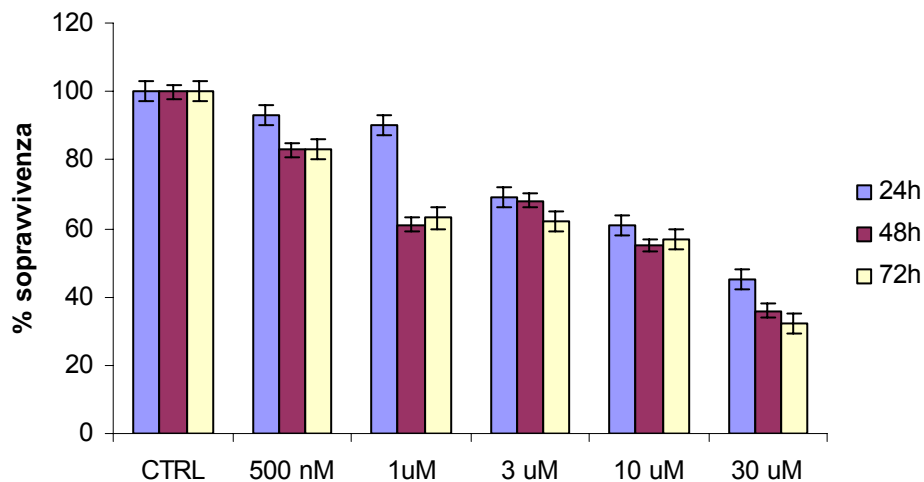


Fig. 3. Cellule SK-N-BE non differenziate incubate per tempi diversi (24-72 h) con Glivec® alle diverse concentrazioni indicate in legenda (s.e.m.<4%). I dati si riferiscono a cinque esperimenti condotti in triplicato.

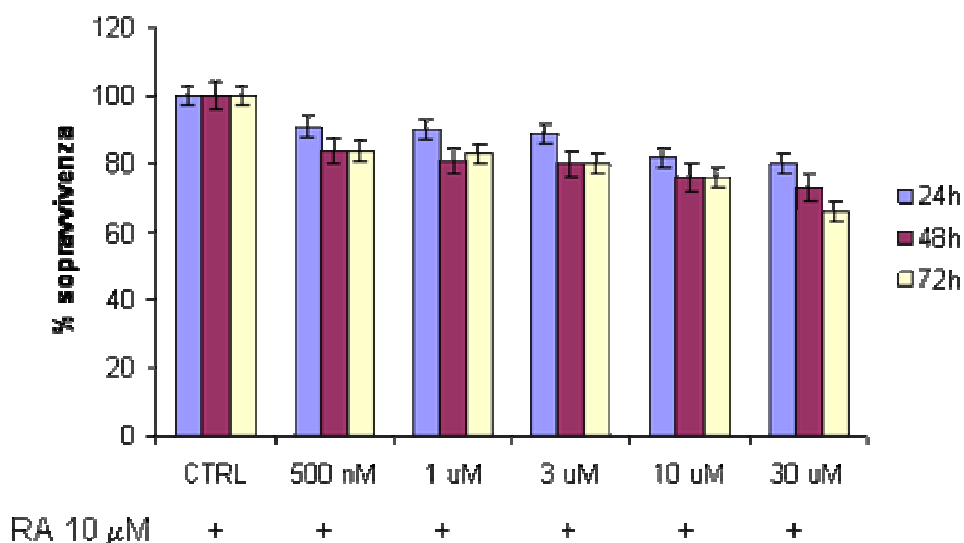


Fig. 4. Le cellule SK-N-BE sono state trattate per 10 giorni con 10 μ M acido retinoico e solo successivamente incubate con Glivec® per tempi diversi (24-72h) (s.e.m.<4%). I dati si riferiscono a cinque esperimenti condotti in triplicato

Dai due grafici si evidenzia che, nelle cellule non differenziate, si ha una riduzione significativa del numero di cellule trattate con Glivec® già a 1-3 μ M. Il differenziamento ottenuto con somministrazione cronica di acido retinoico è risultato in grado di ridurre la potenza e l'efficacia di Glivec® nell'inibire la proliferazione delle cellule di neuroblastoma.

Al fine di meglio caratterizzare l'effetto del Glivec® sulle cellule SK-N-BE è stato condotto un ulteriore test di vitalità, il test di esclusione del Tripan blue scegliendo come tempo di incubazione le 24 ore (risultato adeguatamente descrittivo in test precedenti su cellule non differenziate) (fig. 5).

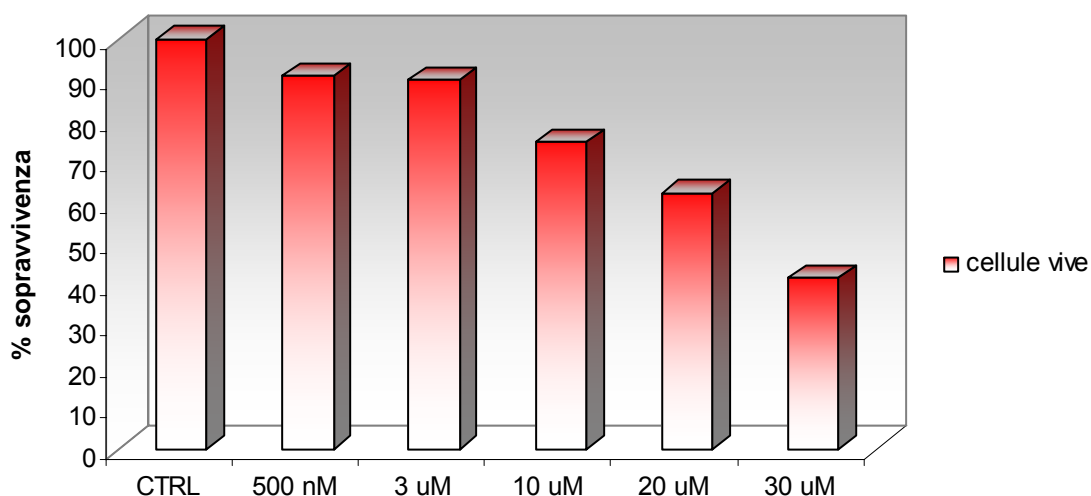


Fig. 5 . Cellule SK-N-BE non differenziate incubate per 24 ore con Glivec® alle concentrazioni indicate in tabella (s.e.m.<4%). I dati si riferiscono a cinque esperimenti condotti in triplicato.

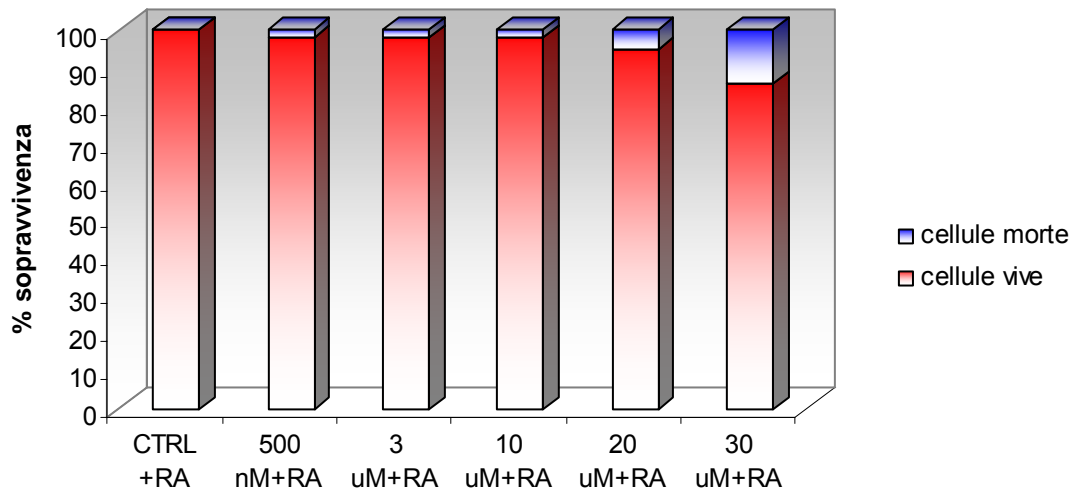


Fig. 6. Cellule SK-N-BE sono state trattate per 10 giorni con 10 µM acido retinoico e solo successivamente incubate Glivec® alle concentrazioni indicate in tabella (s.e.m.<4%). I dati si riferiscono a cinque esperimenti condotti in triplicato.

Anche in questo caso abbiamo riscontrato una diminuzione del numero di cellule vitali fino ad un massimo del $55\% \pm 2$, rispetto al controllo, alla concentrazione di 30 µM (fig. 5). In questo caso, non erano però presenti, se non alle concentrazioni più elevate (20-30 µM), cellule morte o detriti cellulari, ad indicare che, probabilmente, la riduzione del numero di cellule, almeno alle più basse concentrazioni, è da ascrivere più ad un effetto antiproliferativo che ad un'attività citotossica. Nella linea differenziata, viceversa, il numero di cellule rimaneva invariato come si può facilmente rilevare nel grafico (fig. 6), e la quantità di cellule morte risultava poco significativa se non alle più alte concentrazioni, dove però non superava il 15-20%. Anche la semplice analisi morfologica, effettuata utilizzando un microscopio a contrasto di fase, avvalorerebbe l'ipotesi di un'attività antiproliferativa e non solo apoptotica (fig. 7) confermata, inoltre utilizzando il DAPI, un colorante che intercala il DNA ed evidenzia alcune caratteristiche fondamentali del processo apoptotico, che non sono presenti nei nostri trattati (fig.8).

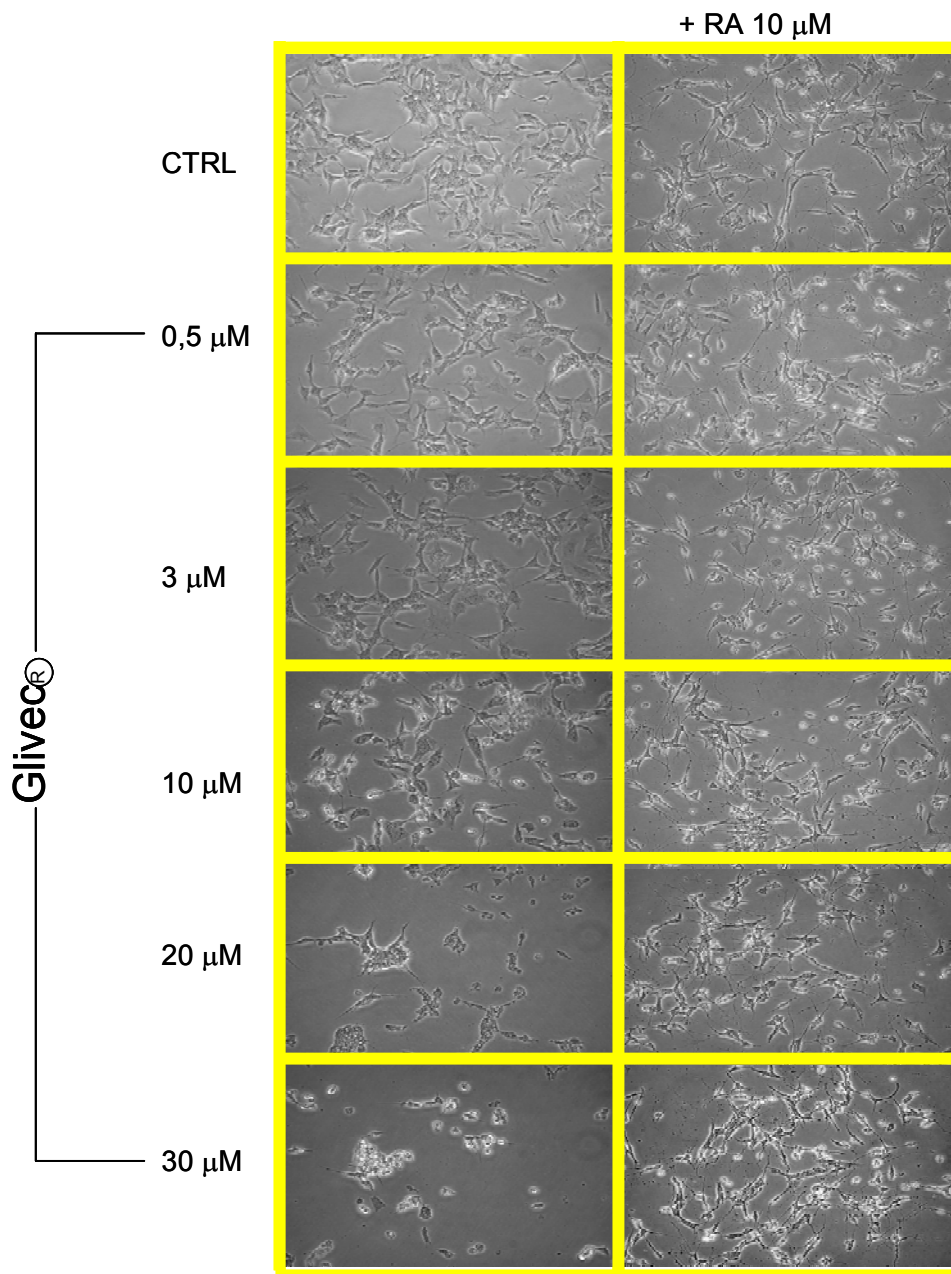


Fig. 7. Valutazione morfologica di cellule SK-N-BE.

Ctrl. Aspetto tipico delle cellule in normali condizioni di coltura. Le foto sottostanti, nella colonna di sinistra, mostrano la morfologia di cellule trattate con concentrazioni crescenti di Glivec® per 24h, mentre nella fila a destra, le cellule sono state fotografate dopo 10 giorni di differenziamento e successivamente trattate con Glivec®, per 24h.

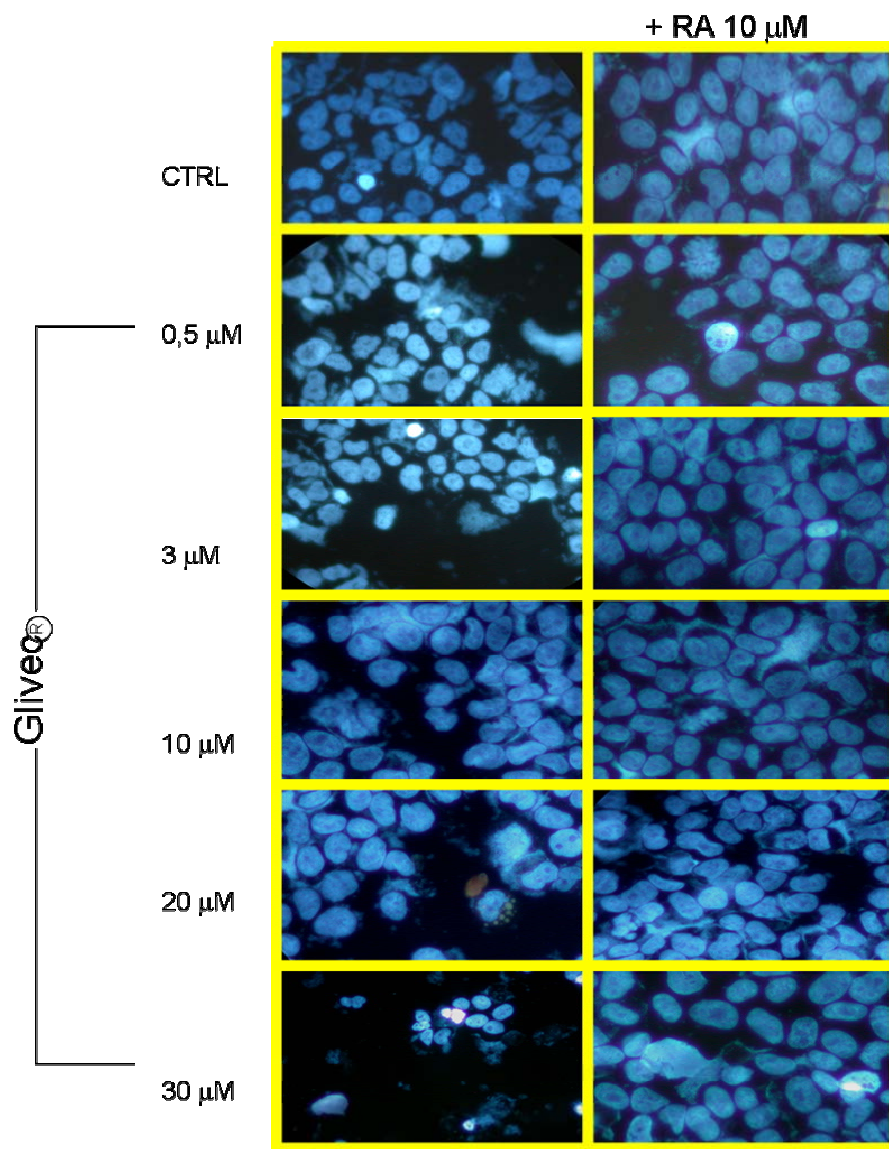


Fig. 8. Analisi morfologica con DAPI avvalendoci di un microscopio a fluorescenza e utilizzando un ingrandimento 60X. Come si può notare non sono presenti né addensamenti di cromatina o formazioni di corpi apoptotici significativi, ma si è evidente la netta inferiorità del numero di cellule presenti nei trattamenti con Glivec® nelle cellule non differenziate (colonna di sinistra), mentre nelle cellule differenziate il numero rimane invariato (colonna di destra).

Per una ulteriore conferma del blocco della crescita cellulare esercitato da Glivec® nelle nostre condizioni sperimentali, abbiamo analizzato, al citofluorimetro, il ciclo cellulare di cellule SK-N-BE non differenziate e differenziate (10 giorni con RA) incubate con concentrazioni crescenti di Glivec® (0,5-30 μ M) per 24 ore (fig. 9) ed il cui DNA fosse stato marcato con il colorante fluorescente propidio ioduro.

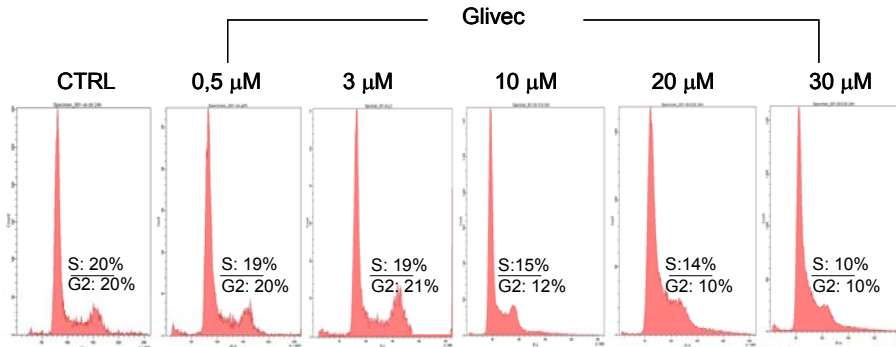


Fig. 9. Analisi citofluorimetrica di cellule SK-N-BE non differenziate in condizioni basali (CTRL) e dopo trattamento per 24h con Glivec®.

Dall'analisi della distribuzione cellulare emerge che, in assenza di differenziamento e trattamento con Glivec® (CTRL), è presente un primo picco molto alto e affusolato che corrisponde alle cellule in fase G1 (20%); il secondo picco, G2 (20%), corrisponde a cellule in attiva duplicazione a corredo tetraploide. Gli altri cinque pannelli rappresentano le variazioni del ciclo cellulare in cellule trattate con Glivec®: si noti la significativa riduzione del picco G2 direttamente proporzionale alla concentrazione di Glivec® utilizzata con diminuzione della fase S (10% con la concentrazione 30 μ M).

Come atteso, osservazioni analoghe condotte su cellule SK-N-BE differenziate con RA e successivamente incubate con Glivec® non palesano differenze significative tra le cellule di controllo (CTRL) e quelle trattate con concentrazioni crescenti di Glivec® (fig. 10).

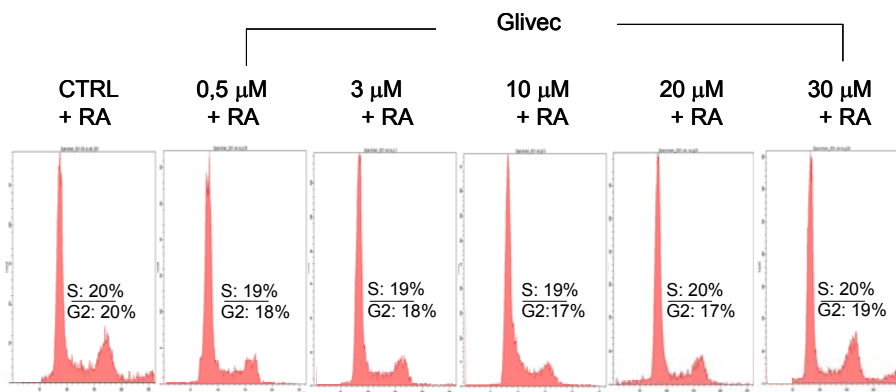


Fig. 10. Analisi al citofluorimetro di cellule SK-N-BE differenziate con RA e dopo trattamenti in acuto con Glivec®.

Nell'intento di valutare se l'esposizione delle cellule a Glivec® potesse influenzare l'espressione di proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare abbiamo esaminato, tramite tecnica di immunoblotting, l'espressione di AKT, p-AKT e p-Rb. Tali studi sono stati condotti parallelamente in cellule della linea SK-N-BE non differenziate, che in cellule differenziate mediante RA e successivamente incubate con Glivec®. Abbiamo potuto mettere in evidenza che nelle cellule non differenziate i livelli di AKT, proteina coinvolta nell'equilibrio tra sopravvivenza, apoptosi e proliferazione cellulare, diminuivano sensibilmente in modo direttamente proporzionale alle concentrazioni di Glivec® utilizzate (0,5-30 μ M); mentre nelle cellule differenziate non si è osservata alcuna modificazione nella sua espressione (fig. 11).

Anche per quel che riguarda la forma fosforilata di AKT (p-AKT), soltanto nelle cellule non differenziate, i livelli di espressione proteica sono risultati influenzati dal trattamento con Glivec®, in maniera dose-dipendente con una progressiva riduzione del suo segnale inversamente proporzionale alla concentrazione di Glivec® utilizzata. Ciò può indicare che l'effetto di Glivec® sulla vitalità cellulare possa essere in parte mediato da AKT. Al fine poi di trovare conferma ai dati di citofluorimetria abbiamo valutato il grado di fosforilazione della proteina Rb, importante regolatore nel controllo della progressione cellulare dalla fase G1 a quella S. In condizioni di arresto in G1, infatti, la proteina Rb sarebbe defosforilata e quindi capace di sequestrare il fattore E2F impedendo la trascrizione di proteine fondamentali al passaggio in fase S.

In effetti, dall'analisi con Western blotting, i livelli di espressione di p-Rb sono risultati inibiti dal trattamento con Glivec® in maniera concentrazione-dipendente nelle cellule non differenziate, mentre dopo differenziamento si ha una lieve diminuzione nella fosforilazione della proteina solo alla concentrazione più elevata di Glivec® (30 μ M) (fig. 11), così come i livelli di pAKT, pCD1, CD1, ma di particolare importanza risulta essere la diminuzione anche della proteina AKT. Data la sua rilevanza nei fenomeni di morte cellulare nonché la comprovata sensibilità al Glivec®, abbiamo valutato l'espressione della chinasi Abl in cellule non trattate e in quelle differenziate. Tale approccio è stato ritenuto coerente con la necessità di individuare il target molecolare la cui assenza potesse spiegare la resistenza al Glivec® espressa dalle cellule differenziate. Come si può vedere in figura 11 i livelli di Abl non hanno subito nessun tipo di modificazione né dopo trattamento con Glivec® né, soprattutto, dopo differenziamento e successiva incubazione col farmaco, escludendo un significativo coinvolgimento di questa chinasi.

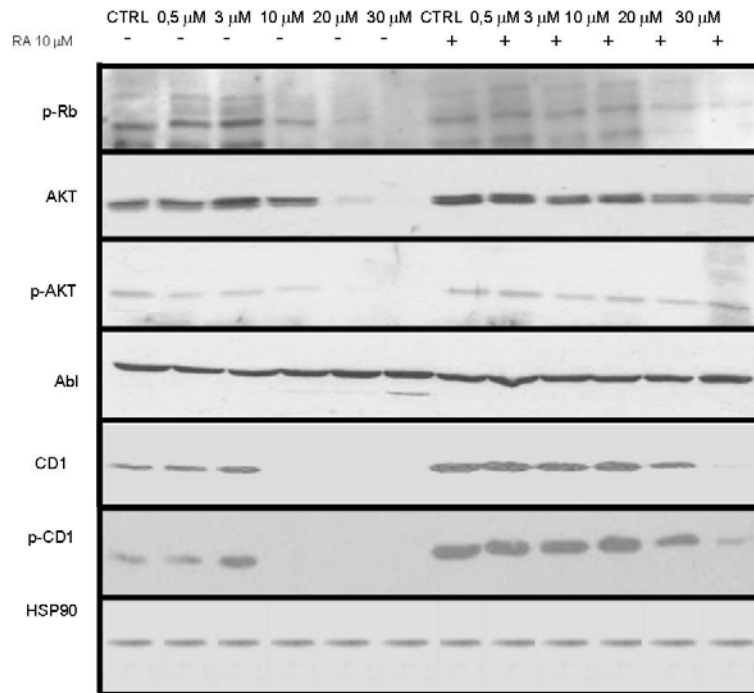


Fig. 11. Analisi per immunoblotting di p-Rb, AKT p-AKT, Abl, Ciclina D1 e fosfo ciclica D1. Le condizioni sono così rappresentate: controllo (1), a seguire le concentrazioni crescenti di Glivec® 0,5-3-10-20-30 μ M (2-6), e le cellule differenziate (controllo-6) e i relativi trattati con le stesse concentrazioni (0,5-30 μ M) (8-12). Abbiamo utilizzato l'anticorpo anti-HSP 90 al fine di verificare l'equal loading.

Il passo successivo è stato quello di valutare mediante RT-PCR i livelli totali di mRNA dei vari ligandi target di Glivec®. Anche in questa serie di esperimenti abbiamo confrontato le cellule SK-N-BE non differenziate con quelle differenziate con RA. Inizialmente abbiamo valutato la presenza e l'eventuale modulazione dell'intensità del segnale di c-Kit, SCF, PDGFR β , PDGF β , utilizzando come standard di confronto l'actina.

Innanzitutto, in condizioni basali, si sono potuto evidenziare alcune differenze nei livelli dei suddetti mRNA tra cellule non differenziate e cellule differenziate (fig. 12).

In particolare il sistema ligando-recettore SCF/c-kit ha dimostrato variazioni significative. In condizioni basali risulta evidente la presenza dell'mRNA relativo a SCF, che scompare, invece, dopo trattamento con RA. Il segnale relativo a c-kit, al contrario, appare di lieve intensità in cellule non differenziate, per poi aumentare in maniera evidente in seguito a trattamento con acido retinoico.

Nel caso del sistema PDGF/PDGFR β , invece, non è stato possibile osservare una variazione significativa dei livelli di mRNA del recettore confrontando cellule in condizioni basali e dopo differenziamento farmacologico con RA per 10 giorni.

Il trattamento di queste cellule con concentrazioni crescenti di Glivec® ha poi determinato modificazioni particolarmente interessanti. Come si può vedere, infatti, nella figura 12, i livelli di mRNA di SCF diminuivano drasticamente rispetto al controllo nelle cellule non differenziate, mentre nelle differenziate si è osservato il fenomeno opposto, cioè cellule con una

espressione molto bassa di SCF che aumenta in modo dose-dipendente dopo trattamento con Glivec®. Quanto agli effetti sulla trascrizione di c-kit nelle due condizioni il trattamento con Glivec® non era in grado di modularne l'espressione. Infine, l'altro potenziale bersaglio di Glivec® il recettore PDGFR β sembrerebbe andare incontro ad una "down-regulation" nelle cellule non differenziate, mentre nelle cellule differenziate i livelli basali, già particolarmente bassi, rimanevano invariati dopo trattamento con Glivec® (fig.12).

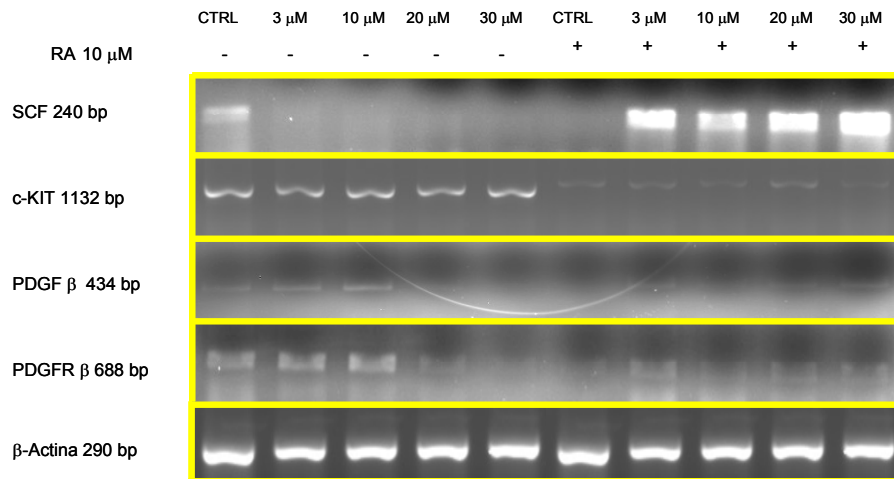


Fig. 12. Valutazione tramite RT-PCR dei livelli totali di mRNA su cellule non differenziate e differenziate trattate con Glivec®.

Avendo riscontrato, tramite l'analisi di western-blotting, una diminuzione, non solo dei livelli di fosforilazione di AKT, ma anche dei livelli della proteina ci siamo chiesti se anche l' mRNA potesse subire delle modificazioni. Come si può vedere dalla figura 13 i livelli di mRNA dei campioni trattati solo con Glivec® 20 μ M sono decisamente inferiori rispetto al controllo in tutte e tre le isoforme di AKT; mentre nei campioni differenziati con acido retinico e solo successivamente trattati con Glivec® 20 μ M non c'è alcuna differenza tra controllo e trattato.

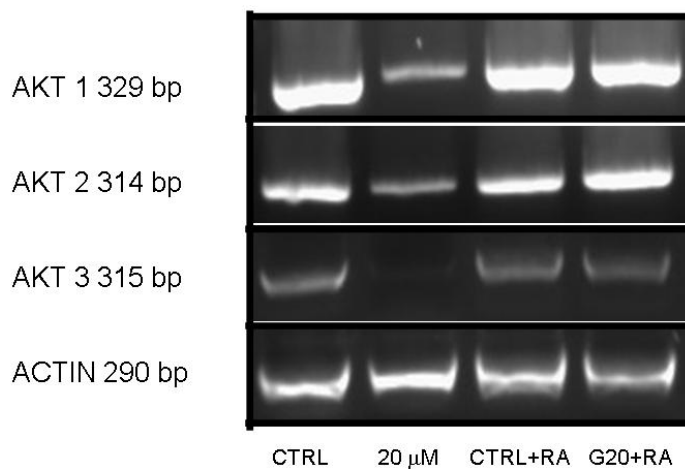


Fig. 13 Valutazione tramite RT-PCR dei livelli totali di mRNA su cellule non differenziate e differenziate trattate con Glivec®.

CONCLUSIONI

In questo progetto abbiamo, voluto caratterizzare l'attività antitumorale di Glivec® in relazione al fenomeno dell'apoptosi data la sua comprovata efficacia, almeno nella cura della LMC nel discriminare tra o cellule sane o cellule malate. Da ciò deriva, infatti, la bassa incidenza di effetti collaterali della terapia con Glivec® dando al paziente, a differenza dei normali trattamenti antineoplastici, la possibilità di condurre una vita di buona qualità.

Valutando, dunque, la vitalità di linee cellulari di neuroblastoma non differenziate, possiamo concludere che:

- Glivec® si propone come farmaco potenzialmente utile nella terapia del neuroblastoma suggerendo la possibilità che questi possa funzionare da inibitore del ciclo cellulare .
- Il supporto trofico del sistema scf/c-kit sembrerebbe irrilevante nelle cellule di neuroblastoma sottoposte a differenziamento con RA;
- Al contrario il sistema PDGF β /PDGFR β potrebbe rappresentare il target molecolare alla base degli effetti anti-proliferativi di Glivec®
- L'effetto antiproliferativo di glivec probabilmente dipende da una regolazione di AKT

BIBLIOGRAFIA

Allen R.W., Ogden B., Bentley F.L., Jung A.L. Fetal hydantoin syndrome, neuroblastoma, hemorrhagic disease in a neonate. *JAMA* 1980; 204-1464.

Ando Y., Tsunoda T., Beck Y., Takayama T., Tahara H. Effect of imatinib (STI571) on metastatic gastrointestinal stromal tumors: report of a case. *Biomed. Life Sci.* 2005; 817(1):89-96.

Branford S., Rudzki Z., Walsh S., Grigg A., Arthur C., Taylor K. High frequency of point mutation clustered within the adenosine triphosphate-binding region of Bcr-Abl in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemias who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 2002; 99:3472-3475.

Brodeur G.M., Pritchard J., Berthold F., Carisen N.L., Castel V., Castelberry R.P., De Bernardi B., Evans A.E., Favrot M., Hedborg F. et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J. Clin. Oncol.* 1993; 11(8):1466-1477.

Buchdunger E., Zimmermann J., Mett H., Meyer T., Muller M., Druker B.J. Inhibition of the Abl protein-tyrosine Kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996; 56:100-104

Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG, Druker BJ CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood.* 1997 Dec 15;90(12):4947-52

Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G.M., Fanning S. Efficacy of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl-positive cells. *Nat. Med.* 1996; 2:561-566.

Haase G.M., Perez C., Atkinson J.B. Current aspects of biology, risk assessment, and treatment of neuroblastoma. *Semin. Surg. Oncol.* 1999; 16:91-104.

Israel M.A. Disordered differentiation as a target for novel approaches to the treatment of neuroblastoma. *Cancer* 1993; 71(10 Suppl.):3310-3313.

Lydon N.B., Druker B.J. Lessons learned from the development of imatinib. *Leuk. Res.* 2004; 28(1):S29-38.

Melino G., Thiele C.J., Knight R.A., Piacentini M. Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. *J. Neurooncol.* 1997; 31:65-83.

Rowley J.D. Chromosomal patterns in myelocytic leukemia. *N. ENGL. J. MED.* 1973; 289:220-221.

Sawyers C.L. Chronic Myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340:1330-1340.

Schindler T., Bornmann W., Pellicena P., Miller W.T., Clarkson B., Kuriyan J. Structural mechanism for STI571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000; 289:1938-1942.

Tauchi T., Broxmeyer H.E. Bcr/Abl signal transduction. *Int. J. Hematol.* 1995; 61:105-112.

Voute P.A. Neuroblastoma. In: Sutton WW, Fernbach DJ, Vietti TJ (eds). *Clinical Pediatric Oncology*, Mosby, St.Louis, 1984, p.559.

Yancopoulos G.D. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407:242-248.

ATTIVITA' FORMATIVA

(Anno 2004-2005)

SEMINARI

25 Novembre 2004 REPERTAXIN, UN NUOVO INIBITORE DI IL-8: RISULTATI PRECLINICI E IDENTIFICAZIONE DEL MECCANISMO D'AZIONE

Dr. Riccardo Bertini (Centro Ricerche Dompé, L'Aquila)

11 Marzo 2005 PROTEOMICA DELL'EPITELIO INTESTINALE

Prof.ssa Margherita Ruoppolo (Dip.di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II")

21 Marzo 2005 SCLEROSI MULTIPLA: RICERCA DI GENI DI SUSCETTIBILITA' NELLA POPOLAZIONE FINLANDESE

Dott.ssa Rosanna Asselta (Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano)

23 Marzo 2005 LE CELLULE DENDRITICHE, UN GIOCATORE CHIAVE NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA: QUALI E QUANTI TIPI?

Dott.ssa Stefania Nicola (Dip. Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro")

6 Aprile 2005 TOWARDS REGULATION OF GENE EXPRESSION BY CHROMATIN MODIFICATION: SOME BIOMEDICAL MODEL.

Prof. Gerardo Lopez-Rodas (Dipartimento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de Valencia)

30 Maggio 2005 IL DOLORE ARTICOLARE: UN PROBLEMA CLINICO O BIOCHIMICO?

Prof. Giampiero Pescarmona (Dip. Genetic, Biologia e Biochimica, Università di Torino)

1 Giugno 2005 GENI E TRAPIANTI

Prof. Antonio Amoroso (Università di Torino)

8 Giugno 2005 PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA: ASPETTI MEDICI, BIOLOGICI E LEGALI

Prof. Torre (Procreazione assistita: aspetti psicologici)

Dott.ssa Fortina (Fecondazione medicalmente assistita: aspetti tecnici)

Prof. Somigliano (Diagnosi genetica pre-impianto)

Prof. Pelissero (Il difficile equilibrio tra procreazione medicalmente assistita e diritti del concepito)

Prof. Prat (Cellule staminali: stato dell'arte)

17 Giugno 2005 LA TOSSINA DELLA PERTOSSE ED IL SUO B-OLIGOMERO: NUOVI FARMACI IMMUNOSTIMOLANTI E ANTI-HIV

Guido Poli (DIBIT, Istituto San Raffaele, Milano)

24 Giugno 2005 MOLECULAR MECHANISMS OF PARKINSON'S DISEASE

Prof. Stefano Gustincich (SISSA di Trieste)

12 Settembre 2005 CARATTERISTICHE E POTENZIALITA' DELLE CELLULE ISOLATE DALLE MEMBRANE FETALI UMANE: AMNION E CORION

Ornella Parolini (centro di Ricerche E. Menni, Brescia)

13 Settembre 2005 FUNCTIONS OF RIBOSOMAL PROTEIN S19: IMPLICATIONS FOR DIAMOND BLACKFAN ANEMIA

Steven R. Ellis (Dept of Biochemistry and Molecular Biology, University of Louisville)

20 Settembre 2005 REGOLAZIONE DELL'APOPTOSI DA PARTE DI GLUCOCORTICOIDI AD ANNESSINA-1

Prof. Luca Parente (Ordinario di Farmacologia, Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno)

SEMINARI SEGUITI PRESSO IL DISCAFF

13 Settembre 2004 CHEMISTRY AND CHEMICAL BIOLOGY OF NEW GENERATION TAXANE ANTICANCER AGENTS

Prof. Iwao Ojima (University of New York at Stony Brook, Stony Brook, USA),

27 Settembre 2004 TRAFFICO INTRA- ED EXTRA-CELLULARE DI NUCLEOTIDI-SEGNALE ATTIVI NELLA REGOLAZIONE DEL CALCIO CELLULARE

Prof. Antonio De Flora (Università degli Studi di Genova, Dip. di Medicina Sperimentale)

29 Ottobre 2004 DO THE GENES DETERMINE OUR SENSE OF TASTE?

Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof (German Institute of Human Nutrition, Dept. Molecular Genetics, Postdam, Germany),

02 Febbraio 2005 SIMILARITÀ DI SEQUENZE E DEFINIZIONE DI PEPTIDI IMMUNOGENI

Prof. Darja Kanduc (Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Bari, Facoltà di Scienze MM.FF.NN)

08 Febbraio 2005 PSYCHIATRIC PHARMACOGENETICS

Prof. Marja-Liisa Dahl (Prof. of Clinical Pharmacology, Akademiska Sjukhuset, Dept. Clinical Pharmacology, University of Uppsala, Sweden),

09 Febbraio 2005 PHARMACOGENETICS AND DRUG INTERACTIONS

Prof. Marja-Liisa Dahl (Prof. of Clinical Pharmacology, Akademiska Sjukhuset, Dept. Clinical Pharmacology, University of Uppsala, Sweden)

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI

International Conference Role of pharmacogenetics in rational development and personalization of drug treatment, Pisa, Italia, 28-29 ottobre 2004

3rd Molecular strategies for understanding neurological and psychiatric disorder, Novara, Italia 19-20 maggio. 2005

32° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Napoli, Italia, 1-4 giugno 2005

PUBBLICAZIONI

Lysosomal proteases as potential targets for the induction of apoptotic cell death in human neuroblastomas.

Castino R.¹, **Pace D.**¹, Démoz M.¹, Gargiulo M.¹, Ariatta C.¹, Raiteri E.¹, Isidoro C.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche, Laboratorio di Patologia Molecolare, Università "A. Avogadro" 28100 – Novara (Italy).

Int J Cancer., 97(6):775-779; 2002 PMID: 11857353.

Synthesis of Sphingosine and Ceramide Analogues and their Evaluation in a model for Apoptosis.

Roshini Rajan¹, Kurt Wallimann¹ and Andrea Vasella¹ and **Deborah Pace**², Armando A. Genazzani², Pier Luigi Canonico² and Fabrizio Condorelli².

1. Laboratorium fur Organische Chemie, ETH-Honggerberg, Wolfgang-Pauli Strasse 10, CH-8093 Zurich

2. Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", DISCAFF, via Bovio,6 28100 Novara

Chemistry and Biodiversity, 1 (11), 1785-1799; 2004