

Università degli Studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Facoltà di Medicina e Chirurgia, Novara

Tesi di Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

ciclo XVII

***COMPLESSI ORGANOMETALLICI E TELOMERASI PER UN APPROCCIO
CHEMIOTERAPICO SELETTIVO ANTITUMORALE***

Relatore: **Prof. Ilario Viano**

Correlatore: **Prof. Donato Colangelo**

Candidata: **Annalisa Ghiglia**

Anno Accademico 2005 / 2006

INDICE

PARTE 1

Complessi organometallici nella chemioterapia antitumorale

Introduzione 1

Capitolo 1.1.: <u>La Telomerasi</u>	pag. 7
1.1. Telomerasi: funzione e struttura. Architettura e biologia della telomerasi per la modulazione della sua attività	pag. 7
Capitolo 1.2.: <u>Telomerasi come bersaglio chemioterapico</u>	pag. 20
Capitolo 1.3.: <u>Complessi organometallici in chemioterapia</u>	pag. 24
1.3.1. Sali di Ferrocenio	pag. 24
1.3.1.1. Meccanismo di azione dei Sali di Ferrocenio	pag. 26
1.3.2. Complessi a base di Platino	pag. 27
1.3.2.1. Composti del Platino come agenti antitumorali	pag. 27
1.3.2.2. Reattività dei complessi del Platino	pag. 28
1.3.2.3. Reattività in rapporto alla configurazione <i>trans</i>	pag. 32
1.3.2.4. Sintesi di nuovi composti del Platino	pag. 33
1.3.2.5. Telomerasi e Platino	pag. 36
1.3.3. Complessi a base di Osmio	pag. 38
Scopo del lavoro 1	pag. 39
Studio dell' attività antitelomerasica di molecole organometalliche:	
1.1. a base di Sali di Ferrocenio	pag. 39
1.2. a base di Platino	pag. 39
1.3. a base di Osmio	pag. 39
Capitolo 1.4.: Materiali e metodi	pag. 40
1.4.1. Criteri per la scelta di composti con potenziale attività antitelomerasica	pag. 40
1.4.1.1. Composti a base di Sali di ferrocenio	pag. 40
1.4.1.2. Composti a base di Platino	pag. 41
1.4.1.3. Composti a base di Osmio	pag. 42
Colture cellulari e trattamenti con i composti organometallici	pag. 43
Test di vitalità e proliferazione (MTT)	pag. 44

Test di apoptosi	pag. 44
1.4.2.: Determinazione dell'effetto di complessi organometallici sulla telomerasi	pag. 45
1.4.2. Lisi, estrazione e dosaggio dell'enzima attivo	pag. 45
1.4.3.: Determinazione dell'attività telomerasica	pag. 46
1.4.3.1. TRAP (telomeric repeat amplification protocol)	pag. 46
1.4.3.2. Real-time quantitative PCR (TRAP-RTQ-TRAP)	pag. 49
1.4.3.3. Determinazione dell'espressione dei componenti della telomerasi (RT-PCR)	pag. 51
1.4.3.4. Determinazione della lunghezza telomerica residua	pag. 52
Determinazione del danno ossidativo al DNA cellulare <i>in vitro</i>	pag. 53
Determinazione della stabilità dei diversi composti di Ferrocínio in condizioni fisiologiche (spettroscopia UV-vis)	pag. 53
Determinazione dei livelli intracellulari di Ferro e Platino (spettrofotometria ad assorbimento atomico)	pag. 54
Determinazione dell' uptake dei composti del Platino (ICP-MS)	pag. 55
Determinazione del coefficiente di partizione ottanolo/H ₂ O (P _o /w)	pag. 55
Analisi statistica 1	pag. 56
Capitolo 1.5.: Risultati	pag. 57
1.5.1. <u>Complessi a base di Sali di Ferrocínio</u>	pag. 57
1.5.1.1. Stabilità dei composti del Ferrocínio	pag. 57
1.5.1.2. Citotossicità dei Sali di Ferrocínio	pag. 60
1.5.1.3. Studio del meccanismo di azione dei Sali di Ferrocínio.	pag. 63
1.5.1.4. Spin trapping per definire le specie radicaliche coinvolte nel meccanismo di azione	pag. 64
1.5.1.5. La spettrofotometria ad assorbimento atomico	pag. 66
1.5.2. <u>Complessi del Platino</u>	pag. 66
1.5.2.1. Screening di attività antitelomerasica in un test su enzima estratto (test biochimico)	pag. 66
1.5.2.2. Effetto dei complessi Ptquin8, <i>Trans</i> e <i>Cis</i> -PtPy sulla telomerasi estratta da cellule MCF-7 e sulla Taq polimerasi	pag. 67
1.5.2.3. Effetti di composti Pt(II) sulla vitalità di cellule MCF-7 dopo trattamento di 24 h	pag. 68
1.5.2.4. Effetti di Ptquin8, <i>Trans</i> e <i>cis</i> -PtPy su telomerasi di cellule MCF-7 dopo trattamento di 24 h	pag. 69
1.5.2.5. Effetti di Ptquin8 sulla vitalità di cellule MCF-7 dopo trattamento di 10 gg	pag. 70
1.5.2.6. Effetti di Ptquin8 sulla telomerasi di cellule dopo trattamento a lungo termine di 30 gg	pag. 70

1.5.2.7. Effetti di Ptquin8 (10^{-9} e 10^{-7} M) sulla capacità proliferativa e risposta apoptotica di cellule dopo trattamento di 30 gg	pag. 72
1.5.2.8. Effetti di Ptquin8 (10^{-7} M) sulla lunghezza telomerica di cellule MCF-7	pag. 74
1.5.2.9. Effetti di Ptquin8 sull'espressione genica dei componenti della telomerasi (RT-PCR)	pag. 74
1.5.2.10. Determinazione dell'uptake dei composti del Platino con ICP-MS	pag. 75
1.5.2.11. Determinazione del coefficiente di partizione ottanololo/H ₂ O (P_o/w)	pag. 76
1.5.3. <u>Complessi dell'Osmio</u>	pag. 77
1.5.3.1. Effetto di HO ₃ (CO) ₉ (3-amminochinolina)[P(C ₆ H ₄ SO ₃ H) ₃] sull'enzima telomerasi estratto	pag. 77
1.5.3.2. Effetto di HO ₃ (CO) ₉ (3-amminochinolina)[P(C ₆ H ₄ SO ₃ H) ₃] sulla Taq polimerasi	pag. 78
1.5.3.3. Effetti di HO ₃ (CO) ₉ (3-amminochinolina)[P(C ₆ H ₄ SO ₃ H) ₃] sulla telomerasi di cellule MCF-7 dopo trattamento di 24 h	pag. 79
1.5.3.4. Effetti di HO ₃ (CO) ₉ (3-amminochinolina)[P(C ₆ H ₄ SO ₃ H) ₃] sulla vitalità di cellule MCF-7 dopo trattamento di 24 h	pag. 79
Capitolo 1.6.: Discussione dei risultati	pag. 80
1.6.1. Complessi a base di Sali di Ferrocenio	pag. 80
1.6.2. Complessi del Platino	pag. 81
1.6.3. Complessi dell'Osmio	pag. 83
Conclusioni 1.	pag. 84
Bibliografia 1.	pag. 86
Pubblicazioni correlate al lavoro descritto nella Parte 1.	pag. 97
➤ Giovanni Tabbi, Claudio Cassino, Giorgio Cavigiolio, Donato Colangelo, <u>Annalisa Ghiglia</u> , Ilario Viano and Domenico Osella. <i>Water Stability and Cytotoxic Activity Relationship of a Series of Ferrocenium Derivatives. ESR Insights on the Radical Production During the Degradation Process.</i> J. Med.Chem 2002 , 45, 5786-5796.	pag. 97
➤ Colangelo D, <u>Ghiglia A</u> , Viano I, Cavigiolio G, Osella D. <i>Cis-[Pt(Cl)₂(pyridine)(5-SO₃H-isoquinoline)] complex, a selective inhibitor of telomerase enzyme.</i> Biometals 16:553-560, 2003 .	pag. 108
➤ Colangelo D, <u>Ghiglia A</u> , Viano I, Mahboobi H, Ghezzi A, Cassino C, Osella D. <i>Might telomerase enzyme be a possible target for trans-Pt(II) complexes?</i> J Inorg Biochem. 2004 Jan;98(1):61-7.	pag. 116
➤ Gabano E, Cassino C, Bonetti S, Prandi C, Colangelo D, <u>Ghiglia A</u> , Osella D. <i>Synthesis and characterisation of estrogenic carriers for cytotoxic Pt(II) fragments: biological activity of the resulting complexes.</i> Org Biomol Chem. 2005 Nov 7;3(19):3531-9. Epub 2005 Aug 22.	pag. 123
➤ Colangelo D, <u>Ghiglia A</u> , Ghezzi A, Ravera M, Rosenberg E, Spada F, Osella D. <i>Water-soluble benzoheterocycle triosmium clusters as potential inhibitors of telomerase enzyme.</i> J Inorg Biochem. 2005 Feb; 99 (2):505-12.	pag. 132

PARTE 2

Correlazione tra chemioterapia ed attività della telomerasi in campioni biologici di neoplasie polmonari

Introduzione 2

2.1. Telomerasi ed approccio terapeutico alle neoplasie polmonari pag. 141

2.1.1. Le neoplasie polmonari pag. 141

2.1.2. Anatomia patologica delle neoplasie polmonari pag. 144

2.1.2.1. Aspetti generali pag. 144

2.1.2.2. Istotipi tumorali: aspetti macroscopici e microscopici pag. 144

2.1.3. Stadiazione delle Neoplasie Polmonari pag. 149

2.1.3.1. Il Sistema TNM pag. 149

2.1.3.2. Il Sistema TNM e le Neoplasie Polmonari pag. 151

2.1.3.3. Stadiazione TNM del Carcinoma Polmonare pag. 153

2.1.4. Fattori Prognostici pag. 153

2.1.5. La terapia delle neoplasie polmonari pag. 155

2.1.6. La Telomerasi per la Diagnosi e la Prognosi del Tumore pag. 156

2.1.7. La Telomerasi come Marcatore Diagnostico dei Tumori Polmonari pag. 158

Scopo del lavoro 2. pag. 162

2.2. Materiali e metodi pag. 163

2.2.1. Pazienti e criteri di inclusione pag. 163

2.2.2. Analisi Immunoistochimica pag. 163

2.2.3. Preparazione del Materiale Biologico della Clinica pag. 164

2.2.4. Procedure Analitiche pag. 164

2.2.4.1. Procedure per effettuare il BAL e il Broncoaspirato pag. 165

2.2.5. Estrazione e Purificazione dell'Enzima Telomerasi dalle cellule ottenute mediante il BAL ed il
Broncoaspirato e dosaggio dell'Attività Telomerasica pag. 166

Analisi statistica 2 pag. 166

Risultati e discussione 2 pag. 167

Conclusione 2 pag. 181

Bibliografia 2 pag. 182

PARTE 1

Complessi organometallici nella chemioterapia antitumorale

INTRODUZIONE 1

Capitolo 1.1. La Telomerasi

1.1. Telomerasi: funzione e struttura. Architettura e biologia della telomerasi per la modulazione della sua attività.

Nelle normali cellule somatiche umane i telomeri, le estremità dei cromosomi, sono costituiti da circa 15.000 paia di basi con una sequenza ripetitiva esanucleotidica caratteristica, *TTAGGG* (Moyzis et al., 1999; McEllingott et al., 1997). Le sequenze dei telomeri e le proteine ad esse associate formano una struttura importante che impedisce la fusione terminale dei cromosomi, la loro traslocazione e degradazione ad opera di esonucleasi (Tommerup et al., 1994; Zakian 1989; Zakian 1995). I telomeri, quindi, preservano l'integrità del cromosoma permettendone la completa replicazione e assicurano la corretta replicazione di geni essenziali (Blackburn 1991 (a); Blackburn 1991 (b); Blackburn 1992; Kakuo et al., 1999).

I telomeri vengono progressivamente accorciati ad ogni divisione cellulare (perdita di circa 200 paia di basi ad ogni ciclo), a causa del cosiddetto "problema di replicazione terminale", fino al raggiungimento di una lunghezza minima, detta "di crisi", che produce un forte stimolo apoptotico o la manifestazione di un fenotipo senescente (Fu et al., 2000; Aragona et al., 2000; Oulton et al., 2000). Questo fenomeno, denominato "senescenza di tipo replicativo" induce nelle normali cellule somatiche la cessazione programmata della divisione cellulare e la limitazione del potenziale proliferativo. Questo processo, quindi, è stato considerato come un meccanismo del controllo intrinseco della soppressione tumorale: si ipotizza che esso possa agire da misura molecolare ("clock") del numero di repliche delle cellule (Figura 1.1.1).

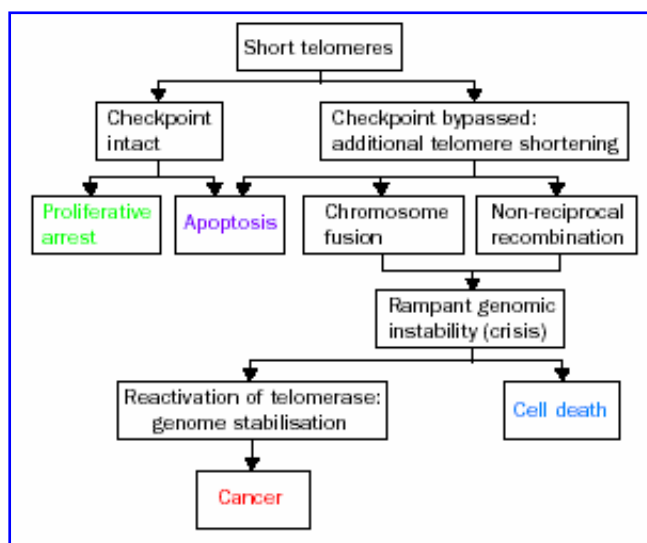


Figura 1.1.1. Schema degli eventi cellulari indotti dall'accorciamento telomerico (Wong JMY & Collins K, 2003).

Nelle cellule tumorali la telomerasi, una DNA polimerasi RNA-dipendente (retrotrascrittasi) aggiunge sequenze di DNA ripetitive (TTAGGG) ai telomeri, preservando così la lunghezza dei terminali cromosomici (Kim et al., 1994; Karlseder, 2003) (Figura 1.1.2.).

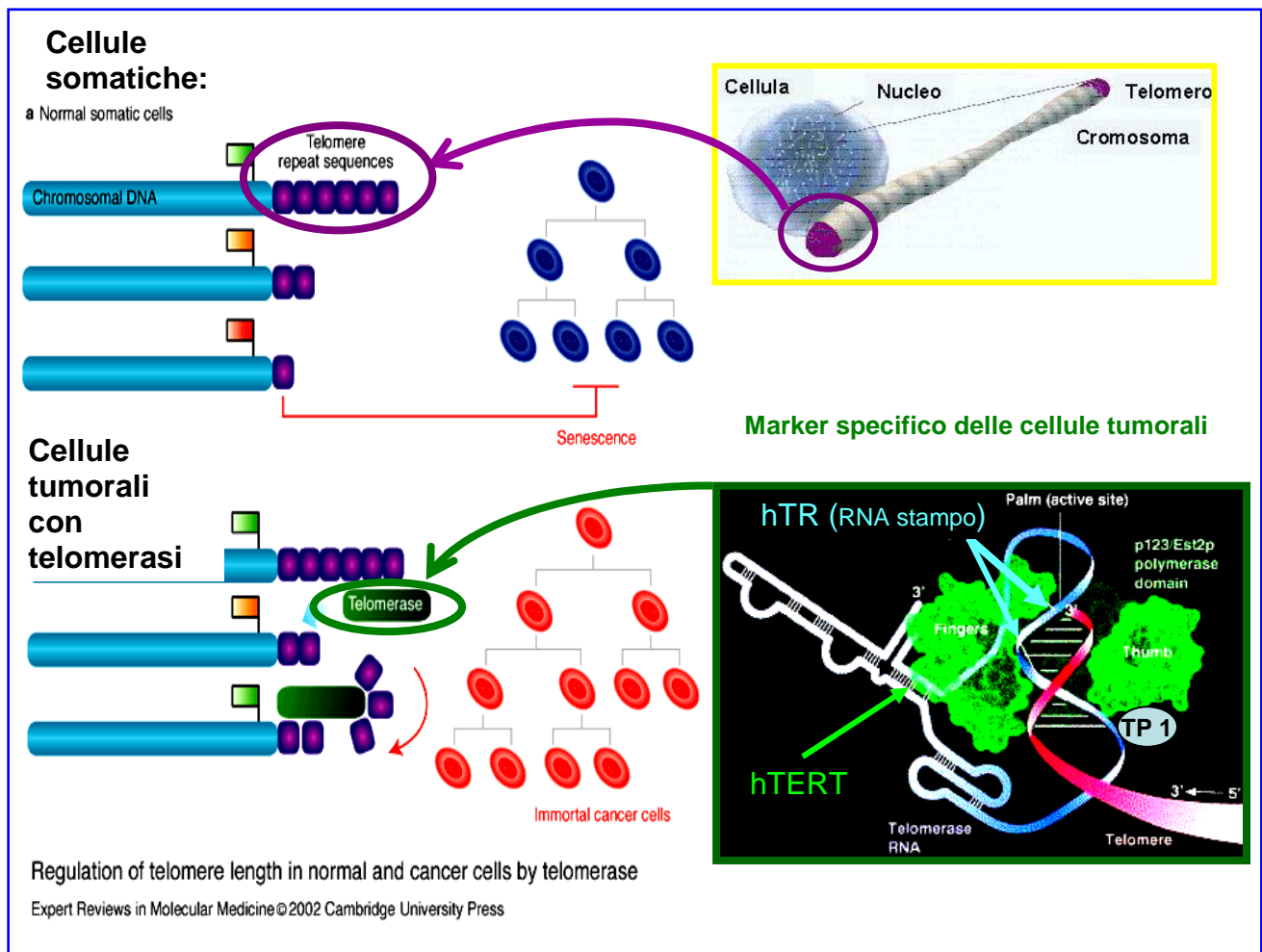


Figura 1.1.2. Differenza nella dinamica telomerica tra una cellula normale ed una tumorale. La telomerasi interviene per riportare il telomero ad una lunghezza sufficiente a garantire la capacità proliferativa della cellula neoplastica.

La telomerasi quindi conferisce alla cellula una capacità proliferativa illimitata, rivestendo così un ruolo centrale nel processo neoplastico (Nugent et al., 1998; Liu, 1999; Masutimi et al., 2003). L'illimitato potenziale proliferativo che consegue alla conservazione della lunghezza telomerica è stato definito come una delle sei caratteristiche fondamentali alla base dello sviluppo tumorale (Hanahan et al., 2000).

La telomerasi è un enzima complesso sia per la sua architettura sia per il network biologico alla base delle sue funzioni. Questo enzima è stato biochimicamente identificato nel 1985 da Greider e Blackburn ed isolato dall'organismo unicellulare *Tetrahymena*. Oltre a due importanti componenti, lo stampo ad RNA (hTR) e la componente proteica trascrittasi inversa (hTERT), vi sono importanti proteine con funzioni

strutturali e di regolazione (Chen JL et al., 2000; Wong & Collins, 2003). Mentre molte di queste sono già state descritte (come TEP1, Hsp70, Hsp90, p23, hStau, hNOP10, hGAR1, discherina), altre necessitano di ulteriori ricerche (Figura 1.1.3.).

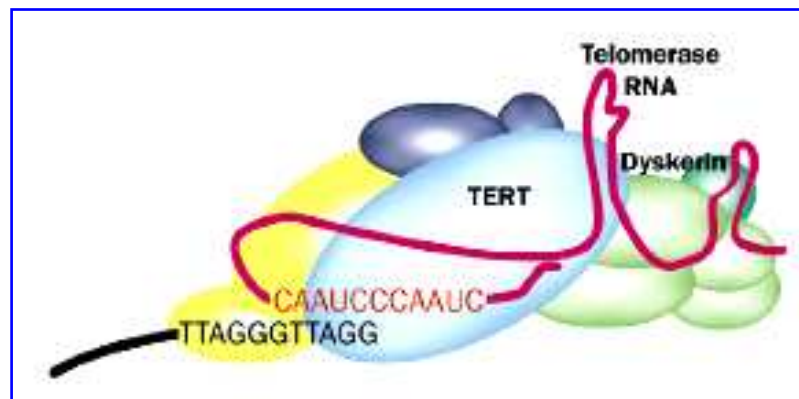


Figura 1.1.3. Struttura della telomerasi (Wong JMY & Collins K., 2003).

Le proteine associate alla telomerasi ricoprono differenti ruoli. Hsp70, Hsp90 e p23 svolgono importanti funzioni nel 'folding' e nella struttura di hTERT, altre sono associate a hTR e sono essenziali per l'assemblaggio hTR/hTERT (Colangelo and Osella, 2005). Queste proteine sono coinvolte, insieme ad alcuni cationi importanti, nella dimerizzazione e nella tetramerizzazione della telomerasi, regolandone l'attività di sintesi. hTR e hTERT sono essenziali per il corretto mantenimento e l'allungamento del telomero.

La regolazione dell'intero processo di attivazione della telomerasi inoltre è soggetta a rigidi controlli molecolari (Figura 1.1.16.).

Il fattore limitante la funzione della telomerasi è l'espressione della porzione hTERT. Le cellule somatiche telomerasi-negative, infatti, non esprimono questa proteina, mentre i tessuti germinativi sono in grado di regolare la sua trascrizione sia positivamente che negativamente. hTERT risulta quindi essere il miglior target per le strategie mirate a bloccare l'attività della telomerasi. La sua espressione è correlata con il processo di progressione tumorale ed i meccanismi genetici che la controllano sono al centro di un complesso network di fattori di regolazione positivi e negativi. Inoltre, l'amplificazione del gene di hTERT in posizione 5p15, osservata in vari tumori, indica come questa proteina sia cruciale per capire il ruolo della telomerasi nella comparsa della neoplasia (Zhang et al., 2000; Bryan et al., 2000) (Figura 1.1.4.).

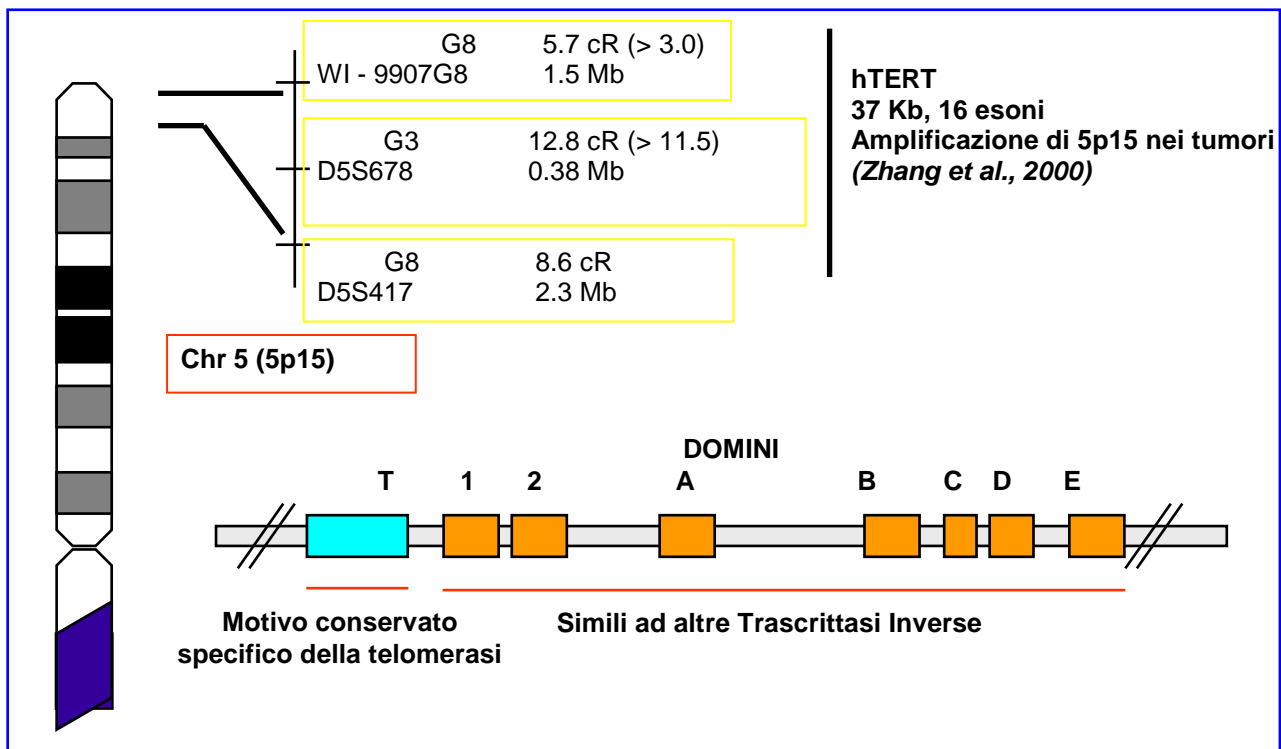


Figura 1.1.4. Domini di hTERT (subunità catalitica). La telomerasi si differenzia dalle altre trascrittasi inverse perché rimane legata al suo RNA stampo. Mutazioni indotte nei motivi di trascrittasi inversa riducono l'attività ma non il legame alla sua subunità di RNA. Al contrario mutazioni nei domini T riducono drammaticamente il legame alla subunità di RNA (Bryan et al., 2000).

Questa funzione fondamentale di hTERT richiede vari e raffinati controlli. La regolazione trascrizionale sembra essere la problematica di più difficile comprensione. Sebbene il promotore di hTERT sia stato completamente caratterizzato, non è ancora chiaro come avvenga l'attivazione della trascrizione. In realtà il promotore contiene regioni consenso per molteplici vie di segnalazione, e la loro risultante determina la tendenza della cellula ad esprimere la telomerasi (Figura 1.1.5.).

Possibili regolazioni farmacologiche a questo livello potrebbero risultare difficili e, sino ad ora, non è stato ancora descritto nessun fattore specifico esclusivo della cellula neoplastica in grado di promuovere la trascrizione di hTERT. Sembra che alcuni farmaci antiproliferativi correntemente usati nel trattamento del cancro regolino negativamente alcuni fattori trascrizionali, e i loro effetti diretti sull'espressione e sull'attività della telomerasi sono controversi. I fattori di trascrizione che regolano l'espressione di un grande numero di geni e di vie di segnalazione sono condivisi sia da cellule normali che neoplastiche. L'espressione del gene di hTERT, infatti, è regolata positivamente o negativamente da Myc/mad (E-box), NF- κ B, E2F-1, WT-1, complesso estrogeno/recettore, ER81e molti altri fattori. La componente p65 della NfKb è stata anche associata con la traslocazione della proteina di hTERT dal citoplasma al nucleo.

Nella maggior parte dei tumori umani si verifica un'interessante associazione tra l'inattivazione di p53 e l'attivazione dell'enzima telomerasi. D'altro canto, una variazione nell'espressione di p53 regola negativamente l'attività enzimatica della telomerasi nelle varie linee cellulari neoplastiche attraverso la repressione trascrizionale p21 e E2F- mediata della sola porzione hTERT. Questa regolazione multifattoriale, comunque, non preclude una regolazione specifica dell'espressione telomerasica mediante alcuni recettori, almeno per alcuni tipi di tumore.

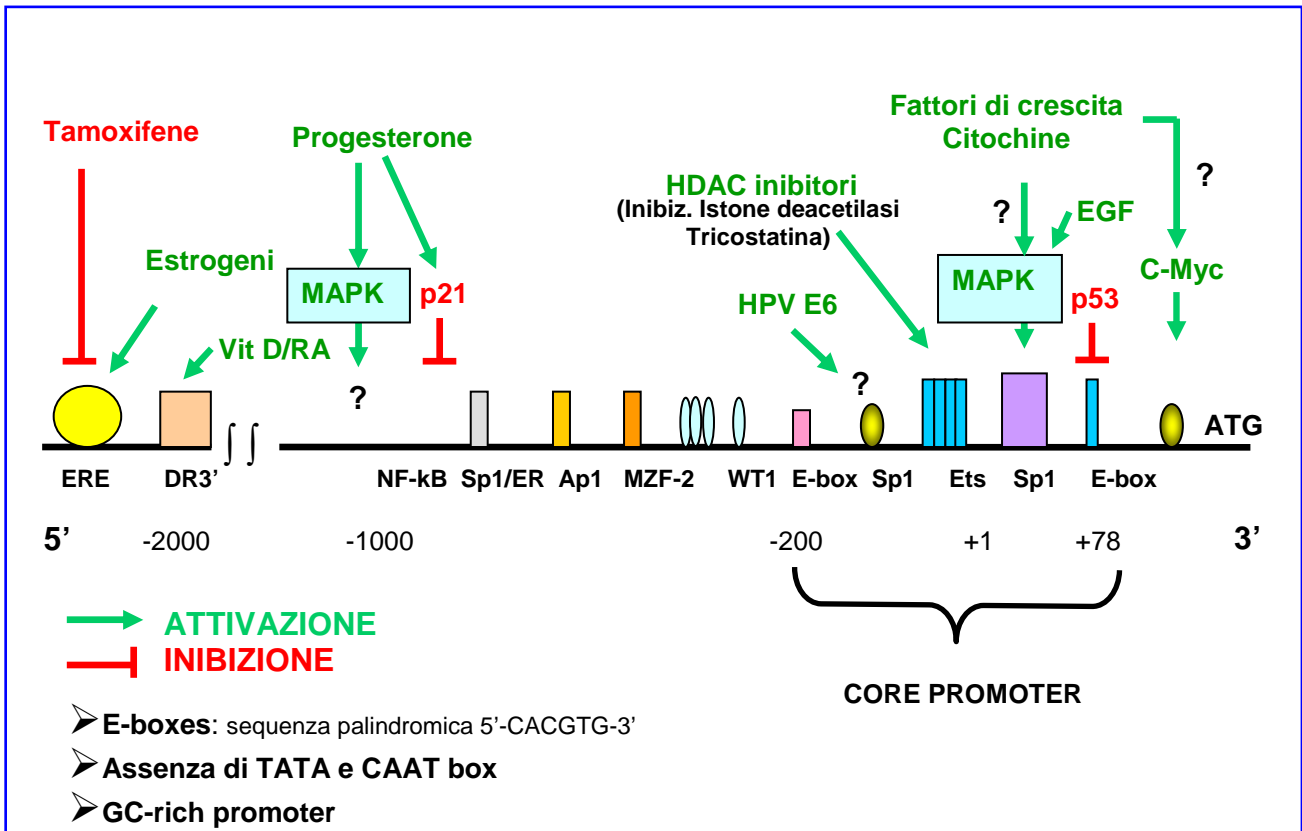


Figura 1.1.5. Regolazione trascrizionale di hTERT. Il sito promoter di hTERT è ricco in GC ed è privo sia di TATA box che di CAAT box. Contiene siti di legame per diversi fattori trascrizionali: 2 siti di legame per E2F-1 sono stati identificati prossimalmente al sito di inizio della trascrizione di hTERT. Gli inibitori dell'istone- deacetilasi (HDAC) come la tricostatina (TSA) attivano la trascrizione di hTERT nelle cellule normali ma non nelle tumorali. Questo suggerisce come la deacetilazione istonica, che comporta un cambiamento nella struttura cromatinica, potrebbe essere coinvolta nel silenziamento del gene hTERT nelle cellule normali.

WT1: Wilms' tumor 1 suppressor gene che può reprimere il promoter di hTERT, considerato per questa sua funzionalità un silenziatore. L'induzione di p53 provoca l'arresto in Go/G1 e G2/M, una up-regolazione di p21 CIP1/WAF1 che inibisce le protein- chinasi -cicliche dipendenti (CDKs). Questi fattori proteici (p21, p16^{INK4}) infatti formano complessi ternari con Cdk2/ciclica A, E, D1 inibendo l'attività cinasica di Cdk2. Si verifica quindi un accumulo di complessi inattivi di Cdk, che consente il mantenimento dello stato defosforilato del loro substrato pRb e quindi la senescenza, senza la down regolazione di hTERT.

L'oncoproteine E6 ed E7 del papillomavirus umano (HPV6 e 7) inducono un fenotipo proliferativo e l'attività telomerasica.

EGF, il fattore di crescita epidermico, attiva rapidamente (picco a 6-12h) la trascrizione di hTERT e tale attivazione non è bloccata dalla concomitante esposizione alla cicloesimide, suggerendone un effetto diretto, ma viene bloccata da MEK inibitori. EGF attiva la telomerasi attraverso una diretta attivazione trascrizionale di hTERT in cui Ras/MEK/ERK via ETS assumono un ruolo importante.

Le citochine quali IL-6 e insulin-like growth factor 1 (IGF1) up-regolano l'attività telomerasica senza alterare la trascrizione di hTERT in linee cellulari umane di mieloma multiplo. Tale up-regolazione è mediata dal segnale fosfatidilinositolo 3'-chinasi (PI3k)/Akt/nuclear factor k (NF kappa B) (Kyo & Inoue, 2002).

Un secondo step nella modulazione dell'attivazione della telomerasi è lo splicing alternativo e la traduzione dell'mRNA di hTERT.

La variante di splicing α porta alla delezione di 36 basi all'interno della regione conservata della RT (motivo A). La variante di splicing β causa una delezione di 183 basi che produce una sequenza mancante di porzioni critiche della RT. Ne risulta così una proteina tronca a monte delle porzioni conservate B, C, D ed E. L'espressione delle diverse varianti è importante per l'elongazione del telomero e ne risulta che sono attive solo le proteine trascritte di hTERT con isoforme α^+/β^+ e α^-/β^+ (Figura 1.1.6.).

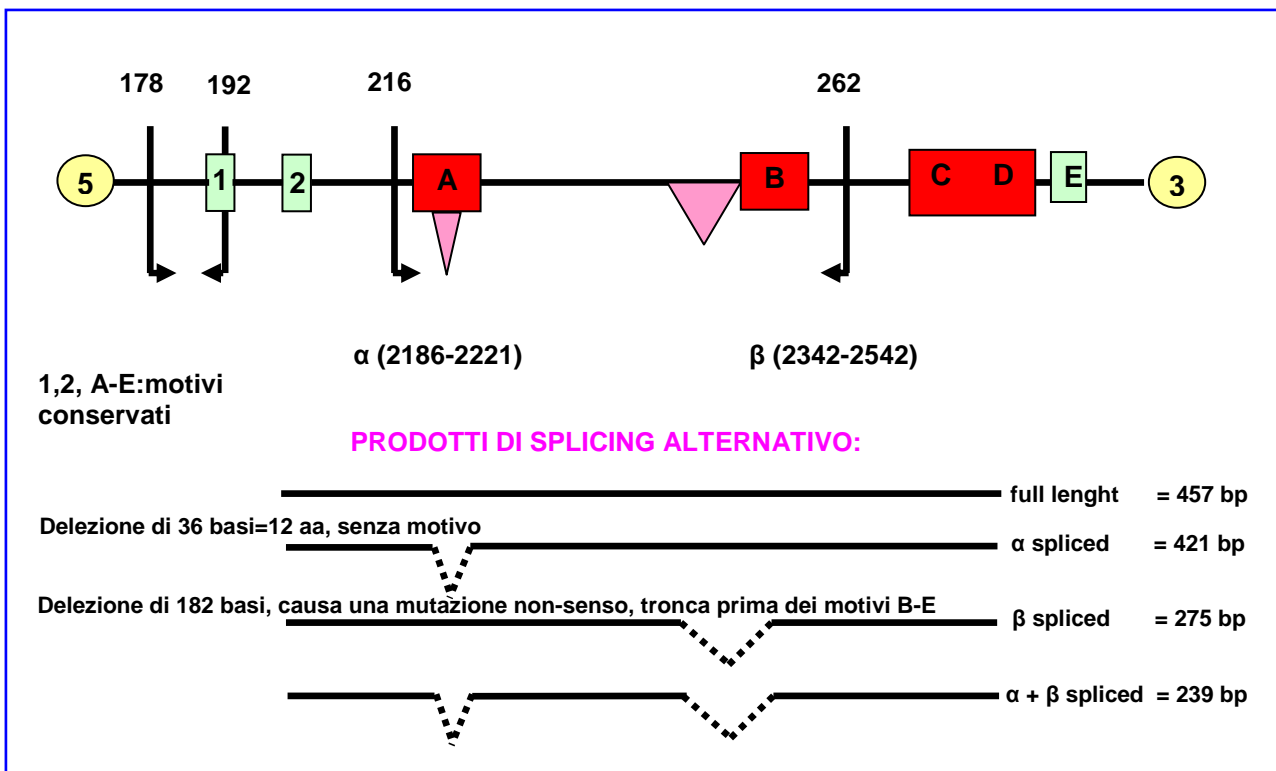


Figura 1.1.6. Splicing alternativo di hTERT mRNA (melanoma umano). Splicing alternativi sono stati evidenziati anche in modo tessuto specifico e in alcuni casi risultano dipendenti dall'età gestazionale (Villa et al., 2001).

Gli splicing alternativi potrebbero rappresentare un importante settore di ricerca per l'inibizione della telomerasi, considerando che i farmaci antiploriferativi sembra siano in grado di alternare le differenti varianti di splicing in funzione di specifiche condizioni. Inoltre, la variabilità nello splicing deve essere considerata all'interno del contesto di un network molto più complesso di modificazioni post-trascrizionali, infatti si è osservato che alcuni tessuti normali e neoplastici esprimono sia hTR che hTERT con "motif" A e B completi, benché questi manchino di attività telomerastica.

La fosforilazione delle subunità della proteina sembra essere uno dei processi centrali di regolazione finale e di attivazione della telomerasi, considerando che sono presenti molteplici siti di fosforilazione per

PKC e Akt. La proteina fosfatasi II e gli inibitori della PKC α sono in grado di reprimere l'attivazione della telomerasi in estratti cellulari. La fosforilazione, la traslocazione nucleare e l'associazione nel nucleolo sono in relazione con l'attivazione della telomerasi e sono importanti bersagli della modulazione dell'enzima.

hTERT svolge il ruolo di trascrittasi inversa che sintetizza DNA telomerico attraverso la copia di una piccola sequenza di template presente all'interno dell'RNA stampo di hTR, altro componente importante dell'enzima (Autexier et al., 2006) (Figura 1.1.7.; Figura 1.1.8.; Figura 1.1.9.).

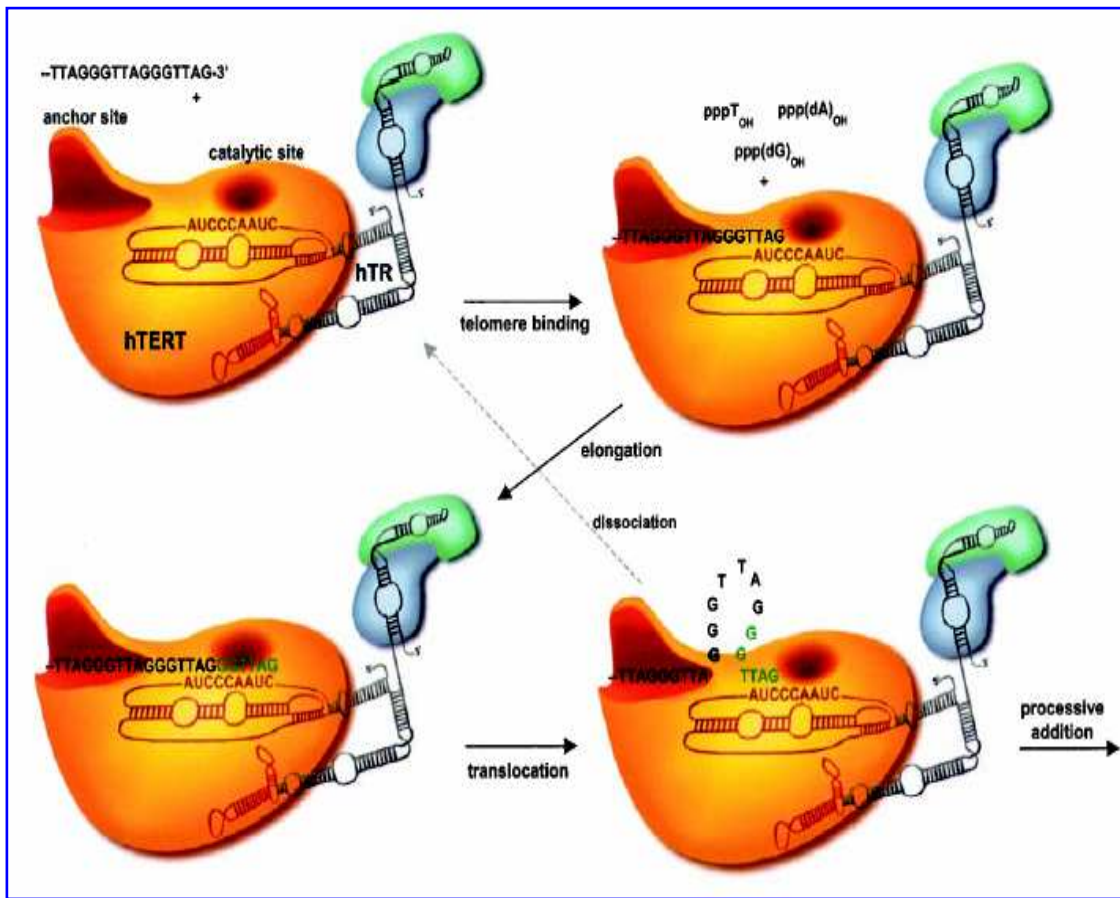


Figura 1.1.7. Funzione di allungamento dei telomeri della telomerasi. La telomerasi interagisce con i telomeri non solo con la regione stampo ma anche con un sito ancora che interviene nel progressivo allungamento telomerico ancorando il telomero neoformato. In seguito al legame coordinato da queste 2 regioni (stampo ed ancora) può iniziare l'attività sintetica della telomerasi (Harley CB., 2002; Lue et al., 2005).

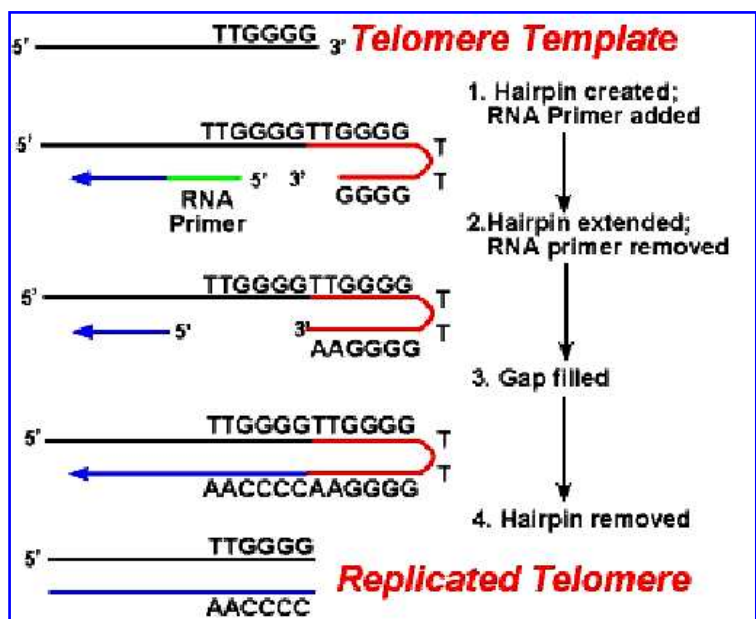


Figura 1.1.8. Modalità replicativa dei telomeri tramite telomerasi. Il DNA satellitare, derivato dall' attività della subunità telomerica TERT, si ripiega su se stesso con appaiamenti "non Watson-Crick", creando un "hairpin" che la consueta DNA-polimerasi utilizza come innesco per la sintesi in direzione 5'- 3'.

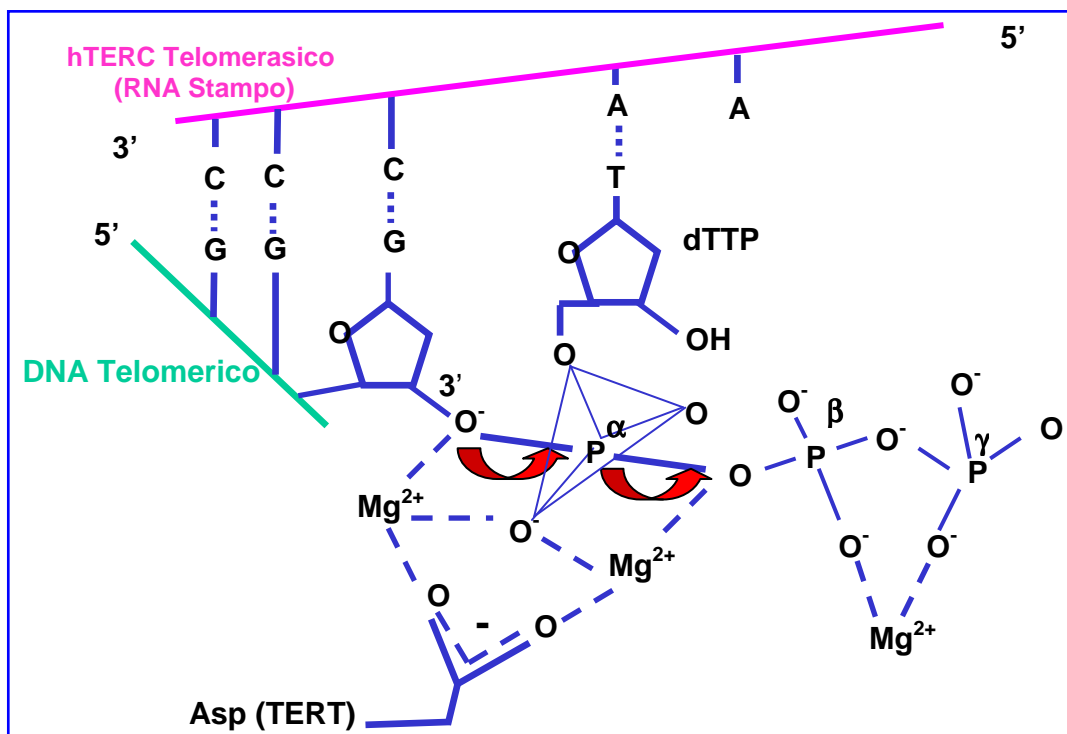


Figura 1.1.9. Possibile meccanismo biochimico di catalisi di DNA telomerico da parte di hTERT. Il meccanismo proposto per la polimerizzazione delle sequenze telomeriche da parte della telomerasi si basa sul modello di trascrittasi inversa di Joyce e Steitz: tre siti attivi di acido aspartico di hTERT contenuti nei motivi A e C , uno solo dei quali rappresentato in figura, coordinano 2 ioni metallici divalenti (Magnesio) che sono a loro volta coordinati con l' ossianione nucleofilo in 3' della base guaninica, con il fosfato α del nucleotide entrante e con l'atomo di ossigeno gruppo uscente (Lingner et al., 1997; Cech & Angew, 2000; Lagassie et al., 2005).

hTR e hTERT rappresentano le unità indispensabili per l'attività telomerasica. Il numero di geni copiati e la regolazione trascrizionale di hTR, ma non di hTERT, sembrano essere il limite stechiometrico per l'attività telomerasica.

Il gene hTR è localizzato in posizione 3q26, e la struttura tridimensionale della molecola offre vari siti d'interazione ad uno svariato numero di fattori e proteine, come TEP1, L22, hStau, hNOP10, discherina, hGAR1 e hNHP2. La struttura terziaria e quaternaria potrebbe giustificare la composizione multimerica della telomerasi, quindi hTR potrebbe omodimerizzare attraverso la regione a doppio filamento P3/P1 a formare una correlazione *trans* (Figura 1.1.10). A livello dell'assemblaggio della telomerasi sono stati descritti anche alcuni meccanismi inibitori correlati come il PinX1 a livello nucleolare, dove avviene l'assemblaggio della telomerasi. PinX1 sembra anche in grado di associarsi con i telomeri attraverso il legame con TRF1. Inoltre è stato dimostrato un coinvolgimento sinergico della metilazione del DNA e della deacetilazione dell'istone nella down-regolazione dell'attività del promoter di hTERT e nella regolazione dell'attività telomerasica durante la differenziazione (Faiola et al., 2005; Atkinson et al., 2005; Ge et al., 2006).

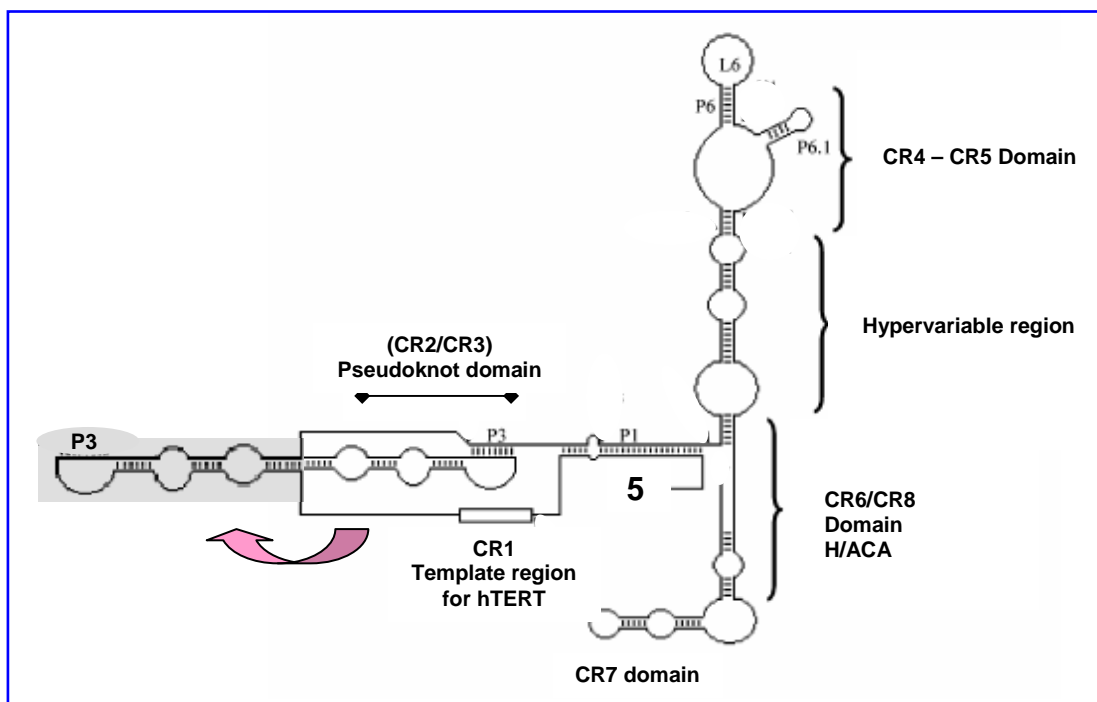


Figura 1.1.10. Struttura terziaria della porzione hTR con le zone di interazione con le altre componenti della telomerasi. La porzione in grigio descrive la conformazione adatta per l'eventuale dimerizzazione dell'enzima.

La modulazione dell'attività della telomerasi dipende anche dalla struttura della porzione terminale del telomero. A questo livello, la struttura proteina-telomero modula l'accessibilità dell'enzima al terminale 3'

per il processo di elongazione. I telomeri umani sono costituiti da una zona di 15-20 kbp, in cui la sequenza ripetitiva *TTAGGGn* termina con un filamento singolo ricco di G arrangiato in una struttura lariat-like chiamata t-loop (Figura 1.1.11).

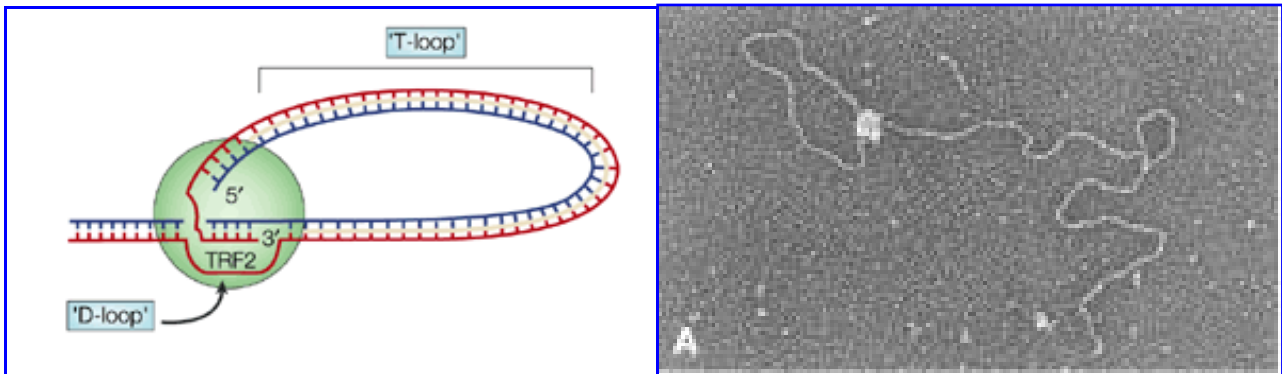


Figura 1.1.11. Struttura a t-loop interfascico del telomero ed immagine *in vitro* (proteina TRF2) TRF1 e 2 si legano omodimericamente con il loro dominio Myb C-terminale (telobox), alla porzione telomerica a doppia catena disponendola in una struttura denominata t-loop, dimostrata nel 1999 da Griffith. La struttura della cromatina telomerica non è organizzata in nucleosomi e non codifica per alcuna proteina (Smogorzewska A. et al., 2002).

Le proteine telomero specifiche sono legate direttamente a regioni a singolo e doppio filamento e formano un complesso che serve come cappuccio di protezione del cromosoma terminale impedendone la degradazione (Figura 1.1.12).

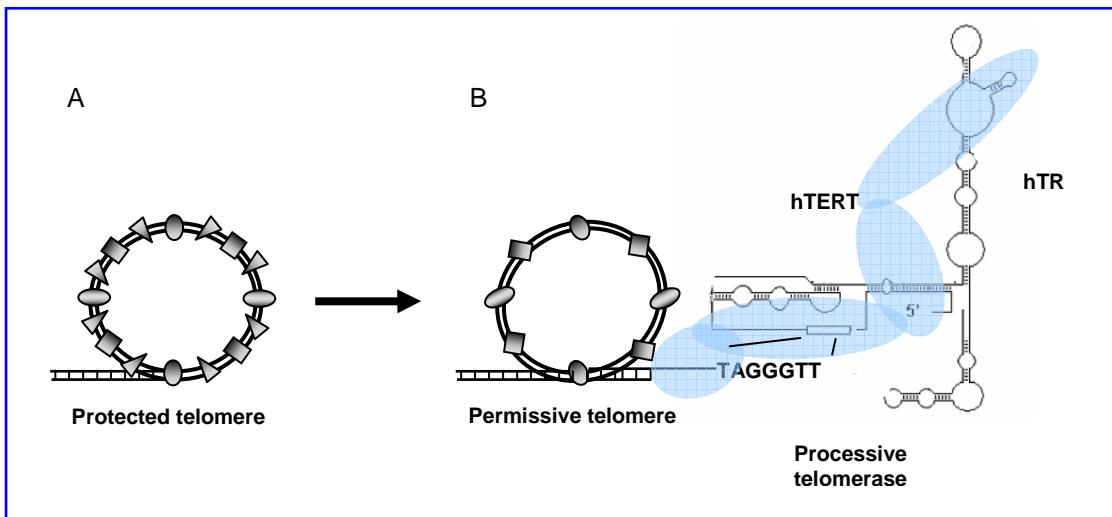


Figura 1.1.12. Struttura della porzione terminale del telomero. Posizione interdetta all'accesso della telomerasi e posizione permissiva per l'allungamento. Il DNA telomerico interagisce con molteplici proteine che ne regolano il metabolismo e l'accessibilità.

Fattori omeostatici presenti a livello del telomero favoriscono la formazione di una struttura terziaria stabile ed evitano la comparsa del processo di senescenza replicativa. Come detto sopra, alcuni fattori sono

coinvolti nella regolazione multi-level dell'assemblaggio delle unità telomerasiche e dell'interazione fra i telomeri. Le hnRNPs C1 e C2 sembrano in grado di regolare l'accesso ai telomeri da parte della telomerasi ed è molto probabile un coinvolgimento di PinX1. Molte proteine coinvolte nel riparo delle rotture a doppia elica sono state caratterizzate a livello telomerico (Figura 1.1.13). Il complesso RMN: Rad 50, MRE 11 e NBS1 (Nijmegen breakage syndrome protein) nell'uomo (Mre-Rad 50 –Xrs 2 nel lievito *Saccaromyces*) con funzione esonucleasica 5'→3', è associato a TRF2. La proteina 70 KD Ku si lega a TRF1 e 2 ed è la componente del complesso protein-chinasico DNA dipendente DNA-PK essenziale per il riparo delle rotture a doppia catena tramite ricombinazione non omologa. Inoltre la proteina Rap 1 risulta implicata nella protezione dei telomeri, contiene un solo motivo Myb (3 eliche che formano un core idrofobico) nel centro della proteina ma non ha abilità nel legare il DNA perché manca della superficie carica positivamente che avrebbe affinità di legame per la carica negativa del DNA, ed infatti risulta legata indirettamente ad esso tramite TRF2.

Cdc 13 riveste un ruolo molto importante nell'interazione con la telomerasi e richiede la presenza del complesso MRX per legarsi ai telomeri. Inoltre sono presenti vari fattori di silenziamento (Sir 1,3,4). I telomeri infatti intervengono in processi di silenziamento trascrizionale (Gilson et al., 1993; Marcand et al., 1996).

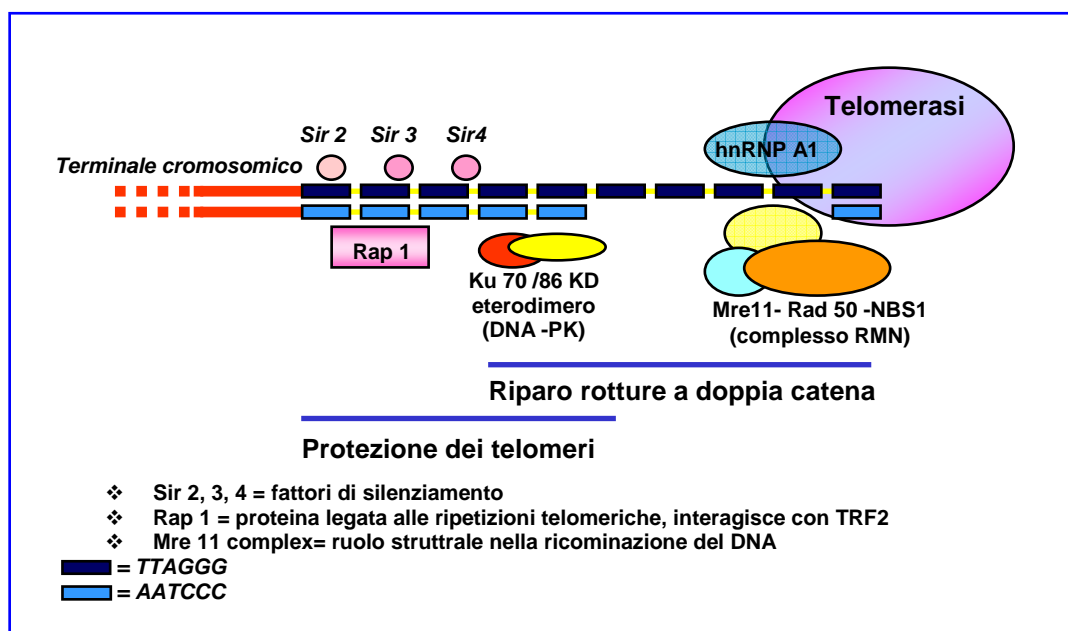


Figura 1.1.13. Interazione telomero-telomerasi. Vedi testo per la spiegazione. (Goytisolo & Blasco, 2002).

Altri fattori sembrano implicati prevalentemente nella struttura tridimensionale del telomero. Per esempio, i fattori telomerici ripetuti TRF1 e TRF2 legano le sequenze telomeriche ripetute a doppio filamento e i loro fattori d'interazione TIN2 e TINT, Ku80, hRAP, Pot 1, TANK1 e TANK2 e probabilmente molti altri

(Mre11, NBS e BLM). TRF1 è un regolatore negativo della lunghezza telomerica nelle cellule telomerasi-positivo, così come TRF2 è un importante “capping” del telomero. La lunghezza telomerica nell’uomo è controllata da un feedback negativo che si basa sul legame di TRF1 al DNA telomerico a doppio filamento. Il complesso TRF1 recluta POT1, una proteina legata al DNA telomerico a singolo filamento, e PIP1, una proteina che interagisce con POT1, rendendo in questo modo i telomeri stabili ed inaccessibili alla telomerasi. La tankyrasi, che appartiene alla famiglia delle PARP, gioca un ruolo importante nella promozione della elongazione del telomero ADP-ribosilando TRF1, che non risulta più in grado di legare il DNA e diventa suscettibile alla ubiquitinazione e alla degradazione. Tin 2 interagisce con TRF1 di cui risulta essere un essenziale mediatore di funzionalità (se privato dell’NH₂ terminale si assiste all’allungamento telomerico da parte della telomerasi) mentre Rap 1 si lega a TRF2 ma entrambe non sembrano interagire con la telomerasi quanto stabilizzare la struttura telomerica. La proteina TRF2 stabilizza il telomero nella struttura a t-loop (Figura 1.1.14).

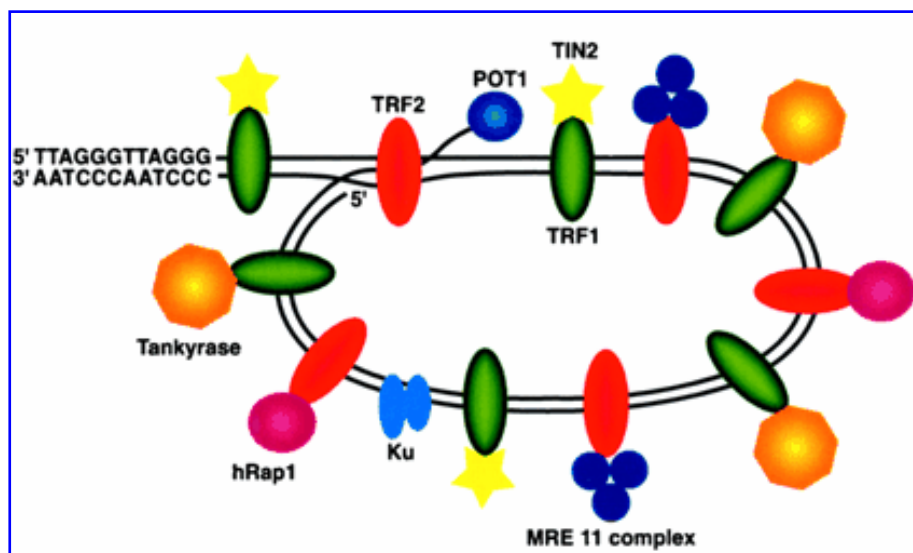


Figura 1.1.14. Struttura a t-loop del telomero. Sono riportate le diverse componenti proteiche (Hahn W. C, 2003).

Questo grande complesso multi-molecolare di fattori che interagiscono potrebbe rappresentare un’importante fonte di sviluppo per nuovi farmaci modulatori antiproliferazione. Il mantenimento dei telomeri sembra essere funzionalmente molto più significativo rispetto all’attività telomerasica per l’allungamento della vita delle cellule normali e neoplastiche. Questa ipotesi è rafforzata anche dall’esistenza di processi di allungamento alternativi (ALT) osservati in una piccola parte di cellule normali, in fase di proliferazione, e neoplastiche (Figura 1.1.15.) (Muntoni et al., 2005).

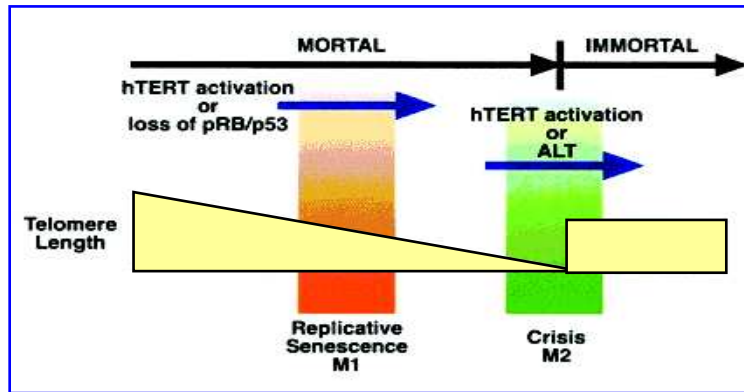


Figura 1.1.15. Ciclo cellulare e barriere all'immortalizzazione. p53 e p16/RB pathways: induzione della senescenza (attività antitumorale). ALT: meccanismo alternativo di replicazione telomerica.

Di seguito è riportato uno schema riassuntivo dei meccanismi di regolazione dell'attività ed accessibilità al telomero dell'enzima telomerasi, descritti in questo capitolo:

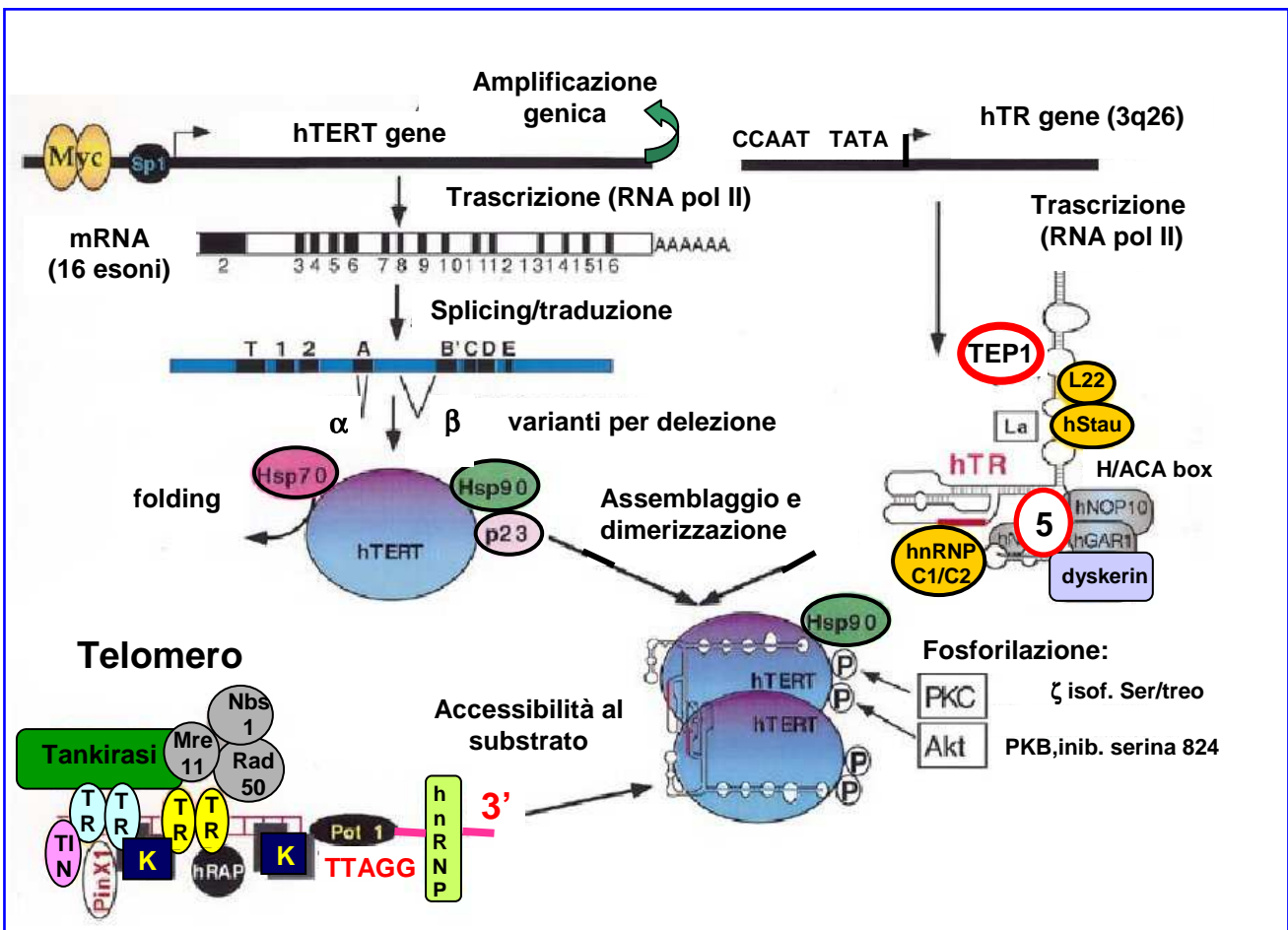


Figura 1.1.16. Regolazione attività e accessibilità al telomero dell'enzima telomerasi. L'espressione della porzione catalitica hTERT è il requisito necessario per l'attivazione dell'enzima, infatti hTERT e TP1 sono costitutivamente trascritti. È stato proposto un meccanismo di funzionamento della telomerasi in cui TERC e TEP1 formano un complesso inattivo che, a seguito dell'unione con hTERT neosintetizzato, si attiva. L'attivazione finale avviene per fosforilazione del complesso TEP1/hTERT ad opera della protein chinasi Ca. Inoltre Akt chinasi regola post-trascrizionalmente hTERT fosforilandolo. (Mergny et al., 2002).

Capitolo 1.2.: Telomerasi come bersaglio chemioterapico

Un nuovo approccio metodologico basato su tecniche di biologia molecolare potrebbe consentire l'identificazione di nuovi e più selettivi bersagli tumorali.

Nuove strategie chemioterapiche potrebbero ridurre la citotossicità sulle cellule normali e superare la resistenza di cellule tumorali

La cancerogenesi è un fenomeno complesso dove le alterazioni genetiche precedono la comparsa delle alterazioni cito-istologiche. Risulta quindi auspicabile un'ampia valutazione *in vivo* delle relazioni esistenti tra gli eventi bio-molecolari del processo di cancerogenesi e le evidenze cito-istologiche finora considerate come "gold-standard" per la diagnosi di neoplasia (Dikmen et al., 2003). Dati consistenti indicano che una serie di eventi molecolari, che portano all'attivazione dell'enzima telomerasi, sono alla base di un processo di cancerogenesi cellulare. Questo enzima, quindi, è un marcatore tumorale la cui determinazione può garantire alta sensibilità e specificità diagnostica (Dhaene et al., 2000; Hiyama et al., 2001; Hiyama E. and K., 2002).

È stata riscontrata la presenza di attività telomerasica in circa l'85% delle più comuni forme tumorali come il carcinoma della mammella, della prostata, del polmone, del fegato, del pancreas e del colon e ciò sottolinea la funzione chiave di questo enzima nella patogenesi tumorale (Rhyu, 1995; Kim, 1997; Meeker et al., 1997). La telomerasi può risultare già attiva ad uno stadio pre-neoplastico o in altri casi la sua attività aumenta gradualmente in parallelo alla progressione del tumore (Shay et al., 1997). L'attività telomerasica risulta in molti casi direttamente proporzionale all'aggressività del tumore ed alla sua capacità di metastatizzare (Avilion et al., 1996).

L'enzima telomerasi è ormai considerato un nuovo marker per l'individuazione delle cellule tumorali e rappresenta un target potenziale per una chemioterapia selettiva. Inibitori di tale enzima, infatti, potrebbero causare una progressiva riduzione dei telomeri nelle sole cellule tumorali, fino al raggiungimento di una lunghezza minima, di crisi, che induce un forte stimolo apoptotico (Hahn et al., 1999; Saretzki et al., 2003). La comprensione dei meccanismi di regolazione che sottendono l'espressione e l'attività della telomerasi potrebbe inoltre consentire lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per la terapia del cancro.

Una strategia inibitoria telomerasica comporterebbe diversi vantaggi quali limitare direttamente la crescita tumorale, agire sinergicamente con inibitori già esistenti ed amplificarne l'efficienza, potrebbe utilizzarsi, in seguito ad un'iniziale chemioterapia od intervento chirurgico, come adiuvante per limitare il

recupero di cellule tumorali rendendole più suscettibili all'attacco del sistema immunitario o all'uccisione con agenti chemioterapici esistenti. Inoltre tale strategia antitelomerica risulterebbe particolarmente interessante per situazioni di turnover cellulare in via di sviluppo, derivanti dall'uso di inibitori dell'angiogenesi.

La somministrazione sistemica di inibitori della telomerasi potrebbe influire sull'attività presente nelle cellule staminali e germinali. Tale effetto risulterebbe minimo poichè la lunghezza dei telomeri delle cellule tumorali, relativamente minore, raggiungerebbe un valore critico di erosione prima dell'instaurarsi di danni irreversibili negli altri tipi cellulari (Figura 1.2.1.).

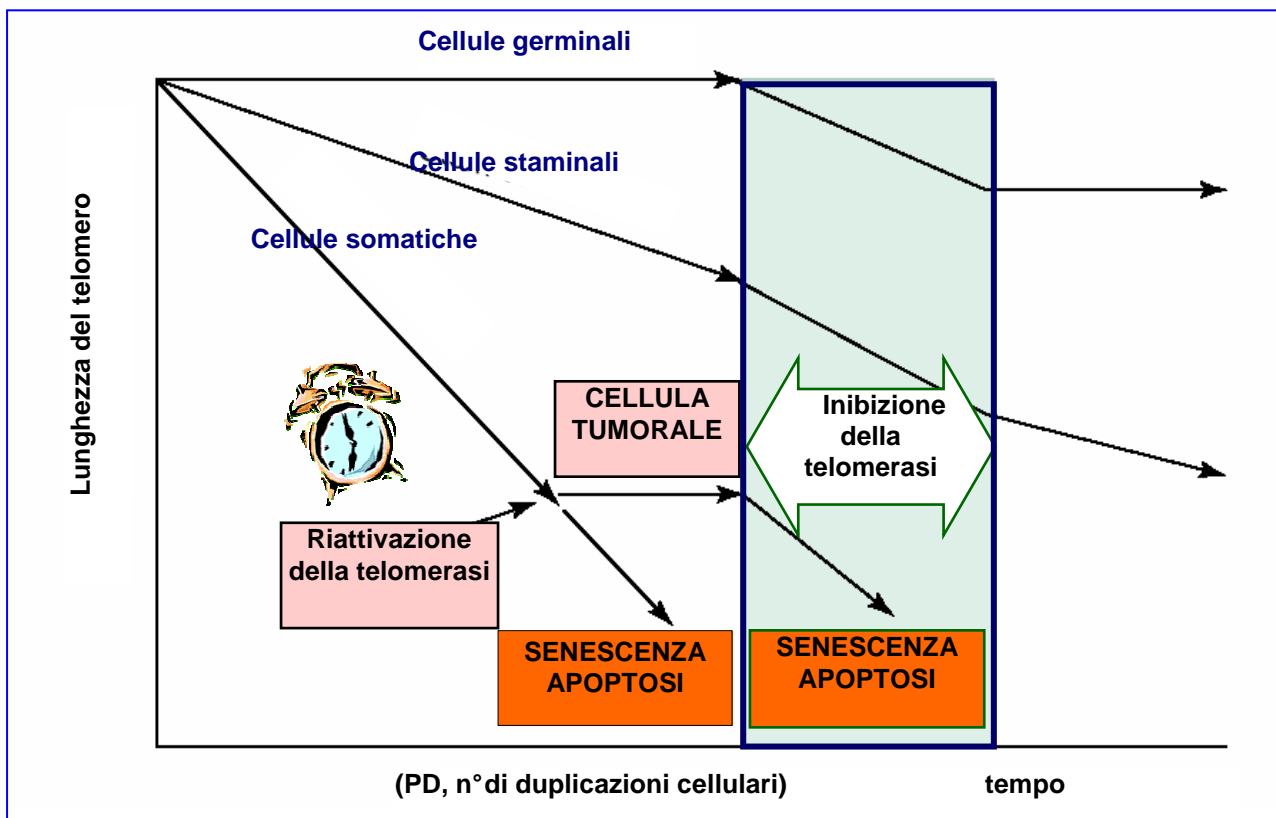


Figura 1.2.1. Differente effetto dell'inibizione telomerica in funzione della lunghezza telomerica iniziale caratteristica di diversi tipi cellulari. La lunghezza telomerica varia in funzione della specie, del tipo cellulare e dell'età: all'aumentare degli anni diminuisce il suo valore. Le cellule germinali hanno in media telomeri di lunghezza costante di 10-15 Kb. Le cellule dei tessuti fetali e neonatali possiedono in origine 8-10 Kb, valore che diminuisce con l'aumentare dell'età.

I criteri che dovrebbero essere soddisfatti da un composto con attività anti-telomerica comprendono: la riduzione dell'attività telomerica senza inizialmente influire sulla capacità di crescita cellulare; l'accorciamento del telomero ad ogni ciclo replicativo; la conduzione delle cellule a morte o verso un arresto della crescita; il tempo necessario per osservare un decremento della proliferazione dovrebbe variare in rapporto alla lunghezza iniziale del telomero; molecole chimicamente simili che non inibiscono la

telomerasi non dovrebbero causare una diminuzione della capacità proliferativa o l'accorciamento telomerico. Negli ultimi anni sono stati riportati molti approcci sperimentali volti a creare una strategia antitelomerica ed i risultati fino ad ora presentati sembrano incoraggiare la ricerca in questa direzione (Figura 1.2.2.; Figura 1.2.3.) (Pendino et al., 2006). Alcune strategie dimostrate anti-telomerasiche erano non selettive, quali: induzione di danni ossidativi con farmaci antitumorali come la bleomicina e la doxorubicina, diretti sui telomeri così da renderli irriconoscibili e quindi non più elongabili dalla telomerasi (Budarf et al., 1987; Henderson et al., 1987; Ahmed et al., 1992; von Zglinicki, 1995 e 1998); inibizione mediata da bisindolilmaleimide I e da H7 (50 – 100µM per 48 ore) della protein-chinasi C α (PKC α) responsabile della fosforilazione di hTERT e hTEP1 (Kang et al., 1999; Ku et al., 1997). Un'altra strategia non selettiva si è basata sull'evidenza sperimentale della formazione di basi accoppiate tra guanine della stessa catena telomerica, che associandosi tra loro generano complessi ciclici, noti come G-quadruplex (Wright et al., 1997; Wellinger et al., 1997). Tale struttura G-quadruplex potrebbe rendere inaccessibile la porzione telomerica alla telomerasi, infatti la regione dell'RNA stampo hTERC richiede un primer di DNA non avvolto perché sia possibile l'estensione dei telomeri. Sono state quindi prodotte delle molecole [1,4-2,6-bis(ω -amminoalcanamido) antracene-9,10-diene ed un derivato porfirinico cationico, il tetra (N-metil-4-piridil) porfina (TMPyP₄)] stabilizzanti queste strutture G-quadruplex (Salazar et al., 1996; Wheelhouse et al., 1998; Su et al., 1997; Zahler et al., 1991). Strategie selettive di inibizione della telomerasi hanno visto l' utilizzo di analoghi delle basi [dideossiguanina (ddG), l'3'-azido-3'-deossitimidina (AZT) e carbovir] (Strahl et al., 1996; Levine, 1996; Yegorov et al., 1996; Melana et al., 1998) che interferirebbero nella neosintesi del telomero a livello del sito catalitico dell'enzima (Collins et al., 1998). Altre strategie selettive hanno comportato l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso dell' mRNA di TP1 (Strahl et al., 1994) ed *in vitro* di DNA oligonucleotidi antisenso (Kondo S et al, 1998 a e b; Glukhov et al., 1998). Recentemente è stato utilizzato, *in vitro* ed *in vivo* su cellule tumorali pancreatiche, un oligonucleotide modificato, il peptide acido nucleico (PNAs) (Norton et al., 1996; Naka et al., 1999), sequenza-specifico, che ibridizza l'RNA più efficacemente degli antisenso ed è più resistente alle proteasi. Infine, un altro approccio selettivo di inibizione telomerica è consistito nel disegno, sulla base della sequenza di RNA di hTERT, di ribozimi hammerhead (Rz), catene di RNA dotate di attività autocatalitica, costituite da una porzione conservata, detta sito catalitico, e da 2 code che hanno una sequenza complementare a quella dell'RNA bersaglio (Yokoyama et al., 1998). Queste molecole si legano molto specificamente ai loro target ribonucleici provocandone la catalisi in particolari aree, solitamente costituite dalle triplette GUC e GUU o CUC.

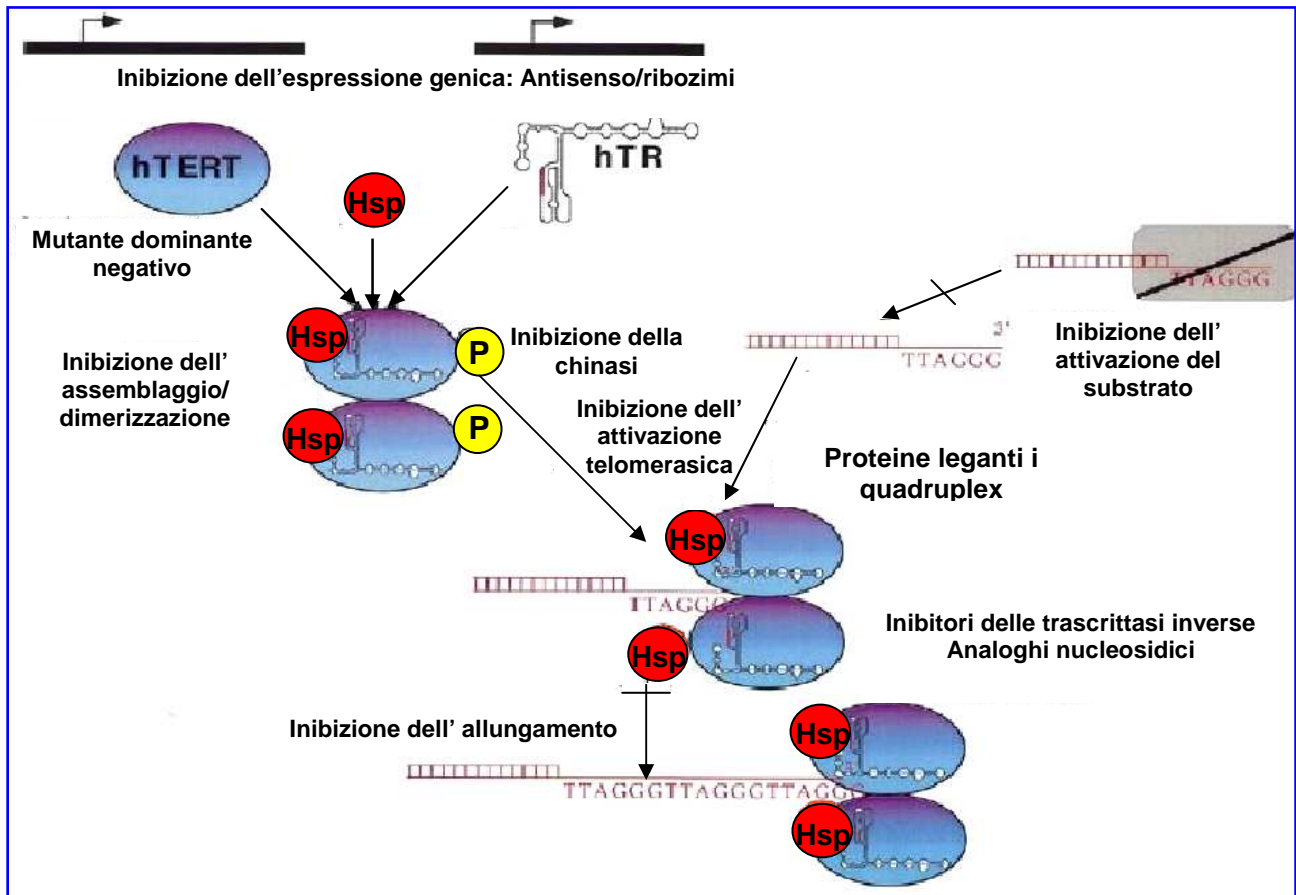


Figura 1.2.2. Possibili strategie di inibizione della telomerasi (Mergny et al., 2002)

Mechanism of action	Agents	Concentration or dose	Inhibition of telomerase activity ^b
G1/S blockers	Methotrexate	10 μ M	No
		50 μ M	No
	5-Fluorouracil	10 μ M	No
G2/M blockers	Vinblastine	10 nM	No
		50 nM	No
	Taxol	10 nM	No
PTK inhibitors	Herbimycin A	100 nM	No
		50 μ M	No
	Quercetin	200 μ M	No
PKA inhibitor	H-89	10 μ M	No
		100 μ M	No
	H-7	50 nM	No
PKC inhibitors	Bisindolymaleimide I	50 μ M	Yes
		100 μ M	Yes
	Etoposide	10 μ M	Yes
TopII inhibitors	Daunorubicin	10 μ M	No
		33 μ M	No
	MMS	5 μ M	No
DNA damaging agents	UV radiation	10 J/m ²	No
		3 μ M	No
	Cisplatin	3 μ M	No
	MMS	1 mM	No

^a Abbreviations: PTK, protein tyrosine kinase; PKC, protein kinase C; PKA, protein kinase A; and MMS, methylmethansulfonate.
^b "No" indicates that the telomerase activity of treated cells is greater than 70% of untreated control.

Figura 1.2.3. Agenti utilizzati nello screening di inibitori della telomerasi. Solo con inibitori delle protein chinasi era possibile ottenere inibizione telomerasica (Ku et al., 1997).

Capitolo 1.3: Complessi organometallici in chemioterapia

1.3.1. Sali di Ferrocenio

La storia degli agenti antitumorali contenenti un atomo metallico incominciò dalla metà degli anni sessanta quando Barnett Rosenberg scoprì le proprietà antitumorali del complesso *cis*-diamino-dicloro-platino(II), noto con il nome di cisplatino o *cis*-DDP. Questo evento migliorò notevolmente la situazione terapeutica per i casi di tumori testicolari, per i carcinomi della testa e del collo e, seppur in modo minore, per i casi di tumore al polmone (Nicolini M. and L. Sindellari eds).

Per quanto riguarda gli agenti citotossici non contenenti platino, un ruolo importante è svolto dai metalloceni bicloruri (Figura 1.3.1.1.).

Questi complessi contengono come atomo centrale (M) un metallo all'interno della serie di transizione *d* come titanio, vanadio, niobio o molibdeno nello stato di ossidazione (IV), due anelli ciclopentadienilici non sostituiti, coordinati π al metallo, e due atomi di cloro covalentemente legati all'atomo centrale e disposti in posizione *cis* tra loro. Il complesso assume così una geometria a tetraedro distorto.

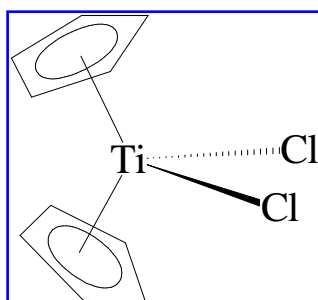


Figura 1.3.1.1. Struttura del Metallocene dicloruro con M=titanio.

Köpf-Maier e Klapötke (Köpf-Maier and Klapötke, 1989; Köpf-Maier, 1985) hanno dimostrato che questo tipo di farmaci antitumorali, in modo particolare il titanocene dicloruro ed il vanadocene dicloruro, sono efficaci contro alcuni tumori, come l'adenocarcinoma del colon, contro i quali gli agenti citostatici a base di platino sono poco attivi.

Il meccanismo di azione di questi complessi non è del tutto chiaro, tuttavia si pensa che, una volta dissociati i due atomi di cloro, il frammento metallico attacchi direttamente il DNA. La coordinazione alla doppia elica del DNA altera il normale funzionamento della cellula conducendola all'apoptosi.

Cis-DDP e metalloceni dicloruri appartengono entrambi alla categoria degli agenti alchilanti in quanto entrambi possiedono gruppi dissociabili che, una volta allontanati, permettono all'atomo metallico di legarsi covalentemente al DNA e di alterare l'attività cellulare.

Non appartengono sicuramente a questa classe, poiché non hanno gruppi dissociabili, altri metalloceni come il ferrocene bis(η_5 ciclopentadienile)ferro(II) ed i sali di ferrocenio (Figura 1.3.1.2; Figura 1.3.1.3.).

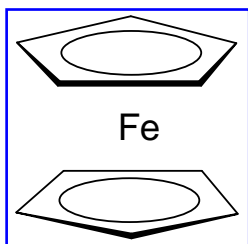


Figura 1.3.1.2. Struttura del Ferrocene

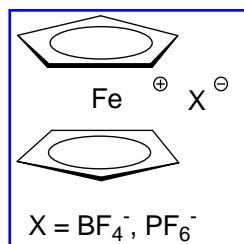


Figura 1.3.1.3. Struttura del Ferrocenio

Le capacità antitumorali dei ferroceni sono state studiate a lungo da Köpf-Maier e Köpf H. i quali hanno concluso il loro studio affermando che non esercitano attività antitumorale (Köpf-Maier et al., 1984; Köpf-Maier, 1985; Köpf-Maier et al., 1989). Risultati opposti sono stati ottenuti, invece, con il ferrocenio bis(η_5 ciclopentadienile) ferro(III) che ha mostrato discrete capacità nell'inibire la crescita delle cellule tumorali. Tale studio ha preso in esame diversi controioni associati al ferrocenio ed ha valutato le proprietà antitumorali dei diversi Sali di Ferrocenio contro le più diffuse neoplasie. Quanto riportato da Köpf-Maier e Köpf H. per il ferrocene non spiega perché esso non abbia attività antitumorale, che sarebbe comunque difficile da rilevare vista la sua scarsa solubilità in ambiente acquoso, e perché nell'ambiente cellulare rimanga tale.

In test *in vitro* i ferroceni sostituiti con gruppi idrofili dimostrano citotossicità dopo 9 giorni di trattamento continuo, giustificabile ipotizzando che tale attività sia dovuta al ferrocenio formatosi all'interno della cellula per l'ossidazione del ferrocene stesso. Il ferrocene, per trattamenti brevi (1h), risulta non citotossico, mentre l'attività dei Sali di Ferrocenio è evidente già dopo 1h di trattamento (Neuse et al., 1990).

In uno studio recente di Osella et al.(2000) è stato effettuato un ulteriore screening sulle proprietà antitumorali, *in vitro* (colture cellulari neoplastiche trattate per 72 h) e *in vivo*, di una serie di derivati idrosolubili del ferrocene e del ferrocene stesso incrementandone la solubilità con ciclodestrina. In questo modo è stato possibile veicolare alla cellula, tramite la ciclodestrina, una maggior quantità della sostanza in esame. I risultati sperimentali non hanno mostrato alcuna attività citotossica per i composti del ferro(II) anche

a tempi lunghi. Analoghe indagini sui corrispettivi ferroceni hanno riconfermato l'attività antitumorale del ferro(III) (Neuse et al., 1990; Osella D. et al., 2000).

Da questi diversi studi *in vitro* emerge come l'attività antiproliferativa dei Sali di Ferrocenio sembri dipendere molto dal tipo di linea cellulare utilizzata per i test. Da queste due considerazioni si può concludere che i ferroceni non hanno attività citotossica e che le proprietà antitumorali sono strettamente legate allo stato di ossidazione del metallo centrale.

Lo stato attuale dell'arte sull'attività antitumorale di ferroceni e ferrocini lascia comunque irrisolti molti quesiti, come le reali solubilità e stabilità di questi composti in ambiente acquoso e come si eserciti l'attività citotossica. Non è chiaro se sia la molecola come tale ad essere citotossica oppure i suoi eventuali prodotti di degradazione. L'attività può essere, infatti, influenzata dai sostituenti sugli anelli ciclopentadienilici ed esiste una relazione dose effetto. Inoltre, rimane da verificare se si possa ottimizzare l'attività di questi composti impartendo loro una qualche selettività.

1.3.1.1. Meccanismo di azione dei Sali di Ferrocenio

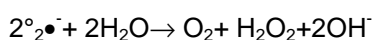
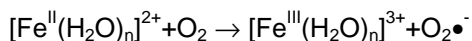
I dati sperimentali ottenuti con test *in vivo* suggeriscono che le proprietà antitumorali dei Sali di Ferrocenio sono strettamente legate allo stato di ossidazione +3 dell'atomo di ferro (Köpf-Maier et al., 1984; Köpf-Maier et al., 1989; Motohashi N, 1990; Osella D. et al., 2000). Queste molecole non possiedono gruppi uscenti in posizione *cis*, propri dei più comuni composti metallici antitumorali, e non danneggiano il DNA attraverso un meccanismo di alchilazione (infatti non è dimostrabile alcun legame inter- ed intra- catena), ma solo per azione radicalica. Un meccanismo proposto per la trasformazione dei Sali di Ferrocenio produce ioni ferro con stato di ossidazione (II) e (III) (Prins et al., 1972).

La prima reazione è una solvatazione:

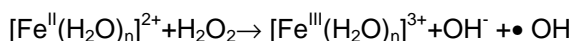


che produce specie ioniche ferro $^{2+}$.

Le reazioni successive seguono un ciclo simile a quello di Haber-Weiss (Minotti et al., 1987 e 1992):



L' H_2O_2 così prodotta subisce la reazione di Fenton (Goldstein et al., 1993):



1.3.2. Complessi a base di Platino

1.3.2.1. Composti del Platino come agenti antitumorali

La scoperta dell'attività antitumorale del *cisplatino* (*cis*-diamminodichloro platino, *cis*-DDP) fatta da Rosenberg nel 1969, ha introdotto nella chemioterapia una nuova classe di farmaci. Da allora lo sviluppo di nuovi complessi a base di Pt-planare ha aperto nuove frontiere sperimentali ed ha portato all'introduzione di nuovi farmaci sul mercato (Figura 1.3.2.1.).

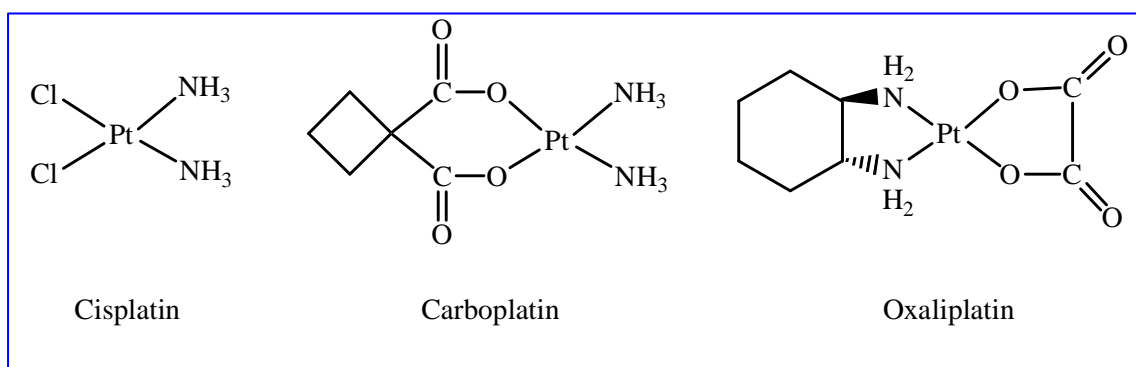


Figura 1.3.2.1. Struttura chimica dei composti più rappresentativi della classe di complessi antitumorali inorganici a base di platino, in uso clinico: Cisplatino (*cis*-diamminodichloroplatino(II)); Carboplatino (ciclobutandicarbossilicdiaminoplatino(II)); Oxaliplatino (*trans*-1,2-diaminocicloesano ossalato platino(II)).

Attualmente la maggior parte dei trattamenti chemioterapici in combinazione contengono il cisplatino od un composto Pt-analogo. Le applicazioni cliniche includono il trattamento di tumori ovarici, del polmone, della testa e del collo, del tratto gastrointestinale superiore, oltre al tumore testicolare, per il quale il cisplatino permette di ottenere, come singolo agente, oltre il 90% di guarigione. L'utilizzo del cisplatino è però limitato dalla scarsa attività nei confronti di alcuni tumori molto comuni, come il carcinoma mammario e quello del colon, e dagli importanti effetti tossici sistemici, come soprattutto la nefrotossicità, l'ototossicità e l'emesi intensa (Dedon et al., 1987; Wong et al., 1999; Cohen et al., 2001). Lo sviluppo di nuove molecole basate sul Pt(II)-planare ha aumentato lo spettro d'azione, ma soprattutto ha ridotto gli effetti tossici presentati sin dall'inizio dal *cis*-platino. Tra le differenti molecole commercializzate, soprattutto il *carboplatino*, diammino(1,1-ciclobutano-dicarbossilato)Pt (II) e l'*oxaliplatino* sono ormai diventati nella pratica clinica farmaci base per i trattamenti antineoplastici (Reed et al., 1996).

3.2.2. Reattività dei complessi del Platino

Anche se alcuni aspetti del meccanismo d'azione dei composti di platino sono ancora incompiuti, l'attività antiproliferativa sembra essere dovuta alla loro capacità di formare legami covalenti con il DNA genomico. Sono stati comunque documentati anche legami irreversibili con l'RNA e alcune proteine, soprattutto del citoscheletro. La veicolazione intracellulare sembra dovuta soprattutto alla diffusione passiva ed il legame intracatenario con il DNA coinvolge preferenzialmente l'atomo di azoto (N) delle basi nucleotidiche (Zipp et al., 1977). Poiché l'azoto in posizione 7 della guanina è reso più nucleofilo dal gruppo carbonilico in posizione 6, questa base sembra essere più suscettibile al legame con i composti di platino. Anche l'adenina in posizione N1 e la citosina in posizione N3 sono suscettibili all'attacco dei composti a base di platino(II). La diversa affinità di legame trova spiegazione nel fatto che gli atomi N1 dell'adenina ed N3 della citosina sono coinvolti nei legami idrogeno di accoppiamento delle basi complementari e quindi risultano meno disponibili all'attacco del metallo, mentre l'azoto in posizione 7 della guanina è esposto sulla superficie del solco maggiore dell'elica di DNA, in una posizione quindi accessibile al legame con il Pt. Il legame Pt-N7G risulta molto stabile e scindibile solo con agenti forti nucleofili (tiourea, acido cianidrico). L'effetto finale del legame irreversibile con la base è la distorsione conformazionale della catena nucleotidica (Johnson et al., 1980; Pinto et al., 1985; Brabec et al., 1993) (Figura 1.3.2.2.a.).

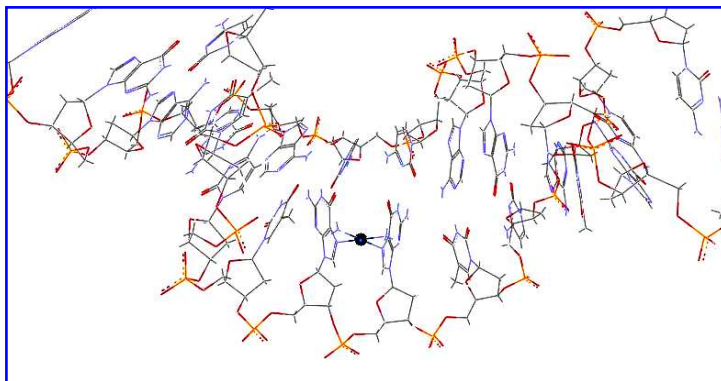


Figura 1.3.2.2.a. Distorsioni della catena di DNA (Sundquist and Lippard, 1990)

Le differenti modalità di legame del *cis*-DDP con il DNA sono riassumibili secondo lo schema di seguito riportato (Fitchinger-Schepman et al., 1985) (Figura 1.3.2.2.b.).

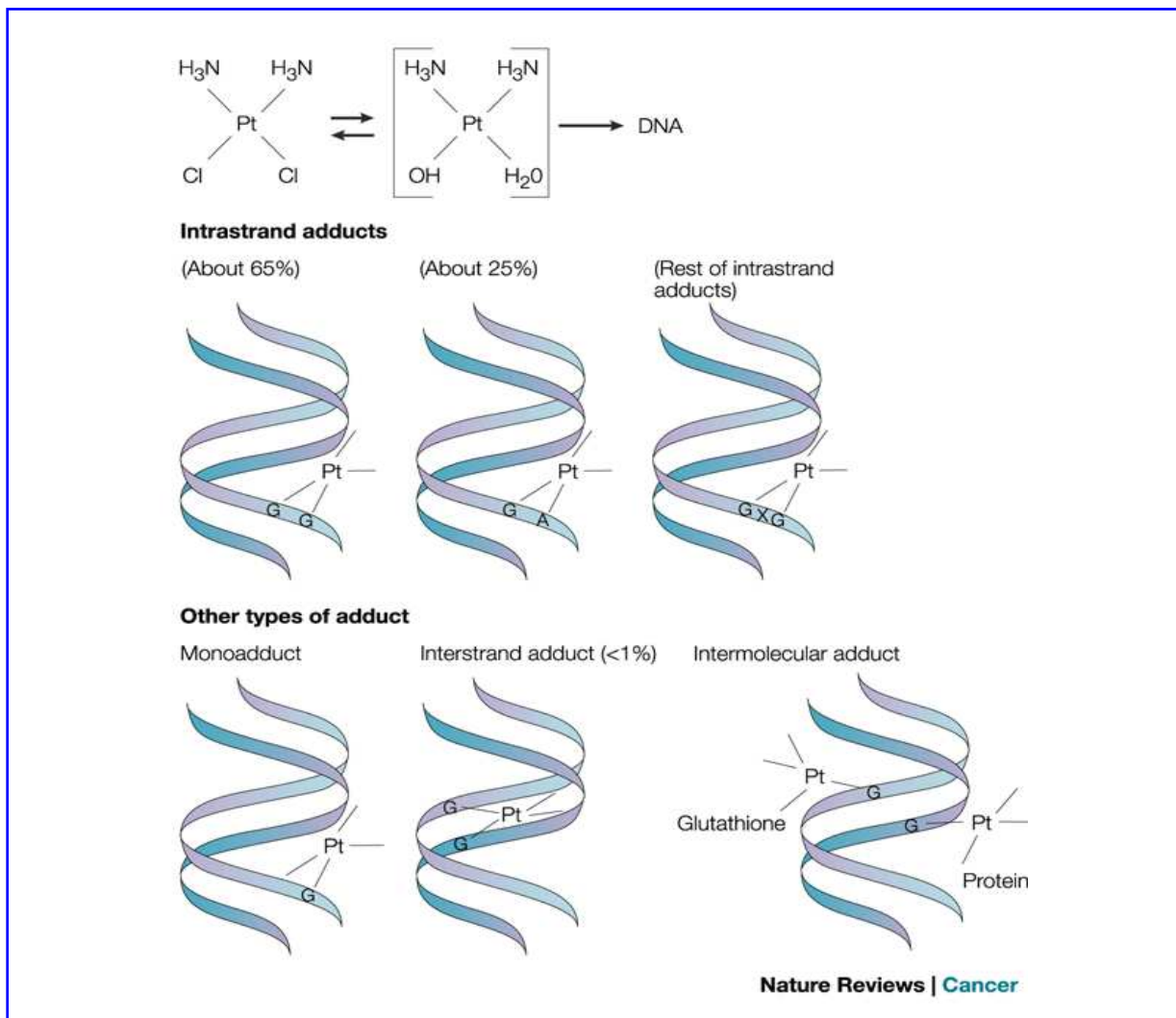


Figura 1.3.2.2.b. Formazione di legami irreversibili tra il complesso di platino attivato e strutture cellulari quali DNA, RNA e peptidi. **Pt** = Farmaco a base di platino. **Addotto** = Legame irreversibile. Addotto **Intracatenario** = legame del Pt sullo stesso filamento: a) con due guanine consecutive; b) con una guanina ed una adenina; c) con due guanine non consecutive. Addotto **Intercatenario** = legame del Pt su due filamenti differenti.

Gli addotti quindi possono essere monodentati o bidentati, coinvolgendo 2 basi puriniche adiacenti sul medesimo filamento di DNA o intervallate da un'altra base (legame intracatena) ed in misura minore due G appartenenti a filamenti opposti (legame intercatena). L'identità degli atomi delle proteine coinvolti nel legame Pt-proteina-DNA non è chiara: potrebbero essere atomi N dell'istidina e di zolfo della cisteina e metionina, in virtù dell'affinità dimostrata dal Pt per i donatori di zolfo. La L-metionina (L-MetH), infatti, gioca un ruolo importante nel metabolismo dei farmaci antitumorali a base di Pt (Vrana et al., 2002). Dati recenti suggeriscono che il cisplatino reagisce con i residui metioninici dell'albumina plasmatici umana (Ivanov et al., 1998). Il legame con l'atomo di zolfo della metionina è reversibile e può essere rimpiazzato dalla GN7. La formazione di legami covalenti tra 2 atomi nucleofili di macromolecole rende i complessi di Pt

simili agli agenti bifunzionali alchilanti (es. mostarde azotate), ma si differenziano da questi ultimi perché la reazione dei leganti conserva la configurazione spaziale degli angoli di legame invece di invertirla. Ai fini dell'attività antitumorale il legame più efficace sembra essere quello tra 2 guanine dello stesso filamento (1,2-intracatena) (Sherman et al., 1987), formando un anello chelato di 17 atomi (non realizzabile dai composti *trans* per problemi di ingombro sterico). Invece gli addotti 1,3-intracatena, formando un anello di 23 atomi (Sundquist et al., 1990) comportano delle distorsioni elevate della doppia elica, rendendo il danno facilmente riconoscibile dagli enzimi riparativi (Sherman et al., 1987, Cohen et al., 2001). I complessi del Pt maggiormente attivi come antitumorali hanno una struttura planare-quadrata Pt (II), od ottaedrica Pt (IV). Queste molecole contengono due leganti in conformazione *cis*, moderatamente labili (cloruri nel *cisplatin* e *transplatin*) e due leganti amminici, elettrondonatori ma non sostituiti in condizioni fisiologiche. I 2 ioni cloro dei complessi di Pt(II) sono uscenti e vengono scambiati con 2 molecole di acqua, solo all'interno della cellula, dove la concentrazione di Cl risulta minore (~4mM) rispetto all'ambiente extracellulare plasmatico (~100 mM). La reazione alla base della reattività del *cisplatin* può essere così schematizzata (Bernes-Price et al., 1992) (Figura 1.3.2.2.c.; Figura 1.3.2.2.d.):

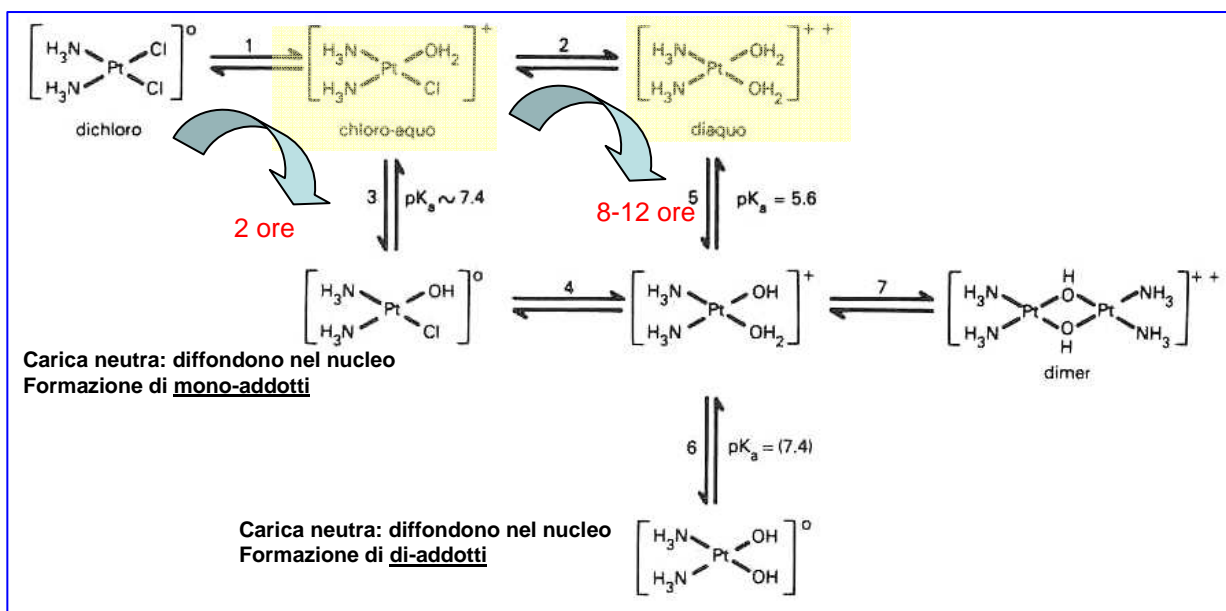
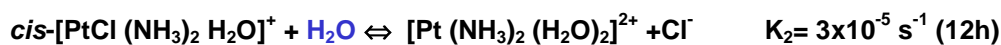
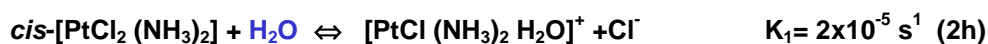


Figura 1.3.2.2. c. Meccanismo d'azione del cisplatin (vedi testo per i dettagli).

Il primo passaggio prevede la sostituzione di un solo atomo di cloro con H₂O ed è determinante per la velocità della reazione, che risulta uguale per i due isomeri (*trans* e *cis*) (Hindmarsh et al., 1997; Davies et al., 2000). Il composto di idratazione risultante, *cis*-[PtCl(NH₃)₂H₂O]⁺, è già in grado di formare monoaddotti ed essendo carico positivamente è attratto elettrostaticamente dallo scheletro negativo di ioni fosfato della catena nucleotidica (Sherman et al., 1987; Poklar et al., 1996). La reazione si evolve verso la formazione di complessi bifunzionali, a seguito della perdita del secondo ione cloro. La velocità di reazione dell'ultimo passaggio sembra più lenta per il composto *trans*-DDP (Bancroft et al., 1990). Una differenza di velocità di reazione e di cinetica intracellulare è alla base della diversa suscettibilità delle cellule a tali composti.

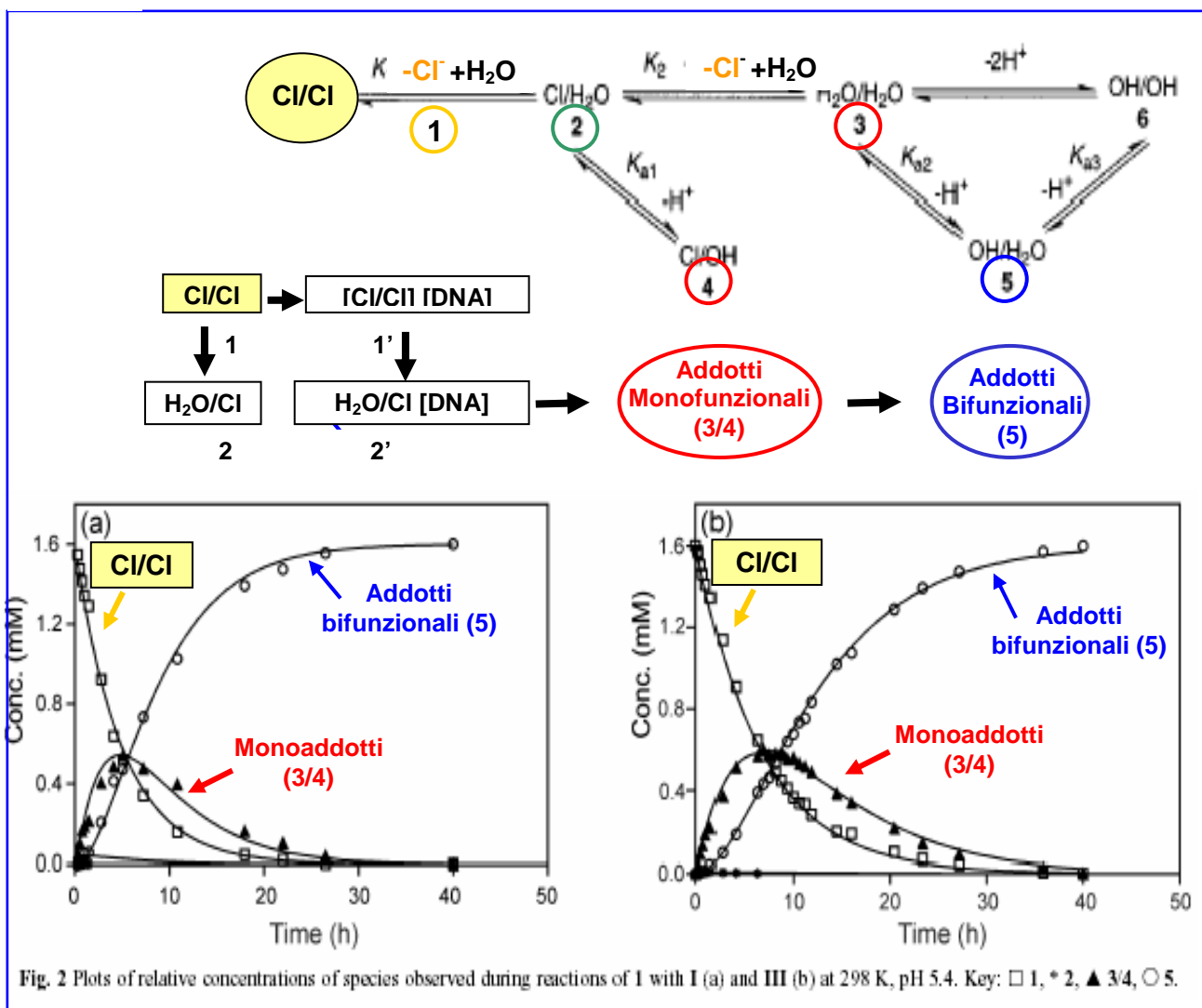


Figura 1.3.2.2.d. Reazioni dei composti di Platino. Nel compartimento intracellulare i **2 Cl⁻** vengono persi poiché $[Cl]_{intracell} < [Cl]_{extracell}$, quindi si ha la formazione del composto di idratazione, il *cis*-[PtCl(NH₃)₂H₂O]⁺, fortemente reattivo. La carica (+) totale di tale complesso permette il direzionamento verso la carica (-) caratteristica della catena nucleotidica con la formazione di addotti Pt-DNA. Nel grafico si può osservare come alla diminuzione della concentrazione degli addotti monofunzionali segue un aumento dei bifunzionali. (Sherman et al., 1987; Poklar et al., 1996; Davies et al., 2000 and 2003).

Il grado di dissociazione del Pt dal DNA è estremamente lento a 37°C, quindi il legame del *cisplatin* al DNA è cineticamente, piuttosto che termodinamicamente, controllato. Composti contenenti in *cis* due gruppi più labili dei cloruri, quali lo ione nitrato o solfato, manifestano un'elevata tossicità dovuta alla loro eccessiva reattività, mentre l'isomero *trans*, così sostituito, è inattivo. Anche i complessi monofunzionali, [PtCl(dien)]Cl] con un solo legante labile, non manifestano alcuna attività antitumorale (Guo et al., 1997). I complessi ottaedrici del Pt(IV) sembrano essere sostanzialmente dei profarmaci, in quanto una volta entrati nella cellula reagiscono con il glutatione (GSH) e vengono ridotti a complessi di Pt (II) (Eastman, 1987; Pérez et al., 2003). In conclusione sembra che la reazione responsabile dell'attività antitumorale richieda un attacco bifunzionale al target biologico. Gli addotti del Pt con il DNA sono responsabili di danni soprattutto in fase di replicazione. La forcella di replicazione si blocca in corrispondenza dell'addotto e le proteine del *mismatch repair* determinano una cascata di segnali che portano all'arresto del ciclo cellulare e quindi all'apoptosi (Fram et al., 1985). È stato dimostrato un fenomeno di sintesi "translesione" di DNA da parte della DNA-polimerasi μ che, bypassando gli addotti Pt-DNA indotti da *cisplatin* e *oxaliplatin*, provoca mutazioni per delezione (Havener et al., 2003). Il danno indotto sul DNA sembra indurre un aumento dell'espressione della proteina p53, che può agire secondo due vie, e cioè bloccando il ciclo cellulare e consentendo così la riparazione del genoma o, se il danno è grave, attivando i meccanismi che portano all'apoptosi cellulare (Vaziri et al., 1996; Fuertes et al., 2003)

1.3.2.3. Reattività in rapporto alla configurazione *trans*

Le relazioni struttura-attività dei complessi del Pt richiedono solitamente la configurazione *cis*: gli isomeri *trans* sono sempre meno attivi o inattivi nell'inibire la replicazione e trascrizione del DNA (Farrell, 1996; Pérez et al., 2000). Inoltre è stato dimostrato che componenti cellulari di detossificazione, quale il glutatione reagiscono molto più velocemente con gli addotti *trans*-DDP monofunzionali che con quelli *cis* (Bancroft et al., 1990). Tuttavia, sono riportati in letteratura studi che utilizzano complessi *trans*-Pt con ligandi planari, come la piridina (Bierbach et al., 1997), pirimidina, purina o anilina, dotati di notevole attività, sia *in vitro* sia *in vivo*, quasi equivalente a quella dei corrispondenti *cis*-isomeri (Farrell et al., 1992; Goddard et al., 1996), come ad esempio il recentissimo tri-Pt complesso *BBR 3464* (Di Biasi et al., 1998; Perego et al., 1999). Le strutture in conformazione *trans*-Pt (II) contenenti leganti aromatici possono agire sia per intercalazione del legante planare che per formare un monoaddotto, differenziandosi così dal tipo di

interazione dei complessi *cis* (Zakovska et al., 1998). È stata recentemente evidenziata l'importanza dell'ingombro sterico dei leganti carrier nel meccanismo d'azione dei complessi in conformazione *trans* (Natile et al., 2001).

I composti *trans* con leganti planari amminici, quali il *trans*-[PtCl₂(NH₃)(tiazolo)] ed il *trans*-[PtCl₂(NH₃)chinolina], si legano monofunzionalmente al DNA, con una velocità simile al *transplattino* ma formano più legami intercatena rispetto a quest'ultimo e comunque più stabili. È stato dimostrato come l'addotto monofunzionale *trans*-[PtCl₂(NH₃)(tiazolo)]-DNA inibisca la sintesi di DNA creando distorsioni conformazionali locali simili a quelle prodotte dagli addotti 1,2-GG intracatena del *cisplattino* (Kasparkova et al., 2002). Il *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimetilammino)(isopropilammina)], Pt(IV) promuove efficientemente legami intercatena con il DNA e soprattutto rotture a singola catena che sono responsabili della citotossicità su tumori *cisplattino*-resistenti (Pérez et al., 2001). I corrispondenti *trans* -Pt (II) senza i gruppi idrossile assiali risultano inattivi, probabilmente per inattivazione extracellulare prima del raggiungimento *in vivo* del tumore, probabile conseguenza del loro alto grado di legame alle proteine plasmatiche (Pérez et al., 2003). I complessi *trans*-[PtCl₂(*E*-iminoetere)₂], con proprietà intermedie tra le ammine aromatiche e alifatiche, manifestano un'attività antitumorale di gran lunga maggiore degli analoghi *cis* e le loro proprietà sembrano dipendere dal gruppo iminoetere. Sebbene questi complessi *trans*-iminoetere reagiscano molto più lentamente con il DNA rispetto al *cisplattino*, formando preferenzialmente addotti monofunzionali con G dopo lungo tempo di incubazione, risultano molto efficaci nell'inibire la sintesi del DNA, la proliferazione cellulare e la trascrizione, anche se non inducono importanti cambiamenti conformazionali locali del DNA (Leng et al., 2000; Natile et al., 2001).

1.3.2.4. Sintesi di nuovi composti a base di Platino

Schematicamente si possono così riassumere i meccanismi che determinano la comparsa della resistenza al *cis*-DDP, fenomeno che ha condotto allo studio e sintesi di nuovi composti (Pérez, 1998):

1) alterazioni dell'accumulo del farmaco, che per la maggior parte entra nella cellula per diffusione passiva ma sembra in parte legato anche ad un processo energia-dipendente, dove la Na⁺/K⁺ ATPasi gioca un ruolo importante (Gately et al., 1993). Recenti studi hanno dimostrato una correlazione tra i cambiamenti di uptake di Pt ed efflusso del rame suggerendo che il *cisplattino* attraversi la membrana cellulare con un sistema di trasporto mediato da un carrier che normalmente controlla l'omeostasi del rame (Katano et al., 2002).

L'uptake del *cisplatino* è direttamente proporzionale alla sua concentrazione, non è inibito da analoghi strutturali e non è saturabile (Gately et al., 1993). Il diminuito accumulo è legato sia ad una diminuzione del flusso in entrata che ad una diminuzione del legame al DNA o del sequestro intracellulare o, ancora, ad un aumento del flusso in uscita (Loh et al., 1992). La resistenza non sembra dipendere dall'iperpressione della glicoproteina-P o *multidrug-resistance protein 1* (MRP1). L'esporto attivo del *cisplatino* dalla cellula è uno dei meccanismi più importanti di resistenza ed una pompa GS-X, ATP-dipendente per i coniugati con GS, è in grado di espellere i complessi GS-Pt dalle cellule tumorali. È stato dimostrato come la proteina MRP2, trasportatrice di anioni organici, sia in grado di esportare il *cisplatino* coniugato con il glutatione inducendo resistenza a tale composto (Guminsky et al., 2002).

2) quenching citosolico del farmaco, dovuto ad un aumento della concentrazione intracellulare di composti sulfidrilici o di enzimi che coniugano i sulfidrilici (vie di detossificazione). È dimostrato, infatti, che il glutatione (GSH), presente intracellularmente a concentrazioni 3-10 mM, protegge la cellula dal danno indotto dal *cis-DDP* sia diminuendo le specie reattive in grado di legarsi al DNA, sia impedendo la conversione del DNA-monoaddotto, relativamente poco tossico, nell'addotto bifunzionale responsabile dell'effetto tossico (Mistry et al., 1991). Un'altra classe di sostanze importanti implicate nei processi di detossificazione da metalli pesanti, oltre che nell'omeostasi dello zinco, sono le metallotioneine (MTs), una famiglia di proteine ricche di cisteina (30%), quindi degli ottimi bersagli per agenti elettrofili come il *cis-DDP*. Le MTs sembrano essere in grado di reagire con il *cis-DDP*, inattivandolo e quindi inducendo resistenza (Kasahara et al., 1991).

3) alterazioni della capacità riparativa da parte della cellula tumorale. La capacità riparativa del danno prodotto al DNA dal farmaco è importante per stabilire la sensibilità di una linea cellulare: infatti, cellule che presentano deficit nei meccanismi di riparazione risultano ipersensibili al chemioterapico (Chu, 1994). D'altra parte un'aumentata capacità riparativa del DNA spesso si accompagna allo sviluppo di resistenza: in linee cellulari resistenti, infatti, è stato dimostrato un aumento del gene di riparazione ERCC-1 del DNA specifico per i legami crociati intercatena (Eastman et al., 1988). Inoltre una proteina del gruppo ad alta mobilità (HMG1), implicata nel riconoscimento del danno al DNA, risulta trascrizionalmente iperespressa in cellule resistenti (Nagatani et al., 2001). Anche se i meccanismi specifici di tali processi di riparazione sono tuttora poco noti, emerge che la riparazione può avvenire anche dopo un periodo di ore o giorni dall'allontanamento del farmaco e sembra essenzialmente dipendere dal riconoscimento del sito di platinazione, dal taglio e dalla rimozione delle basi colpite o, ancora, dalla sintesi e riposizionamento della sequenza riparata da parte di un complesso multienzimatico di riparazione per escissione di nucleotidi. È stato inoltre osservato un aumento

dell'espressione di 4 importanti enzimi coinvolti in processi di riparazione e sintesi del DNA: la diidrofolato-reduttasi, la timidina-5-fosfato-sintetasi, la timidilato-chinasi e la DNA polimerasi (Scanlon et al., 1989)

4) alterazione della via di attivazione dell'apoptosi (Zunino et al., 1997; Gonzalez et al., 2001).

Resta ancora difficile stabilire quale sia l'evento iniziale dello sviluppo della resistenza al *cis*-DDP; è invece probabile che tutti questi meccanismi facciano parte di una risposta multifattoriale collegata agli stress dovuti alla selezione operata dal farmaco.

Tutti gli analoghi del *cis*-DDP, cosiddetti della "seconda generazione" (es. *carboplatino*, *oxaliplatino*, *malonatoplatino*, *iproplatino*), hanno strutture molto simili a quella del *cis*-DDP e quindi il loro meccanismo di interazione con il DNA non è molto diverso da esso (Figura 1.3.2.4.) Cellule resistenti al *cisplatinato* per diminuzione del suo accumulo mostrano una diminuzione di accumulo anche di *carboplatino*, *ormaplatino* ed *oxaliplatino*.

Analoghi strutturalmente differenti (modificazioni coinvolgenti il cloruro, detto leaving group, od il gruppo di amminico, detto carrier ligand) potrebbero, invece, possedere attività antitumorale completamente diversa o essere attivi in tumori che hanno acquisito resistenza ai tradizionali complessi del Pt. Questi agenti, che sono ancora per la maggior parte nelle prime fasi dello sviluppo, potrebbero interagire con le cellule tumorali in diversi modi: alterare l'uptake cellulare, legarsi al DNA in maniera differente e causare cambiamenti conformazionali, alterare la sintesi del DNA od i meccanismi di riparo. Tra i nuovi composti, quelli che hanno dimostrato i risultati più promettenti sono i complessi multinucleari del Pt, come i *bis-Pt complessi* (Farrell et al., 1990) o i *tri-Pt complessi cationici* (Di Blasi et al., 1998; Perego et al., 1999). Il complesso trinucleare *BBR3464*, in fase II avanzata per il trattamento di tumore ovarico, gastrico, al polmone, interagendo con il DNA forma legami intercatena di lungo raggio con significativo svolgimento della doppia elica ed una conversione irreversibile da conformazione B-DNA a Z-DNA, che inibisce la sintesi di DNA *in vitro* (Perego et al., 1999). Recentemente è aumentato l'interesse per composti contenenti il sostituito 1,2-diamminocicloesano (DACH) nella posizione del carrier ligand dal momento che questo gruppo sembra conferire la capacità di aggirare la resistenza al *cis*-DDP (Siddik et al., 1993). Il primo di questi DACH-derivati ad entrare nella sperimentazione clinica è stato l'*ormaplatino* (originariamente chiamato *tetraplatino*), che mantiene uno spettro antitumorale simile al *cis*-DDP, ma si dimostra attivo contro diverse linee cellulari con resistenza acquisita (Tutsch et al., 1999). Studi preclinici hanno confermato che un altro composto DACH-derivato, l'*oxaliplatino* (Raymond et al., 2002), ormai da tempo commercialmente

disponibile, ha uno spettro d'azione non sovrapponibile al *cis*-DDP e *carboplatino*, infatti risulta attivo su tumori del colon e su linee cellulari resistenti al *cis*-DDP. È dimostrato che, nonostante i livelli totali di addotti Pt-DNA, legami intercatena e DNA-proteina siano significativamente minori per l'*oxaliplatino* rispetto al *cisplatin*, l'*oxaliplatino* induce morte cellulare più efficacemente del *cisplatin*. Il ligando DACH infatti potrebbe indurre lesioni nel DNA non riconoscibili dai sistemi di riparo (Zdraveski et al., 2002). Tra le numerose molecole in fase di studio più o meno avanzata, è da segnalare il *JM216* (*satraplatino*), [bis-acetatoamminodicloro(cicloesilammino)Pt(IV)] (Kelland et al., 1993), attivo per somministrazione orale e con attività superiore al *cisplatin* sia *in vitro* su linee cellulari umane di carcinoma ovarico, polmonare a piccole cellule e cervicale che *in vivo*.

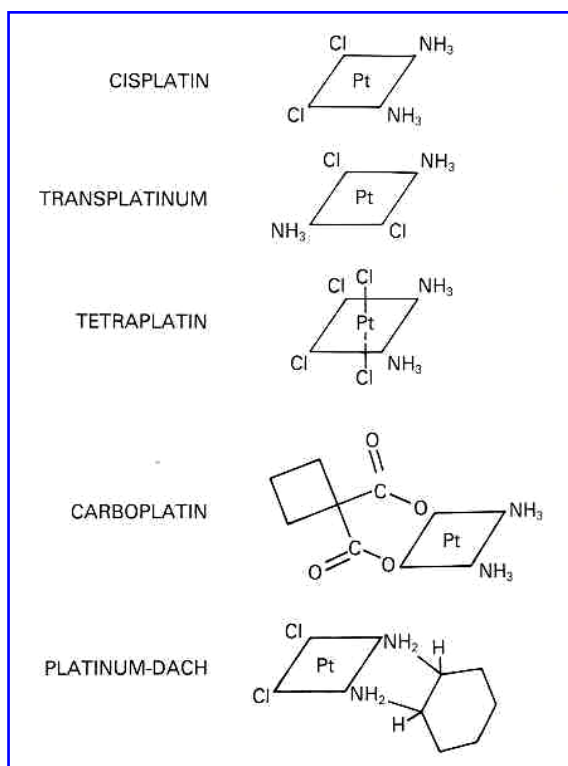


Figura 1.3.2.4. Complessi di coordinazione del platino. La struttura base è quella quadrato-planare del Pt(II). Derivati Pt(IV) possiedono attività biologiche meno evidenti. I farmaci più attivi hanno isomeria *cis*-. Sono farmaci che non sono ciclo cellulare-specifici. Sono utili anche nei tumori con basso indice di proliferazione, ma la loro attività è superiore nelle cellule in fase G1-S.

1.3.2.5. Telomerasi e Platino.

Una possibile strategia antineoplastica specificamente diretta contro la telomerasi, che strutturalmente possiede due componenti ad RNA (hTERT e hTERC) molto ricche in guanina (Feng et al.,

1995; Burger et al., 1997; Harrington, 2003), potrebbe utilizzare complessi metallorganici a base di platino(II), data l'alta affinità di legame del Pt per tali basi nucleotidiche (Zipp et al., 1977). È dimostrato inoltre come complessi del Pt si leghino bene a molecole di RNA, soprattutto se in struttura terziaria (Pascoe et al., 1974). Si potrebbero ottenere molecole adiuvanti nella chemioterapia attuale, che, come hanno dimostrato recenti studi, bloccando il ciclo proliferativo, aumenterebbero la suscettibilità verso i chemioterapici (ad esempio lo stesso *cis*-DDP) riducendo i livelli di resistenza (Kondo et al., 1998). Recentemente differenti risultati concernenti l'inibizione telomerasica da parte del *cisplatino* sono stati riportati da diversi gruppi, in rapporto al tipo cellulare considerato. Alcuni (Burger et al., 1997) riportano come il trattamento con *cisplatino* di cellule umane di cancro al testicolo sembri sopprimere l'attività telomerasica in modo dose-dipendente. Alla concentrazione utilizzata in tali esperimenti (100 μ M) però il *cisplatino* è fortemente citotossico, e l'inibizione della telomerasi osservata è una conseguenza della tossicità aspecifica che modifica l'espressione a livello genico di questo enzima (inibizione della trascrizione di hTERT). È stato proposto, infatti, che vi possa essere un'interazione diretta dei composti del Pt anche a livello genomico, supportati dal fatto che la regione promoter dell'enzima (hTERT) è ricca in G (Horikawa et al., 1999). Il *cisplatino* è risultato un efficace inibitore *in vitro* della telomerasi di cellule di melanoma coroidale dell'occhio umano, con effetto dose e tempo dipendente (Cheng et al., 2003). Cellule di cancro ovarico umano, A2780 trattate con *cisplatino* hanno evidenziato una down-regolazione dell'attività telomerasica, non dimostrabile nella linea resistente a tale farmaco A2780CP (Kunifuji et al., 2002). Al contrario altri riportano che il trattamento di cellule di carcinoma nasofaringeo con *cisplatino* (\geq 48h, 2 μ M) induce un arresto della crescita simile alla senescenza, senza nessuna inibizione dell'attività telomerasica (Wang et al., 1998) Il 2,3-dibromosuccinato[2-(metil-ammino-metil)piridina]Pt(II), denominato *E*, ha dimostrato recentemente un marcato effetto antitelomerasico su una linea cellulare umana di epatocarcinoma, (HepG2, 1 μ M, IC₅₀ 0.8 μ M), ipotizzandone un'interazione diretta con TERT (Furuta et al., 2003). I diversi risultati di questi studi possono essere spiegati con una differente soppressione dell'espressione del gene che codifica hTERT e/o inibizione di hTERT, che potrebbero contribuire all'azione del *cisplatino* in aggiunta alla formazione dei ben noti addotti. Alcuni gruppi hanno dimostrato una stretta correlazione tra il trattamento con *cis*-DDP ed altri citotossici e l'attività residua di telomerasi utilizzando questi dati come indicatori dell'attività citotossica o come indicatore prognostico (Faraoni et al., 1999). L' inibizione della telomerasi incrementa l'apoptosi indotta da *cisplatino* di cellule di glioblastoma (Kondo et al., 1998). Sia il *carboplatino* che l'*oxaliplatino* non sembrano avere effetti inibitori sulla telomerasi (Blommaert et al., 1995; Woyarowski et al., 1998).

1.3.3. Complessi a base di Osmio

Il cisplatino ed il carboplatino rivestono un ruolo chiave nella chemioterapia e l'interesse per i farmaci a base metallica si è molto diffuso negli anni recenti. I possibili vantaggi nell'uso di metalli di transizione diversi dal platino sono: siti di coordinazione addizionali; alterazioni dell'affinità di legame; cinetiche di sostituzione. Dati sperimentali preliminari hanno evidenziato che alcuni complessi organometallici a base di osmio, pur possedendo una limitata citotossicità, erano in grado di ridurre in modo significativo la capacità proliferativa di cellule tumorali. Questi composti di osmio differiscono da altre molecole a base metallica poichè non possiedono proprietà alchilanti (legami intra- e intercatena) e non hanno gruppi uscenti (Figura 1.3.3.).

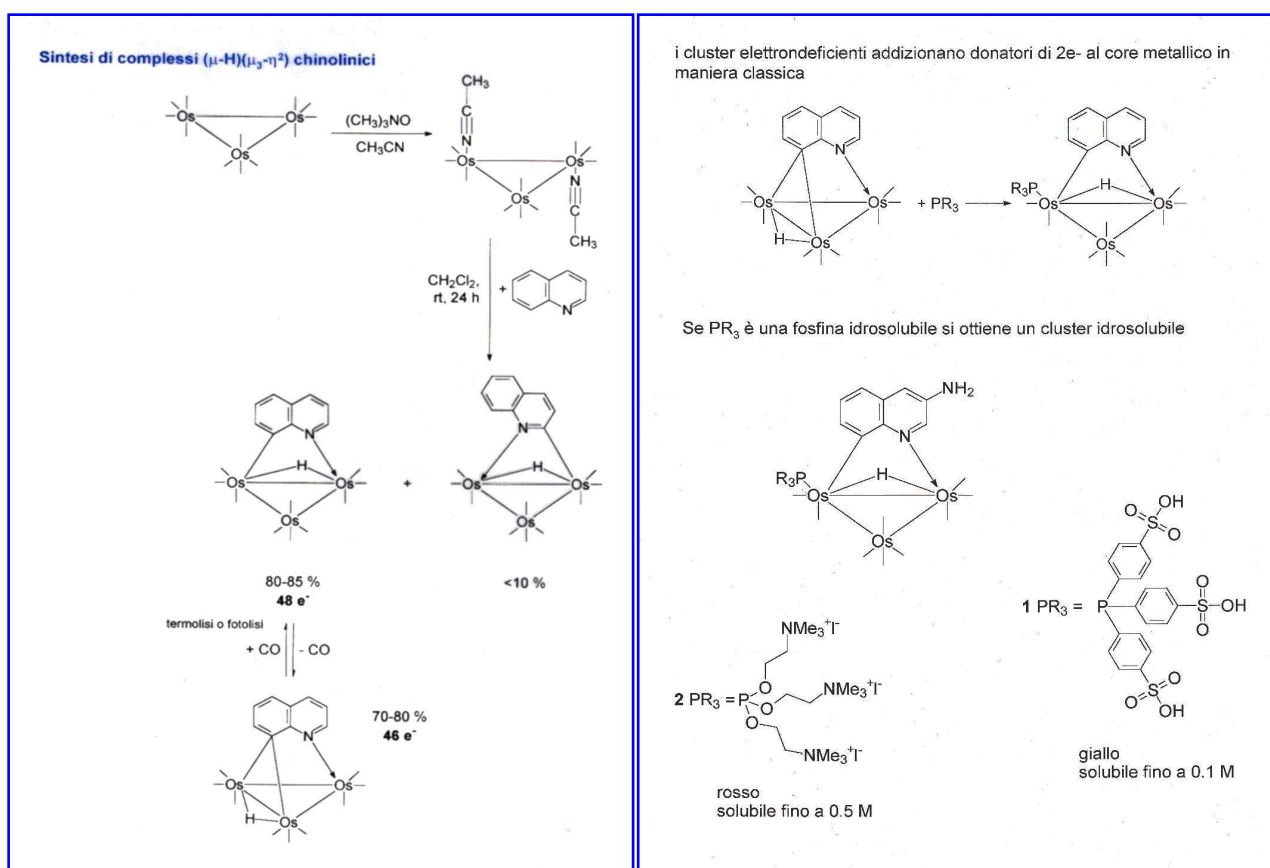


Figura 1.3.3. Sintesi di composti a base di Osmio. (A.Bar Din., 1998; M. Joynal Abedin, 1999).

SCOPO DEL LAVORO 1

L'enzima telomerasi è attivo in una grande percentuale di tumori e quindi, oltre ad essere un marcatore tumorale, è un BERSAGLIO TERAPEUTICO SELETTIVO per nuovi farmaci antineoplastici.

Per attuare una possibile strategia antineoplastica specificamente diretta contro questo enzima, sono stati disegnati, sintetizzati ed analizzati alcuni complessi metallorganici partendo dalle osservazioni sotto riportate, relative a ciascuna classe di composti.

Alcuni dei vantaggi derivanti dall'utilizzo di differenti metalli di transizione possono includere siti di coordinazione aggiuntivi, alterazioni nell'affinità del ligando e cinetiche di sostituzione.

1.1. Composti a base di Sali di Ferrocenio

- Valutare la stabilità di differenti composti a base di ferrocenio originali e di nuova sintesi e del ferrocene in condizioni fisiologiche, per mezzo della spettroscopia UV-vis.
- Determinare gli effetti *in vitro* e comprendere il meccanismo d'azione di questi composti utilizzando il modello cellulare MCF-7.
- Studiare la possibile relazione stabilità-citotossicità di questa classe di composti.

1.2. Composti a base di Platino

I composti a base di platino (II) sfruttano la proprietà del Pt di legare ad alta affinità le basi nucleotidiche ed in particolare la guanina, di cui è ricca la componente ad RNA dell'enzima stesso.

1.3. Composti a base di Osmio

Questi composti sono caratterizzati da un grande **ingombro sterico** potenzialmente in grado di bloccare la subunità catalitica dell'enzima (*hTERT*).

MATERIALI E METODI 1

1.4.1. Criteri per la scelta di composti con potenziale attività antitelomerica

La sintesi dei complessi a base di Sali di Ferrocenio, Platino ed Osmio, oggetto di questo studio, è stata effettuata nel Laboratorio di Chimica Bioinorganica del Prof.Osella dell'Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", sede di Alessandria.

1.4.1.1. Composti a base di ferrocenio

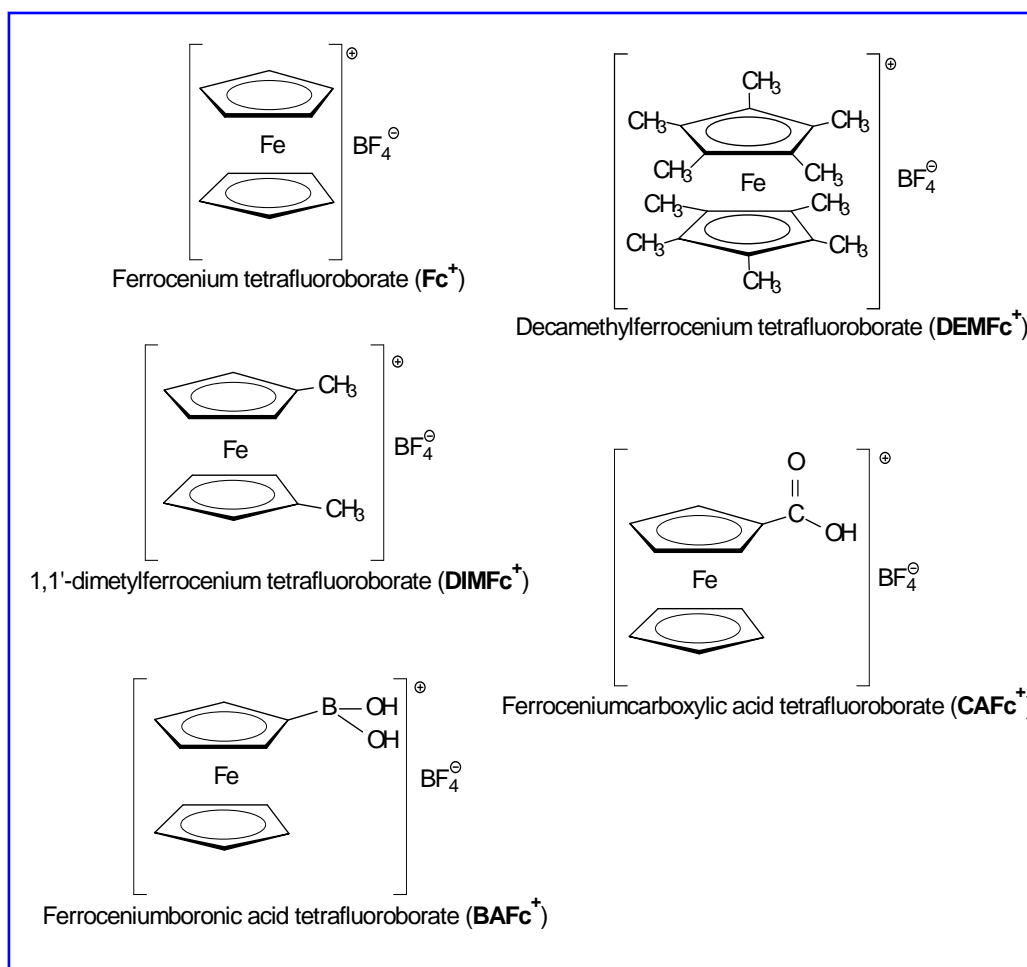


Figura 1.4.1.1. Struttura dei differenti Sali di Ferrocenio analizzati.

Sono stati sintetizzati 5 derivati solubili e stabili del ferrocenio per ossidazione dei relativi ferroceni commerciali: ferrocenio tout court (Fc⁺), 1,1'-dimetilferrocenio (DIMFC⁺), decametilferrocenio (DEMFC⁺), ferrocenio acido boronico (BAFC⁺) e ferrocenio acido carbossilico (CAFC⁺) (Figura 1.4.1.1.). Come controione è stato utilizzato il tetrafluoroborato (BF₄[⊖]), scelto in base alle sue proprietà non coordinanti e alla possibilità di ottenere composti cristallini in fase di sintesi.

1.4.1.2. Composti a base di Platino

Sono stati analizzati complessi metallorganici originali in configurazione *cis*- e *trans*- Pt(II), funzionalizzati con dicloro-dipiridina e differenti gruppi polari (Figura 1.4.1.2. a e b). Le molecole sono state caratterizzate attraverso l'uso di spettrometria di massa (desorption chemical ionisation, DCI; liquid secondary ion, LSI; ed electron spray ionisation, ESI), spettroscopia Raman, spettrometria NMR multinucleare (^1H , ^{15}N , ^{17}O , ^{31}P , ^{195}Pt) (Cavigliolo et al., 2000). Le prime molecole sintetizzate possedevano come gruppi sostituenti del Pt uno o due gruppi isochinolinici. È stato scelto questo sostituente in quanto la molecola 1(5-isochinolinasolfonil)-2-metil-piperazina (commercialmente nota come H7) si è dimostrata in grado di inibire la telomerasi (50-100 μM , 48h) (Ku et al., 1997) indirettamente agendo sulla PKC, responsabile della fosforilazione e attivazione della subunità catalitica hTERT e hTP1 (Li et al., 1997). Si sono sintetizzati inoltre derivati del *cis*-dicloro Pt con chinoline sostituite in posizione 5 con gruppi polari quali $-\text{OH}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$, o ionizzabili come $-\text{SO}_3\text{H}$, al fine di modulare la solubilità in solvente acquoso. La trasformazione del gruppo solfonico in sulfamidico può rendere ulteriormente simile la struttura (e quindi probabilmente l'attività) del braccio reattivo a quella della molecola di riferimento H-7. I derivati bisostituiti $[\text{PtCl}_2(\text{isochinolina})_2]$ mostrano una limitatissima solubilità in soluzioni fisiologiche. Inoltre il forte ingombro sterico dei due gruppi aromatici in *cis*, non coplanari, come suggerito da studi preliminari di meccanica molecolare, può ostacolarne la diffusione. Composti monosostituiti tipo $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{isochinolina})]$ sembrano coniugare una maggiore solubilità con un ridotto ingombro sterico. È noto in letteratura che composti di questa natura manifestino una più bassa tossicità per le cellule, quasi 20 volte minore del *cis*-DDP (Osa et al., 1986). Un ulteriore screening ha riguardato molecole il cui gruppo NH_3 è stato sostituito da altre molecole azotate (es. piridine) rivelatesi adatte nella progettazione di farmaci *cis*-platino simili, nella speranza di ottenere un'aumentata attività antitumorale dovuta all'effetto sinergico dei due leganti. Sono state prese in considerazione anche strutture in conformazione *trans*-Pt (II) poichè questi complessi, come dimostrato in letteratura, manifestano una citotossicità ed attività antitumorale anche in linee cellulari resistenti al *cis*-DDP. L'isomero *trans* dipiridina, di cui è già stata dimostrata la citotossicità (Birbach et al., 1997), è stato utilizzato come modello per un possibile inibitore dell'attività telomerasica, anche se, poiché l'RNA nel sito catalitico dell'enzima è a singola catena, l'intercalazione del legante planare sembrava risultare più difficile.

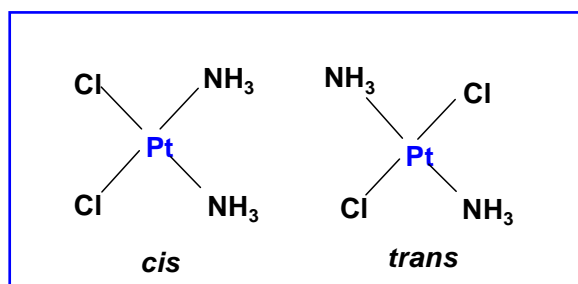


Figura 1.4.1.2 a. Struttura *cis* e *trans* di composti del platino.

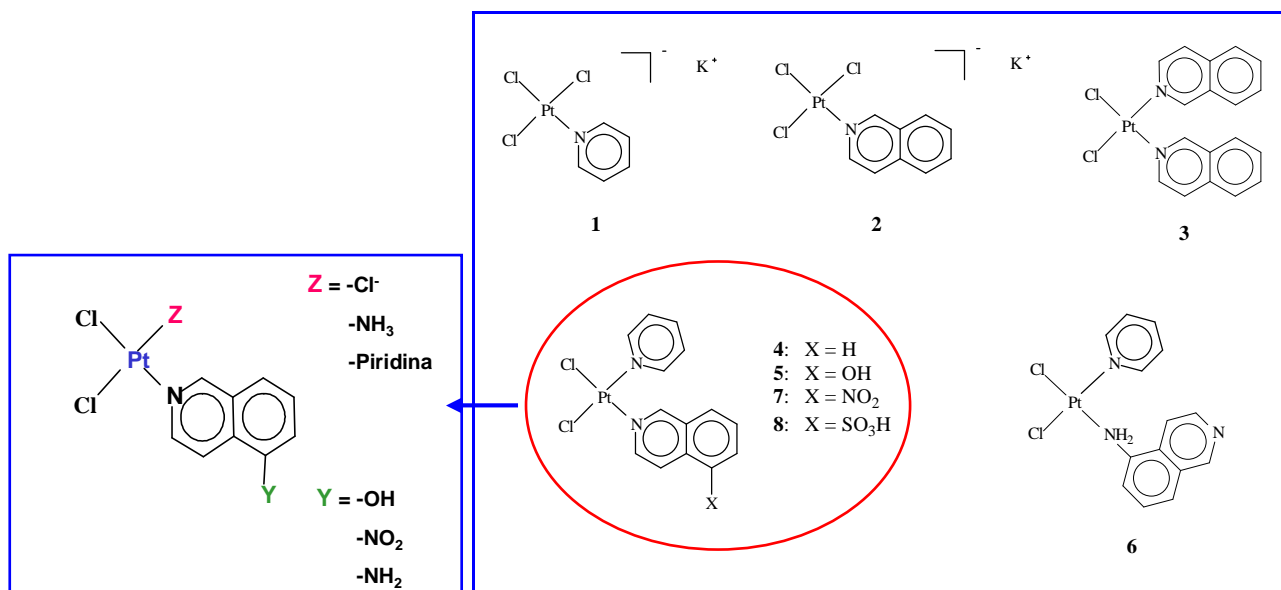
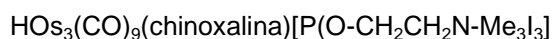
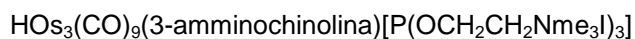


Figura 1.4.1.2 b. Struttura di alcuni dei composti originali di platino oggetto di questo studio. Si noti la conservazione di 2 Cl⁻ come gruppi uscenti e la sostituzione di 1 o entrambi i gruppi NH₃ con differenti leganti azotati. Sono state utilizzate isochinoline sostituite in posizione 5 per modulare la polarità, ottimizzando la solubilità ed attività.

1.4.1.3. Composti a base di Osmio

I composti testati sono stati:



La struttura di base dei complessi di osmio presentava un ligando simile ad una base nucleotidica (3-amminochinolina o quinoxalina), una fosfina o un fosfito in grado di renderli solubili in H₂O ed un interno ed ampio gruppo prostetico composto da un ibrido di 3 atomi di osmio e 9 carbonili (Rosemberg et al., 2000).

Nessuno di essi presentava alcuna attività alchilante sul DNA e alcun gruppo uscente nella loro struttura (A.Bar Din, 1998; M.Joyal Abedin, 1999) (Figura 1.4.1.3.).

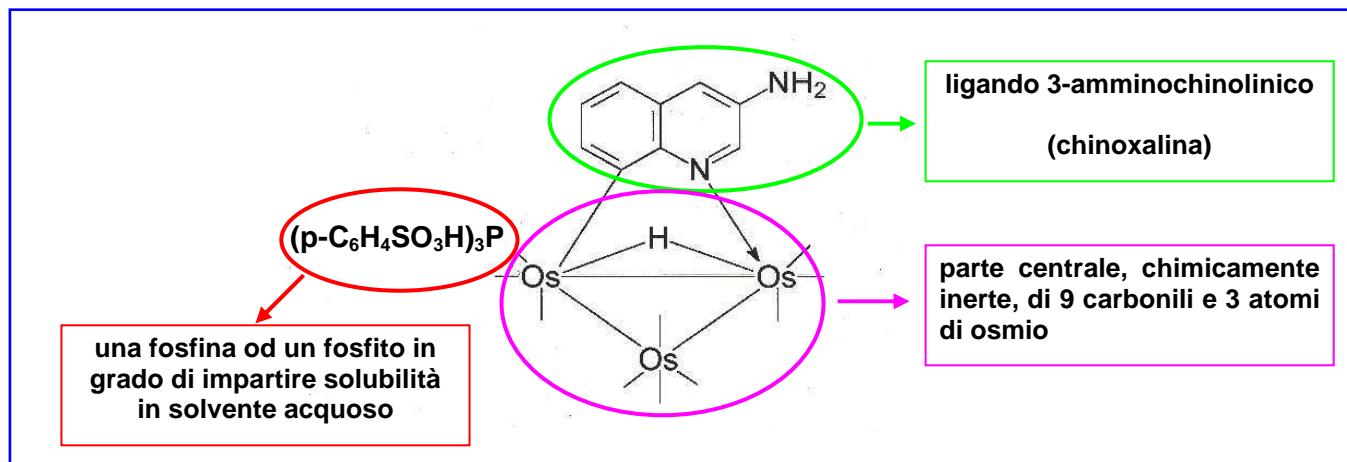


Figura 1.4.1.3. Struttura dei composti originali di osmio oggetto dello studio.

Culture cellulari e trattamenti con i composti organometallici

È stata adottato come modello cellulare tumorale una linea stabilizzata di adenocarcinoma mammario umano MCF-7 (ATCC HTB-22, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), sensibile al *cis*-DDP (10-100 μ M) e p53- wild type. Per confronto si è utilizzata una linea non-tumorale stabilizzata di fibroblasti murini NIH 3T3 (Swiss albino mouse, ATCC, Rockville, Md USA), che conserva l'inibizione della crescita per contatto ed è in grado di down-regolare l'enzima telomerasi. Le cellule NIH3T3 venivano seminate ad alta densità (circa 10^6) così da raggiungere la confluenza in 48h e quindi venivano lasciate in coltura fino a 2 settimane, cambiando il terreno ogni 96h.

Le cellule di entrambe le linee sono state coltivate in DMEM (Dulbecco's modified Eagle-medium), addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 2 mM di L-glutamina, 100 μ g/ml di streptomina, 100 U/ml di penicillina e 0.25 μ g/ml di anfotericina B e mantenute in condizioni standard (37°C, 5% di CO₂).

Le cellule in fase di crescita esponenziale venivano trattate con esposizione continua con le opportune concentrazioni dei composti e mantenute in coltura in condizioni standard.

Test di vitalità e proliferazione (MTT)

Al termine dei trattamenti la vitalità cellulare veniva misurata determinando l'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi. È stato utilizzato il sale solubile di tetrazolio (il 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolo di bromo, MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis) (Mosmann, 1983) che, come substrato di tale enzima, viene convertito in formazano, composto insolubile. La soluzione di MTT 5 mg/ml, preparata in soluzione salina, veniva aggiunta in ogni pozzetto (1:100) e le cellule venivano quindi incubate per 1 h a 37°C. Il terreno veniva quindi accuratamente aspirato per togliere l'eccesso di colorante. I cristalli di formazano venivano quindi solubilizzati con isopropanolo acidificato (0,001 N HCl in isopropanolo assoluto, 0.12M HCl) e misurati spettrofotometricamente a 570 nm (assorbanza del colorante ridotto) con correzione di background a 690 nm e 630 nm. La percentuale di vitalità cellulare veniva calcolata secondo le equazioni:

$$\text{Vitalità cellulare (\%)} = \frac{A_{570}^{\text{test}} - A_{690}^{\text{test}}}{A_{570}^{\text{ctrl}} - A_{690}^{\text{ctrl}}} \cdot 100$$

$$\text{Vitalità cellulare (\%)} = \frac{A_{570}^{\text{test time(X)}} - A_{690}^{\text{test time(X)}}}{A_{570}^{\text{ctrl time(X)}} - A_{690}^{\text{ctrl time(X)}}} \cdot 100$$

Con tale test si procedeva al calcolo dell'**IC₅₀**, definita come la concentrazione in grado di ridurre del 50% la vitalità cellulare rispetto al controllo non trattato. I dati venivano espressi come media \pm SD di 3 esperimenti indipendenti condotti in triplicato e sottoposti all'analisi con il test t di Student.

Test di apoptosi

Monostrati di cellule trattate sono state sottoposte al test di doppia colorazione per valutarne la risposta apoptotica. Ogni 3 giorni le cellule venivano riseminate in terreno fresco condizionato con il composto e colorate con Hoechst 33342 (blu) e ioduro di propidio (rosso). I cambiamenti morfologici nucleari ed il danno alla membrana cellulare venivano analizzati con il microscopio confocale (BioRad MRC600 accoppiato con il microscopio Nikon Diaphot 200).

1.4.2. Determinazione dell'effetto di complessi organometallici sulla telomerasi

1.4.2. Lisi, estrazione e dosaggio dell'enzima attivo:

Dopo i trattamenti le cellule venivano lavate con PBS, pH 7, tripsinizzate, lavate con uno specifico tampone di lavaggio (Hepes 10mM, MgCl₂ 1,5mM, KCl 10mM, DTT 1mM). Si effettuava il primo lavaggio in tale tampone freddo. Quindi si centrifugava 2 volte a 400 g a 4 °C per 10 minuti. Dopo aver completamente aspirato il surnatante, si risospendeva il pellet di cellule con un tampone di lisi, su ghiaccio (Tris-HCl pH 7,5 10mM, MgCl₂ 1mM, EGTA 1mM, CHAPS 0,5%, Glicerolo 10%, PMSF 0,1 mM, 2-Mercaptoetanol 5mM). La lisi veniva effettuata a 4 °C per 30 minuti con continua agitazione. Il lisato veniva quindi frazionato attraverso una centrifugazione a 30.000 g per 30 minuti a 4° C. Per normalizzare la quantità di enzima presente nell'unità di volume nella frazione di lisato veniva dosato il contenuto proteico totale. A tal fine si è utilizzato un metodo Lowry modificato (micro-Lowry). Per confrontare l'attività dell'enzima in ogni campione si normalizzava la quantità di proteine da utilizzare successivamente nel protocollo TRAP.

Dalla letteratura è riportato che la quantità di enzima telomerasi è proporzionale al contenuto proteico presente nell'estratto cellulare totale. Il metodo colorimetrico prevedeva l'utilizzo del reattivo del biuretto e del Folin (reattivo dei fenoli) ed era estremamente sensibile, permettendo di dosare fino a 5 µg di proteine in un volume di 0.2 ml. Si preparavano 6 concentrazioni di BSA, corrispondenti a punti di taratura per la determinazione della concentrazione proteica, compresi nei valori da 0 µg/ml a 150 µg/ml. Solitamente la curva utilizzata si componeva dei seguenti punti: 0, 10, 25, 50, 100, 150 µg/ml. Ai campioni ed agli standards si aggiungeva un pari volume di Soluzione 1 (1 parte di NaOH 0.8 N, 1 parte di SDS 10%, 1 parte di H₂O, 1 parte di CTC costituito da Na₂CO₃ 0,82 M, CuSO₄ 6 mM, Na-Tartrato 8,7 mM) e si lasciava reagire al buio per 10 minuti a 23 °C, vortexando per almeno 3 volte. Al termine dell'incubazione si aggiungeva in rapporto di 1:2 v/v la Soluzione 2 (1 parte di reagente Folin-Ciocalteu, 5 parti di H₂O) e si lasciava reagire al buio per 30 minuti a 23° C agitando per almeno 3 volte. La determinazione dell'intensità della colorazione azzurra, ottenuta dalla reazione delle soluzioni 1 e 2 con le proteine presenti nei campioni e negli standards, si eseguiva per via spettrofotometrica a 750 nm. Sulla base dei valori di concentrazione così ottenuti tutti i campioni venivano diluiti ad una concentrazione proteica finale uguale (*normalizzazione*).

1.4.3. Determinazione dell'attività telomerasica

1.4.3.1. TRAP (telomeric repeat amplification protocol)

La prima metodica, un protocollo detto **TRAP (telomeric repeat amplification protocol)** (Kim et al., 1994; Wright et al., 1995; Sugihara et al., 1996) permetteva un dosaggio semiquantitativo utilizzando 2 oligonucleotidi sintetici standard TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') e CX (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') (Figura 1.4.3.2.b.). Il primer TS è un telomero-mimetico e costituisce la base sulla quale l'enzima telomerasi procede all'elongazione con l'aggiunta di esameri telomerici (TTAGGG). Il primer CX innesca il successivo step di amplificazione delle frazioni elongate dalla telomerasi. Per determinare la quantità di proteina ottimale per eseguire il protocollo TRAP sono stati eseguiti esperimenti preliminari, in cui venivano utilizzate quantità di lisato pari a 0,1 µg, 0,25 µg, 0,5 µg, 1 µg e 2.5 µg (Figura 1.4.3.1.a.).

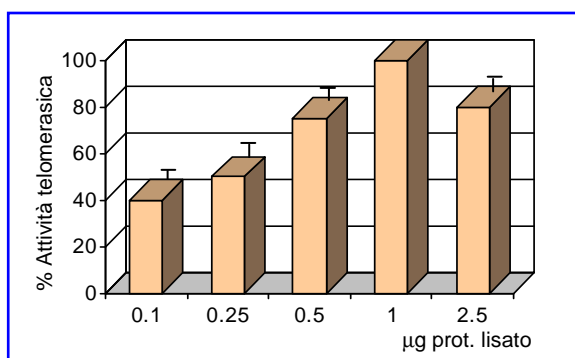


Figura 1.4.3.1.a. Attività della telomerasi in funzione del quantitativo di estratto enzimatico utilizzato per il test TRAP: è evidente un andamento gaussiano.

Poichè si è dimostrato che l'attività dell'enzima seguiva un andamento gaussiano con un picco di attività a 1 µg, questa quantità è stata adottata per i successivi esperimenti. Concentrazioni superiori ad 1 µg sono probabilmente troppo elevate e quindi si potrebbero verificare fenomeni aspecifici di inibizione non più evidenziabili a diluizioni più alte. La prima fase di elongazione, che utilizza 0.5-1 µg di lisato cellulare, veniva condotta a 23 gradi per 30'; la seconda fase prevedeva 35 cicli di amplificazione (PCR) con una temperatura di complementazione (annealing) di 50 °C. La reazione di amplificazione veniva rivelata attraverso l'incorporazione di (alfa³²P)dCTP (Amersham, UK) e la successiva risoluzione su gel di poliacrilamide (PAGE). Un controllo interno, l'ITAS (internal telomerase activity standard, 150 bp con i terminali omologhi ai

primers TS e CX) ha consentito la misura quantitativa, con densitometria (Phosphor Imager, BioRad, UK), dell'attività enzimatica.

Questa metodica si compone di 3 fasi (Figura 1.4.3.2.b.):

fase di elongazione: questa fase è basata sulla capacità della telomerasi di riconoscere ed elongare *in vitro* un oligonucleotide sintetico, denominato TS (telomerase substrate, 5'- AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'). La reazione viene condotta a 23 °C in presenza delle 4 basi nucleotidiche trifosfate. In questa fase l'enzima aggiunge un numero variabile di esameri TTAGGG al TS che così si allunga per un multiplo di 6 basi alla volta;

fase di amplificazione: i prodotti risultanti dalla fase di elongazione sono amplificati con una reazione PCR (polimerase chain reaction). I primers utilizzati nella reazione erano lo stesso TS (*upstream primer*) non elongato ed un oligonucleotide, denominato CX (5'-CCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3')(*downstream primer*) (Kim et al., 1994). Il CX è stato disegnato in modo da essere complementare a 4 ripetizioni telomeriche (5'-TTAGGG)₄, ma con opportune sostituzioni di base (mismatch), in modo tale da aumentare la specificità di legame con il terminale 3' della sequenza TS-(TTAGGG)_n elongata. Tale complementarità non assoluta del CX con i vari frammenti elongati di TS, è necessaria per evitare un appaiamento casuale all'interno del TS elongato e per il posizionamento all'estremità terminale 3' (Falchetti et al., 1998).

L'amplificazione con PCR (ThermoHybaid Gradient Px2), prevede 35 cicli in cui si susseguono, in ciascuno ciclo, 30 secondi a 94 °C (temperatura alla quale il DNA si denatura), 30 secondi a 50 °C (temperatura in cui le sequenze si complementarizzano), e 90 secondi a 72 °C, temperatura di funzionamento della Taq-polimerasi (Roche, Germania). Il tampone di reazione era così composto: Tris-HCl, pH 8.3, 20 mM, KCl 63 mM, MgCl₂ 1.5 mM, TWEEN 20 0.005 %, EGTA 1 mM, BSA (albumina di siero bovino) 0,1 mg/ml, TS 0,1 µg, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, ognuno 50 µM, Taq-polimerasi 2 U, lisato cellulare 1 µl (1µg), [α^{32}] dCTP 2 µCi, CX 0,1 µg. Il primo ciclo serve a far sì che la Taq-polimerasi costruisca la sequenza complementare al solo frammento di TS elongato (1+n esameri), partendo dall'estremità 3' del CX. In questo modo si ottiene un DNA a doppia catena che sarà il template per i successivi cicli di amplificazione, in cui verranno utilizzati il TS non elongato ed il CX come primers.

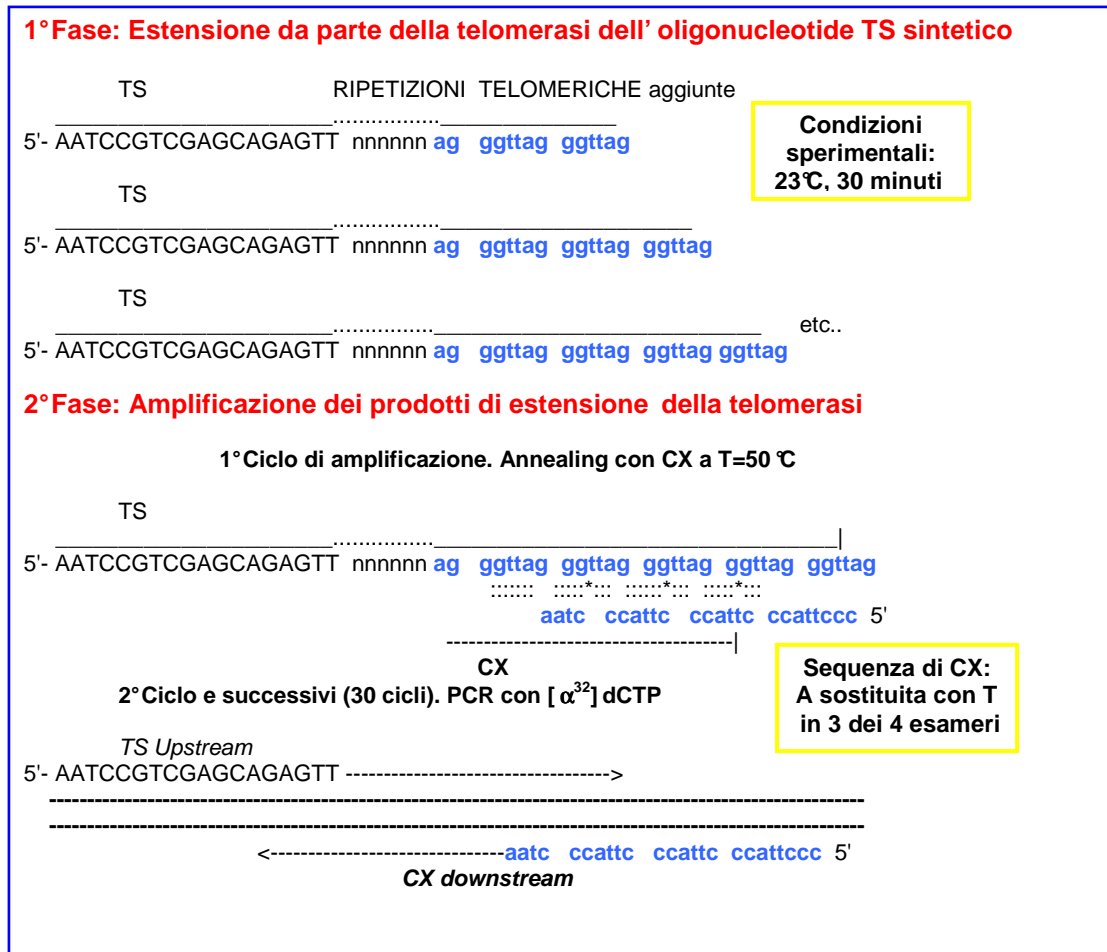


Figura 1.4.3.2.b. Fasi del protocollo TRAP. Vedi testo per i dettagli. (Kim, 1994).

I controlli utilizzati erano: un vero positivo, un estratto da cellule tumorali MCF-7 non trattate, un vero negativo costituito da solo tampone di lisi e, per valutare eventuali interferenze con il successivo step di amplificazione (con l'enzima Taq-polimerasi), ogni complesso organometallico veniva aggiunto alla reazione solo dopo la 1° fase del TRAP assay. Per i composti non solubili in solvente acquoso veniva aggiunto un controllo con il solo cosolvente alla concentrazione più alta utilizzata.

Risoluzione con elettroforesi su gel di poliacrilamide: per risolvere i frammenti prodotti nel TRAP sono stati utilizzati gel di poliacrilamide non denaturanti (PAGE). I componenti per la preparazione del gel erano Acrilamide/bis acrilamide 19:1 al 12 % finale, TBE (tampone tris-base 89 mM/borato 89 mM/EDTA 2mM) 1x, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina) 0.08 %, e APS (ammoniopersolfato) 0.3 mg/ml. TEMED e APS erano gli attivatori che innescavano la reazione a catena della polimerizzazione. Il buffer di preparazione e corsa era composto da tampone tris-base 89 mM, acido borico 89 mM, EDTA 2mM. Il gel veniva corso con una corrente costante ad una potenza di 60 W. I campioni erano preparati in un tampone di carica (loading

buffer) così composto: TBE 1x, glicerolo 50 %, blu di bromofenolo 0.25 %, xilen-cianolo 0.25 %. La corsa durava circa 2 ore che bastavano a garantire una buona separazione delle bande di frammenti del DNA (TS+(TTAGGG)_n). Il sistema elettroforetico era un Hoefer SQ3 (Pharmacia Biotech, Svezia). Il gel era spesso 0.75 mm ed il pettine utilizzato, a base piatta, permetteva di caricare 8 µl di campione. Il gel veniva passato su carta Whatman 3mm Chr (Whatman, UK) ed essiccato sotto vuoto (Gel-Dryer 583, BioRad). Per la rivelazione delle bande ottenute e per la quantificazione del segnale è stato utilizzato un densitometro (Phosphor Imager GS-250, Bio-Rad) e lo schermo di acquisizione utilizzato era Molecular Imager Imagin Screen BI (BioRad). L'intensità della radioattività delle singole bande era direttamente proporzionale alla quantità di DNA amplificato che aveva incorporato [α^{32}]dCTP. Veniva quindi rilevata l'intensità complessiva di tutta la corsa elettroforetica ottenuta in ogni campione e l'intensità era espressa come volume di attività/area di analisi, attraverso il programma Phosphor Analyst 1.1. L'intensità complessiva della corsa elettroforetica era direttamente proporzionale all'attività telomerasica.

1.4.3.2. Real-time quantitative PCR (TRAP-RTQ-TRAP)

La seconda metodica utilizzata per determinare la presenza di attività telomerasica impiegava una tecnica derivata dal protocollo TRAP ma che si avvale di uno strumento di amplificazione e contemporanea rivelazione, l'ABI PRISM 7700 Sequence Detector System, che permette di quantificare in modo accurato l'attività enzimatica nei campioni biologici (Figura 1.4.3.2. a e b) (Hou et al., 2001; De Kok et al., 1999). La procedura prevedeva l'utilizzo di un oligonucleotide telomero mimetico TS 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3' (0.1 mg) e di un anchored downstream primer ACX 5'-GCGCGG(CTTACC)₃CTAACC-3', e di 1 U of AmpliTaq Gold polimerasi, il SYBR Green buffer (PE Applied Biosystems), composto da 2.5 mM di ogni base dNTP, 15 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 0.2 µg della proteina T4 e 0.5 µg di lisato. La reazione era condotta in una piastra a 96 pozzetti ed il volume finale della reazione era di 25 µl. La soluzione veniva prima incubata a 25 °C per 20 minuti, al fine di permettere alla telomerasi eventualmente presente nell'estratto cellulare di elongare il primer TS con gli esameri TTAGGG. La PCR iniziava quindi portando i campioni a 95 °C per 10 minuti (al fine di attivare l'AmpliTaq Gold polimerasi), quindi si facevano 40 cicli di amplificazione, ognuno composto da 95 °C per 20 secondi, 50 °C per 30 secondi, e 72 °C per 90 secondi. Il SYBR Green, un marcatore fluorescente, è noto legarsi al DNA doppia elica. Quando nuovi ampliconi sono prodotti grazie alla PCR, il SYBR Green vi si lega e genera un segnale fluorescente, che è raccolto ed analizzato con il software

del Sequence Detector (Versione 1.6; PE Applied Biosystems) durante la fase di estensione di ogni ciclo di amplificazione. Un segnale di fluorescenza era ritenuto significativo (Ct) quando era superiore alle 10 deviazioni standard del valore medio di fluorescenza considerato come rumore di fondo. Solitamente si utilizzava quello misurato nei primi cicli di amplificazione, e più precisamente tra il ciclo 3 ed il 15.

L'attività telomerasica nei campioni era calcolata come valore Ct (valore di ciclo di innesco di amplificazione), e cioè tanto più era intensa, tanto più il valore di Ct era basso. In tutte le reazioni sono stati inclusi due controlli interni, un vero positivo, e cioè un lisato preparato da un linea di cellule tumorali umane MCF7 (adenocarcinoma mammario) utilizzato a differenti concentrazioni di proteine comprese tra 1 µg e 0.0016 µg, ed un vero negativo, e cioè veniva condotta la reazione con tutti i sali necessari ma in cui non veniva aggiunto alcun lisato cellulare. Tutti i campioni venivano dosati in duplicato ed i controlli interni permettevano di costruire una curva standard. I valori di ciclo di innesco dell'amplificazione Ct erano calcolati a partire dal plot semilogaritmico di amplificazione (incremento logaritmico della fluorescenza vs il numero del ciclo corrispondente) e comparato con la curva standard generata dalle diluizioni seriali delle cellule telomerasi-positive MCF7 (attività corrispondente a 1000, 100, 10, 1 cellule). L'attività della telomerasi era espressa come relativa alle cellule MCF7 (RTA), e cioè come numero teorico totale di cellule tumorali telomerasi-positive presenti nei lisati.

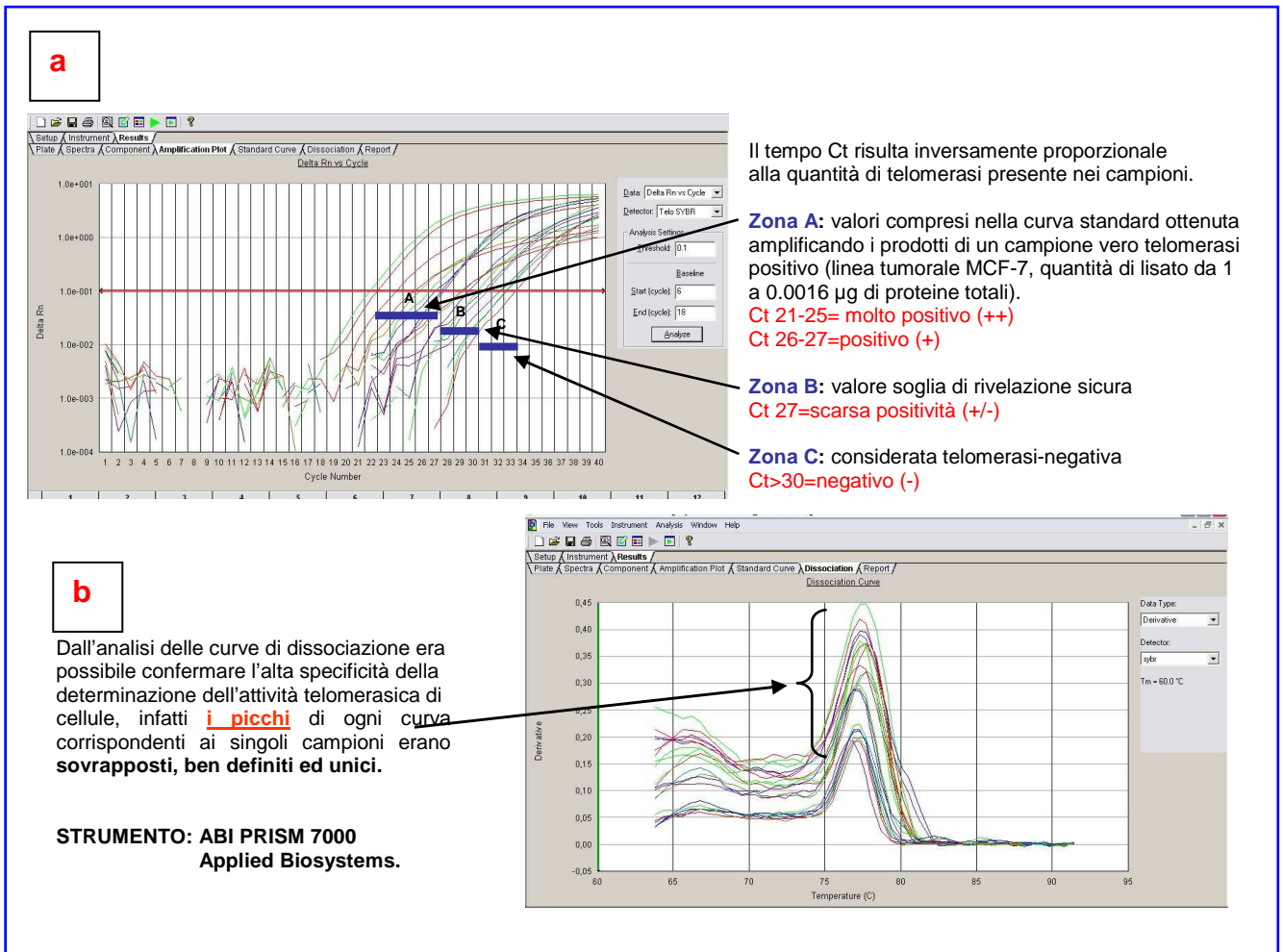


Figura 1.4.3.2. a e b. Esperimento tipico di dosaggio telomerasico attraverso TRAP-RTQ-PCR. La **figura a** mostra il risultato dell'amplificazione dei prodotti della telomerasi. L'attività dell'enzima era proporzionale alla sua capacità di formare prodotti in grado di essere amplificati per mezzo di PCR. Il tempo Ct era inversamente proporzionale alla quantità di enzima presente nei campioni. Le zone indicate sono rispettivamente: **zona A**, comprende i valori inclusi nella curva standard ottenuta amplificando i prodotti di un vero telomerasi-positivo (linea tumorale MCF-7, quantità di lisato compreso tra 1 µg e 0.0016 µg di proteine totali). Se il Ct calcolato era compreso tra 21 e 25 il campione era considerato ++, mentre se Ct era compreso tra 26 e 27 era considerato +. La zona B e C comprende i valori ottenuti tra la massima diluizione e il controllo vero-negativo, in cui non vi era telomerasi attiva. La **zona B** è il valore soglia di rivelazione sicura (scarsa positività + / - , **Ct 27**), mentre la **zona C** comunque necessita di una successiva verifica ma viene considerata telomerasi-negativa (- , **Ct > 30**).

Dall'analisi delle curve di dissociazione (**Figura b**) era possibile confermare l'alta specificità della determinazione dell'attività telomerasica, infatti i picchi di ogni curva corrispondenti ai singoli campioni risultavano sovrapposti, ben definiti ed unici.

1.4.3.3. Determinazione dell'espressione dei componenti della telomerasi (RT-PCR)

Per verificare se il trattamento delle cellule con i differenti complessi modificasse l'espressione a livello genico delle componenti dell'enzima, ne sono stati valutati i livelli degli RNA messaggeri. Si è utilizzata la

tecnica dell'RT-PCR. Essa consiste in una retrotrascrizione dell'RNA che permette di ottenere la retrotrascrizione in DNA di tutti i messaggeri presenti nella cellula. I DNA a singola catena ottenuti in questa fase venivano successivamente amplificati con PCR utilizzando primers specifici per ogni sequenza che si voleva determinare. Più in dettaglio, l'RNA totale delle cellule veniva estratto utilizzando un kit commerciale (Rneasy Mini Kit, Quiagen, USA). Le cellule erano lisate con tampone denaturante contenente guanidina isotiocianato ed inibitori di RNAsi. L'RNA veniva quindi adsorbito su colonne di gel di silice ed eluito con H₂O. 6 µg di RNA totale estratto venivano retrotrascritti, utilizzando la trascrittasi inversa AMV-RT (Boehringer Mannheim, Germania), con primers esamerici random (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia), ottenendo così il DNA complementare (cDNA), a singola catena. A questo punto si procedeva all'amplificazione specifica dei singoli frammenti relativi ai geni di interesse, attraverso amplificazione con Taq polimerasi (94 °C 30 secondi, 60 °C 30 secondi, 72 °C 60 secondi, 28 cicli; 21 cicli per la β-actina) (PCR core kit, Boehringer), utilizzando i primers specifici (Soder et al., 1997):

hTERT	5'-TGAACCTGCGGAAGACAGTGG-3'	<i>(upstream)</i>
	5'-ATGCGTGAAACCTGTACGCCT-3'	<i>(downstream)</i>
hTERC	5'-TTTGTCTAACCCCTAACTGAGAAG-3'	<i>(upstream)</i>
	5'-TTGCTCTAGAATGAACGGTGGA-3'	<i>(downstream)</i>
TEP-1	5'-TCAAGCCAAACCTGAATCTGAG-3'	<i>(upstream)</i>
	5'-CCCCGAGTGAATCTTTCTACGC-3'	<i>(downstream)</i>
β-ACTINA	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'	<i>(upstream)</i>
	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	<i>(downstream)</i>

La β-actina era utilizzata come standard interno per normalizzare i valori di espressione ottenuta. Si procedeva alla determinazione dei prodotti di reazione attraverso la separazione su gel di agarosio (1.5 % in TAE). Le bande, messe in evidenza con etidio bromuro, venivano lette attraverso un sistema di analisi dell'immagine composto da un transilluminatore ad UV ed una telecamera 3 CCD (GeneQuant, GelDoc 1000, BioRad). Un programma (Quantity One program 4.0.3, BioRad) permetteva di effettuare l'analisi densitometrica delle bande ottenute.

1.4.3.4. Determinazione della lunghezza telomerica residua

Tale test veniva effettuato dopo almeno 3 settimane di crescita (8-10 cicli). Le cellule MCF-7 trattate venivano staccate, incluse in plugs di agarosio (10^7 cellule / ml) e digerite con proteinasi K a 50°C per un minimo di 48 h. Questa procedura veniva adottata per facilitare la fase successiva di completa digestione del DNA, condotta utilizzando l'enzima di restrizione Hinf I (60 U per 10^7 cellule). Da questa reazione si ottenevano i frammenti di restrizione terminali del DNA (TRF, 10^6 bp), preservando però intatta la sola porzione telomerica del DNA (10^3 - 10^4 bp). I campioni venivano risolti su gel di agarosio (0.7%, 600 Vh) con elettroforesi pulse-field. Il DNA risolto veniva trasferito su membrana di Nylon (Hybond-N+), fissato con UV e caratterizzato con Southern blot. Le membrane venivano quindi ibridizzate con specifiche sonde per i telomeri costituite dalla sequenza $(\text{T TAGGG})_4$, marcate con ^{32}P , quindi analizzati con autoradiografia o densitometria (PhosphorImager). La lunghezza dei telomeri veniva riferita ad uno standard 1-Hind III che permetteva di stabilire le esatte dimensioni in bp ed i dati venivano analizzati mediante analisi quantitativa dell'immagine.

Determinazione del danno ossidativo al DNA cellulare *in vitro*

Il danno ossidativo sul DNA, dovuto alla generazione di specie reattive all'ossigeno (ROS), è stato determinato misurando la presenza di residui di 8-oxoguanina (De Zwart et al., 1999) con l'utilizzo di una specifica sonda. Questo metodo consente una diretta quantificazione dell'attività di ROS nelle cellule. Le cellule venivano trattate per 30 minuti con i composti dissolti in terreno completo alle concentrazioni di 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} M, quindi lavate con terreno fresco, incubate per 2 h con terreno fresco, al termine raccolte, fissate con paraformaldeide al 2%, su ghiaccio, e trattate con etanolo 70%. La determinazione dell'8-oxoguanina è stata condotta utilizzando il Fluorogenic OxyDNA Assay kit (Calbiochem, CA) che prevede l'utilizzo di coniugati FITC- labeled che riconoscono prodotti derivati radicalici del DNA. La quantificazione è stata ottenuta con il FACSCalibur System and CellQuest software (Becton-Dickinson, NJ).

Determinazione della stabilità dei diversi composti in condizioni fisiologiche (spettroscopia UV-vis)

Lo spettro di assorbimento UV-visibile dei ferroceni mostra una banda tipica nell'intervallo tra 600 e 800 nm (il valore esatto varia a seconda dei sostituenti presenti sugli anelli ciclopentadienilici). Tale

assorbimento, attribuito ad una transizione per trasferimento di carica dal legante al metallo (LMCT ${}^2E_{2g} \rightarrow {}^2E_{1u}$), è il responsabile della colorazione verde-blu di questi complessi. Per alcuni ferroceni, tale banda di assorbimento, tuttavia, è poco intensa. Perciò, a causa della scarsa solubilità dei complessi in ambiente acquoso, non può essere utilizzata per lo studio cinetico della degradazione del complesso. Per eseguire le misure di stabilità abbiamo perciò preso in considerazione la banda di assorbimento che cade attorno ai 250 nm e che corrisponde ad una diversa transizione LMCT ($1e_{1u} \rightarrow 2e_{1g}$).

Al valore massimo di assorbanza, letto attorno a 250 nm, è stato sottratto un fondo misurato tra 300 e 350 nm ed opportunamente scelto secondo le caratteristiche dello spettro di ogni complesso. Questa misura differenziale ha permesso di eliminare le variazioni dovute a fattori strumentali e al corpo di fondo residuo o eventualmente formatosi. Le misure sono state eseguite in diverse condizioni sperimentali: in acqua deionizzata, in tampone HEPES, in tampone fosfato ed in tampone citrato a pH 3.

Trascorsi 5 minuti dalla preparazione delle soluzioni, esse sono state filtrate utilizzando una siringa di plastica da 50 ml ed un microfiltro. Questa operazione è necessaria per eliminare ogni corpo solido, insolubile o non ancora solubilizzato, che potrebbe alterare le misure di assorbanza. Sulle soluzioni così preparate è stato registrato lo spettro UV-visibile e l'assorbanza del picco massimo nell'intervallo tra 200 e 300 nm è stata considerata come valore al tempo zero. In seguito si sono registrati gli spettri UV-visibile a tempi via via più lunghi fino ad un massimo di 50 ore. Come indice di stabilità del composto in esame si è utilizzato il rapporto tra l'assorbimento iniziale e quello dopo 450 minuti (A_{0m} / A_{450m}) perché in questo intervallo di tempo si ha la massima velocità di degradazione.

Gli spettri UV-vis sono stati registrati con lo spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 20 come funzione del tempo (da 0 a 3000 minuti) utilizzando 4 diversi tamponi a base acquosa (Vásquez-vivar J et al., 1997).

Determinazione dei livelli intracellulari di Ferro e Platino (spettrofotometria ad assorbimento atomico)

Monostrati di cellule cresciute in capsule petri da 10 cm venivano trattate con differenti concentrazioni dei complessi. Al termine dell'incubazione le cellule venivano lavate due volte con 5 ml tampone fosfato salino freddo (PBS). Le cellule venivano lisate con una soluzione acquosa di HNO_3 0.5 % e staccate dalla piastra mediante l'utilizzo di spatole piatte per colture cellulari (scraper). I lisati così ottenuti venivano liofilizzati e quindi risospesi con HNO_3 puro ($500 \mu L / 10^6$ cellule). I campioni venivano quindi trattati

a caldo (120 °C) sotto cappa chimica fino a completa essiccazione. A questo punto erano risospesi in una soluzione di HNO₃ 0.25% e conservati congelati fino al dosaggio. La quantificazione del metallo (Ferro o Platino) era effettuata con spettrofotometria ad assorbimento atomico. Lo strumento utilizzato era un Perkin Elmer 3300 con autocampionatore AS 80 (Perkin Elmer, USA) con fornello in grafite e correzione del background con lampada UV. I controlli interni di determinazione di standard a concentrazione nota venivano eseguiti ogni 10 iniezioni.

Determinazione dell'uptake dei composti del Platino (ICP-MS)

È stato valutato l'uptake e l'accumulo di Pt in cellule MCF-7 tramite ICP-MS in seguito a trattamento di 1-48 h ad una concentrazione dei composti pari a 0.1µM. Per confronto si sono valutati gli stessi parametri per i composti noti *cisplatino* (Aldrich), *carboplatino* (Strem Chemicals), *oxaliplatino* (Sigma). Le cellule venivano seminate in piastre da 100 mm (700-800 cellule/piastra) e dopo 48 h il terreno veniva cambiato con terreno fresco condizionato con i composti alla concentrazione finale appropriata. Dopo 1, 4, 24 e 48 h le cellule trattate venivano lavate 3 volte con soluzione di 0.9% NaCl fredda, tripsinizzate e la sospensione cellulare ottenuta veniva centrifugata in soluzione salina ad 800xg per 5 minuti a 4°C. I pellets venivano risospesi in volume appropriato di H₂O per ottenerne una sospensione omogenea di cui una parte veniva utilizzata per il dosaggio proteico e una parte trasferita in provette di vetro contenenti 65% HNO₃ e mineralizzate a 120 °C. I campioni di Pt venivano dissolti in 2ml di HNO₃ 2% addizionato di 50µg/l di Indio (utilizzato come standard interno). Dopo 5 minuti di trattamento in bagno ultrasonico si otteneva una soluzione limpida che veniva analizzata per il contenuto totale di Pt con l'ICP-massa (X5 Series Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer, Thermo Optek), determinando l'isotopo più abbondante del Pt e l'Indio rispettivamente a m/z 195 e 115.

Determinazione del coefficiente di partizione ottanolo/H₂O (P_{o/w})

È stato calcolato il Log P_{o/w} come misura della lipofilia dei composti, quale indicatore della loro abilità nell'attraversare la membrana cellulare. Esiste una correlazione tra l'uptake e il grado di lipofilia dei leganti carrier (Platts et al., 2001). Tale coefficiente, originariamente espresso come partizione olio d'oliva/H₂O, riflette la solubilità relativa del composto in n-ottanolo (rappresentante il doppio strato lipidico

della membrana cellulare) e l'H₂O (il solvente intra- ed extracellulare). È stato utilizzato il metodo Minick's: cromatografia liquida a fase inversa ad alta performance (RP-HPLC) utilizzando una miscela H₂O-metanolo. Le condizioni di cromatografia erano: gel di silice C18 (ODS) come fase stazionaria; una fase mobile contenente quantità variabili di HCOOH 15mM e MeOH; flusso 0.75ml/min; eluizione isocratica, misura UV-visibile a 210 nm.

Analisi statistica 1

I dati ottenuti per i vari esperimenti in triplicato, sono espressi come media \pm errore standard medio (E.S.M) e le differenze tra i gruppi sono state analizzate con il test di t-STUDENT.

RISULTATI 1

1.5. 1. Complessi a base di Sali di Ferrocenio

1.5.1.1. Stabilità dei composti del Ferrocenio

Lo studio della stabilità dei sali di ferrocenio è molto importante perché ci permette di comprendere se la specie presente in soluzione e di cui studiamo gli effetti biologici, coincide con la molecola originale o se quest'ultima ha subito radicali trasformazioni. Prima di eseguire le prove biologiche, quindi, abbiamo valutato la stabilità e la cinetica dell'eventuale decomposizione dei cationi ferrocenio sintetizzati in ambiente acquoso.

Le specie considerate sono dei sali di complessi organometallici e quindi la loro solubilità in ambiente acquoso non è molto elevata. La solubilità dei sali di ferrocenio è stata stimata, valutando "visivamente" in soluzioni a concentrazione crescente, la completa dissoluzione del corpo di fondo solido. Questa prova, semplice ed immediata, è stata eseguita per verificare se i composti presentassero una solubilità in ambiente acquoso sufficiente (almeno 1 mM) per essere utilizzati nelle prove biologiche senza l'impiego di un cosolvente (Tabella 1.5.1.1.a.).

Composto	Solubilità (M)
Fc ⁺	10 ⁻²
DEMFc ⁺	10 ⁻²
DIMFc ⁺	10 ⁻²
CAFc ⁺	10 ⁻³
BAFc ⁺	5x10 ⁻³

Tabella 1.5.1.1.a. Solubilità in acqua dei sali di ferrocenio analizzati in questo studio.

Il ferrocenio tetrafluoroborato ha mostrato una solubilizzazione molto rapida, mentre i composti con sostituenti metilici, pur avendo una solubilità in acqua paragonabile a quella del ferrocenio, impiegano alcuni minuti per sciogliersi completamente. Per i ferroceni con sostituenti acidi è stata riscontrata una minore solubilità, in particolare per il ferrocenio acido carbossilico.

La stabilità dei sali di ferrocenio in ambiente acquoso è stata studiata tramite spettroscopia UV-vis, registrando la cinetica di degradazione dei composti in condizioni diverse: condizioni acquose non tamponate, pH acido e tamponi a pH "fisiologico". I dati ottenuti mostrano stabilità variamente dipendente dall'ambiente chimico in cui il composto viene a trovarsi (Tabella 1.5.1.1.b; Figura 1.5.1.1.).

Composto	Acqua deionizzata	Tampone pH = 3	Tampone HEPES	Tampone Fosfato
	A_{0m} / A_{450m}	A_{0m} / A_{450m}	A_{0m} / A_{450m}	A_{0m} / A_{450m}
Fc⁺	1,15	1,07	1,06	1,14
DEMFC⁺	1,00	1,02	0,99	1,03
DIMFC⁺	1,07	1,05	1,01	1,05
CAFC⁺	1,08	1,03	1,32	1,33
BAFC⁺	1,27	0,99	1,19	1,36

Tabella 1.5.1.1.b.: Confronto fra gli indici di stabilità dei cinque sali di ferrocínio, nelle quattro condizioni sperimentali studiate. Come indice di stabilità del composto in esame si è utilizzato il rapporto tra l'assorbimento iniziale e quello dopo 450 minuti (A_{0m} / A_{450m}) perché in questo intervallo di tempo si ha la massima velocità di degradazione.

Tutti i composti hanno manifestato una maggiore stabilità a pH acido, confermando i dati presenti in letteratura, nei quali viene dimostrata l'influenza degli ioni OH⁻ nel processo di degradazione del ferrocínio.

I ferrocini con sostituenti acidi sono risultati particolarmente sensibili alle variazioni di pH: molto instabili a pH fisiologico, pressoché stabili in tampone acido. Nelle misure in acqua deionizzata, pur rimanendo instabili, hanno mostrato una degradazione più lenta che a pH fisiologico. Il comportamento di questi sali, può essere attribuito al carattere polare ed elettrone-attrattore dei sostituenti presenti sugli anelli ciclopentadienilici del complesso che, favoriscono l'interazione con le molecole di acqua e, esaltando la carica positiva presente, rendono il complesso più facilmente riducibile. Il ferrocínio non sostituito ha mostrato una stabilità intermedia in tutte le prove eseguite, unita ad una scarsa dipendenza dal pH della soluzione. Il decametilferrocínio, stabilizzato dai sostituenti metilici, che mascherano la carica positiva del complesso per iperconiugazione, si è dimostrato stabile in tutte le misure effettuate, indipendentemente dal pH. Il 1,1'-dimetilferrocínio, stabile nei tamponi a pH fisiologico, è invece apparso parzialmente instabile a pH acido. Questo comportamento controtendenza è difficilmente spiegabile, considerando che il complesso non ha gruppi dissociabili e dovrebbe essere stabilizzato dalla presenza dei due gruppi metilici. Analizzando però solamente i primi 450 minuti della cinetica, la sua velocità di degradazione risulta perfettamente intermedia fra i valori del ferrocínio e del decametilferrocínio. Non si notano, invece, sostanziali differenze nel comportamento dei sali di ferrocínio passando dal tampone HEPES al tampone fosfato. Il comportamento simile nei due tamponi a pH fisiologico è molto importante perché ci permette di fare una previsione, seppur grossolana, sulla stabilità dei sali di ferrocínio nell'ambiente biologico in cui si svolgono le prove di citotossicità.

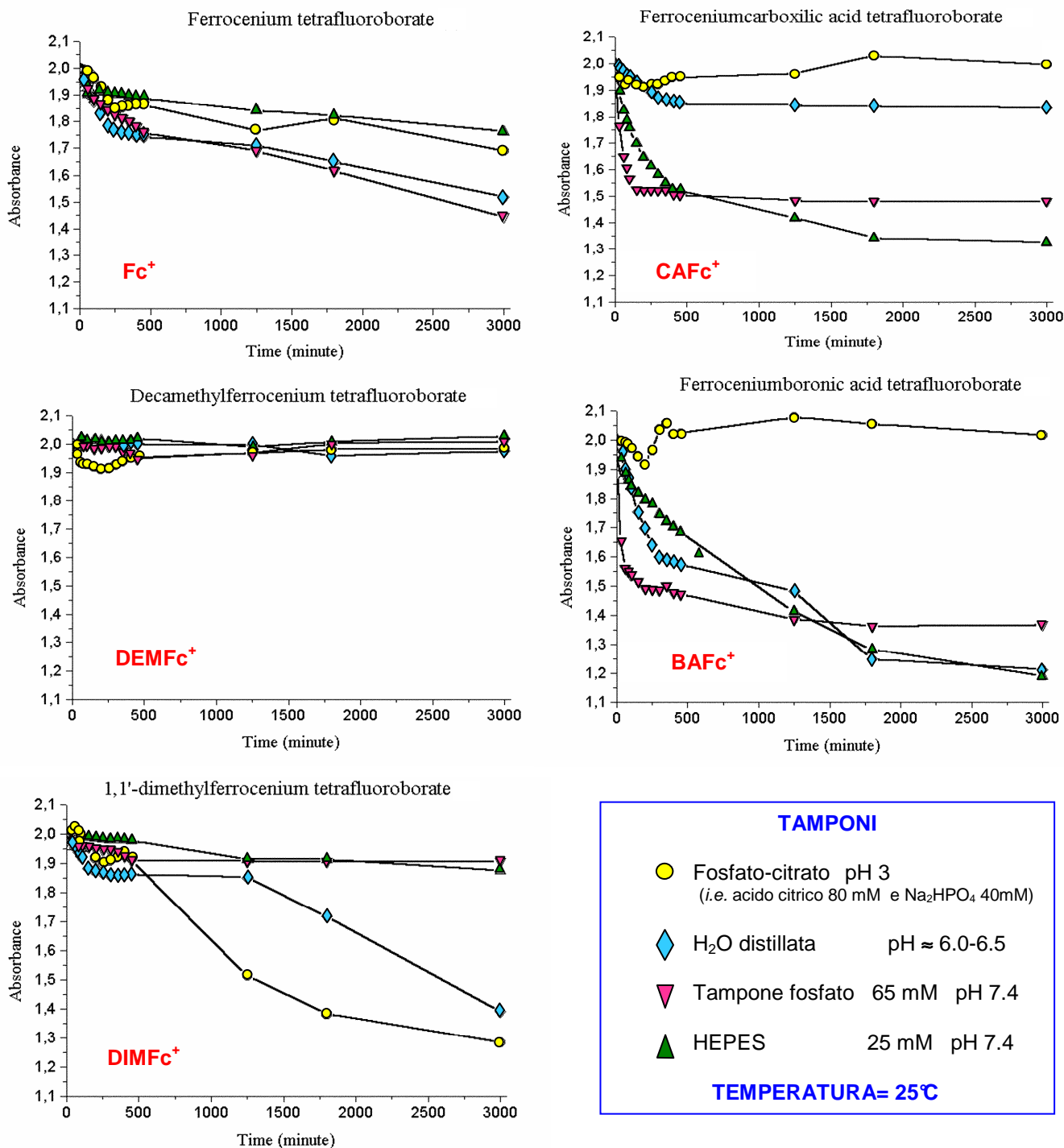


Figura 1.5.1.1. Stabilità dei composti in funzione del pH e della natura del tampone utilizzato. La decomposizione dei complessi è stata seguita attraverso il decremento della banda di assorbimento LMCT ($1e1u \rightarrow 2e1g$) (Shon et al., 1971), che cade nell'intervallo 250-300 nm): a) il decametil-ferrocenio è il composto più stabile indipendentemente dalle condizioni sperimentali, b) il ferrocenio si mostra sempre instabile con scarsa dipendenza dal pH della soluzione, c) l' 1,1'-dimetil-ferrocenio mostra, almeno fino a 450 minuti, una stabilità intermedia tra quella del ferrocenio e quella del decametil-ferrocenio, d) i ferroceni con sostituenti protonabili presentano una stabilità fortemente legata all'ambiente sperimentale e sono molto instabili a pH fisiologico, e) Fc⁺ è risultato instabile in tutti i tipi di tampone utilizzato. Δ corrispondente al decremento della massima assorbimento: Fc⁺: $\lambda = 251$ nm; DEMFc⁺: $\lambda = 278$ nm; DIMFc⁺: $\lambda = 257$ nm; CAFc⁺: $\lambda = 257$ nm; BAFc⁺: $\lambda = 252$ nm. Per un confronto diretto dei dati sperimentali ottenuti, le misure registrate sono state normalizzate portando a 2 AU l'assorbimento della soluzione al tempo zero.

1.5.1.2. Citotossicità dei Sali di ferrocenio

Il primo screening dei composti condotto trattando le cellule per 48 h in un range di concentrazioni compreso tra 5 e 500 μM ha dimostrato un effetto antiproliferativo generale di questi composti a base di ferrocenio (Tabella 1.5.1.2.a.).

Il sale di ferrocenio decametil-ferrocenio tetrafluoroborato (DEMFC^+), risultato chimicamente il più stabile, ha indotto la maggiore inibizione della crescita tumorale nelle MCF-7.

La IC_{50} calcolata è stata di 37 ± 4 μM , con una dose-risposta nel range 5-100 μM . Tutti gli altri composti del ferrocenio hanno dimostrato citotossicità minore con una IC_{50} calcolata di circa 300 μM .

Ulteriori test di citotossicità sono stati condotti per determinare la relazione durata del trattamento-attività citotossica, in particolare con il composto DEMFC^+ , risultato essere il più stabile e attivo.

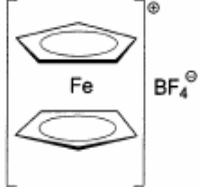
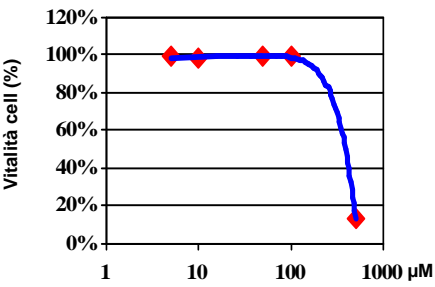
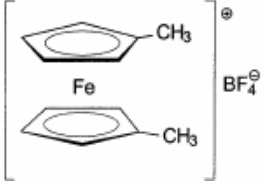
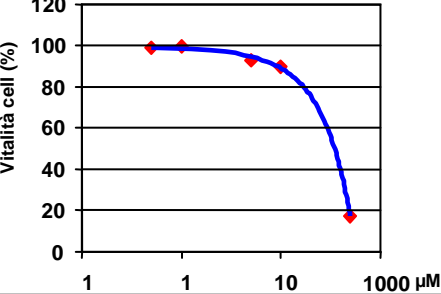
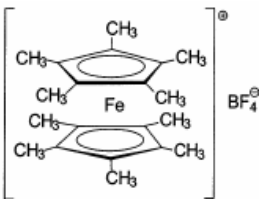
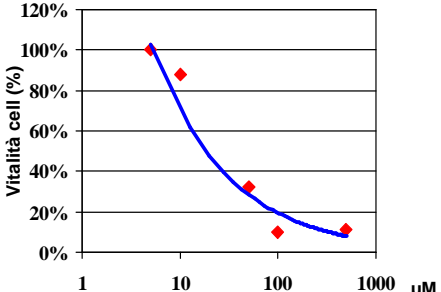
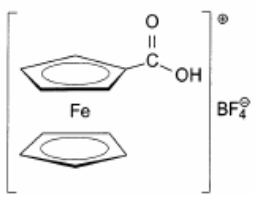
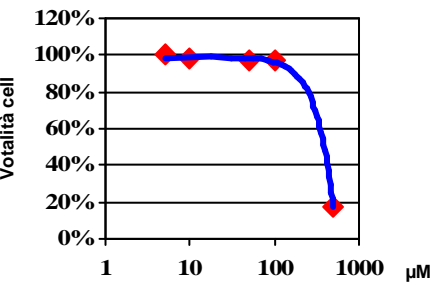
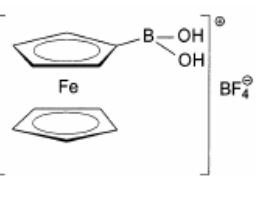
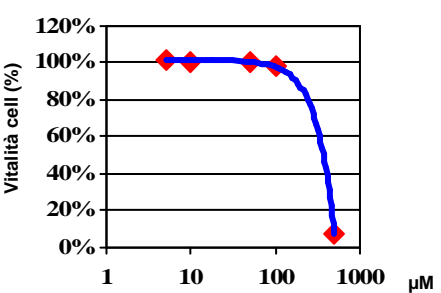
COMPOSTO	[μM] DEL COMPOSTO	VITALITÀ CELL. (%) ^(a, b)	VITALITÀ CELLULARE vs CONCENTRAZIONE DEL COMPOSTO	IC ₅₀ [μM] ^(a, c)
<p>Fc⁺</p> 	5 10 50 100 500	100% (25) 98% (27) 100% (15) 99% (12) 13% (10)		330 (26)
<p>DIMFc⁺</p> 	5 10 50 100 500	99% (16) 100% (19) 93% (13) 90% (16) 17% (20)		320 (19)
<p>DEMFc⁺</p> 	5 10 50 100 500	100% (18) 88% (10) 32% (13) 10% (14) 11% (11)		37 (15)
<p>CAFc⁺</p> 	5 10 50 100 500	100% (15) 98% (19) 97% (13) 97% (10) 17% (13)		340 (16)
<p>BAFc⁺</p> 	5 10 50 100 500	102% (20) 101% (17) 101% (14) 98% (10) 8% (7)		310 (17)

Tabella 1.5.1.2.a.: Screening dei composti: trattamento delle cellule MCF-7 per 48 h (5-500 μM). Determinazione della vitalità cellulare con il metodo MTT (vd. *Materiali e metodi*). **a**: valore medio di 3 esperimenti indipendenti. Il limite di confidenza è riportato in parentesi ($P=0,1$, $t=2.92$). **b**: percentuale di cellule vitali riferite al controllo non trattato. **c**: concentrazione di composto richiesta per ridurre del 50% il numero di cellule rispetto al controllo non trattato.

Un test prevedeva il confronto tra l'attività del Decametil-ferrocenio vs Ferrocenio (Figura 1.5.1.2.; Tabella 1.5.1.2. b). Le proprietà citotossiche di questi due Sali di Ferrocenio sono state valutate con tempi di trattamento di 2, 12, 24 e 48 ore per monitorare la tempo-dipendenza dell'azione citotossica.

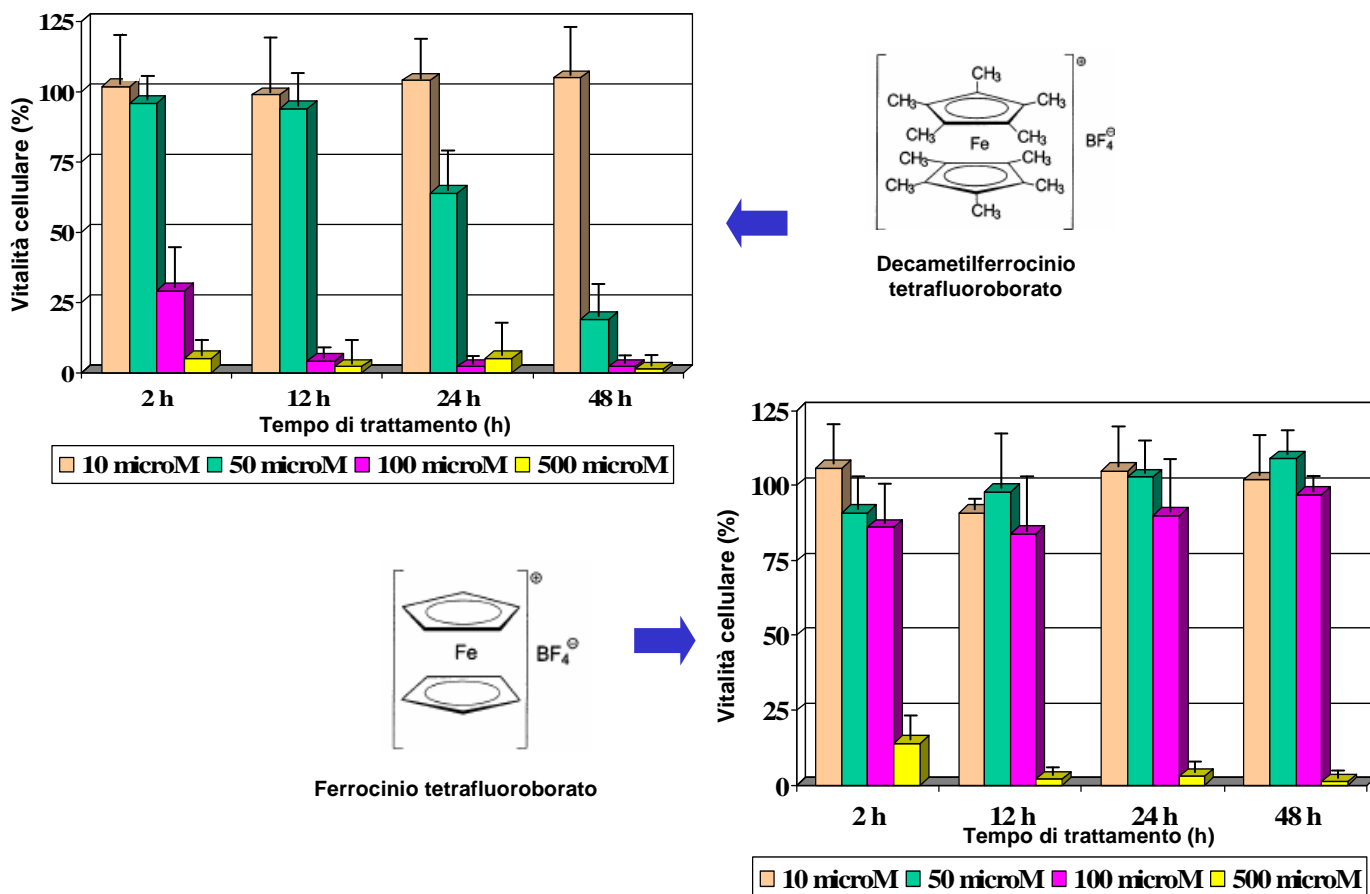


Figura 1.5.1.2. Vitalità cellulare di cellule MCF-7 dopo 5 giorni dal trattamento con differenti Sali di Ferrocenio e diversi tempi di esposizione. Le cellule MCF-7 in fase di crescita logaritmica sono state trattate con i composti alle concentrazioni comprese tra 10 e 500 µM. In ogni singolo esperimento le cellule venivano esposte alla stessa concentrazione dei Sali di Ferrocenio per tempi crescenti (2, 12, 24 e 48 h). Per uniformare le condizioni dei trattati e dei controlli, si è deciso di utilizzare un bianco per ogni tempo di trattamento. Ad ogni time-point il terreno veniva cambiato con terreno fresco nei corrispondenti pozzetti (trattato e controllo) e le cellule venivano mantenute in coltura per 5 giorni (recovery time) allo scadere dei quali ne veniva determinata la vitalità per mezzo del metodo MTT (vd. *Materiali e metodi*). La percentuale di cellule vitali era riferita al controllo non trattato. In figura sono riportati i valori medi di 3 esperimenti indipendenti ed limiti di confidenza del valore medio sono stati calcolati utilizzando la distribuzione t di Student con una probabilità del 90% ($P = 0.1$, $t_{2,90} = 2,920$).

I dati ottenuti confermano una più marcata attività citotossica del DEMFC+ rispetto al Fc+ per ogni tempo di trattamento.

Importanza della durata del trattamento (Tabella 1.5.1.2.b): il test MTT eseguito dopo 5 giorni dall'inizio dell'esposizione ai composti nel range 10 – 500 μM per tempi variabili 2, 12, 24, 48 h, ha indicato una marcata citotossicità del DEMFc⁺ strettamente dipendente dai tempi di esposizione. La diminuzione del valore di IC₅₀ corrispondente all'aumentare del tempo di esposizione delle cellule al composto DEMFc⁺ indica infatti una tempo dipendenza dell'effetto citotossico. I ferrocini tetrafluoroborati funzionalizzati (Fc⁺ aldeidico, carbossilico ed acetico) hanno un effetto limitato alle prime 12 h di esposizione, probabilmente in conseguenza della sua dimostrata instabilità in tamponi e condizioni fisiologiche.

Dose-dipendenza dell'effetto antitumorale: è stata dimostrata per il DEMFc⁺ nell'intervallo di concentrazioni 5 – 100 μM mentre gli altri composti sono attivi solo a dosi molto superiori (500 μM).

Composto	Tempo di trattamento (h)	IC ₅₀ (μM) ^{A, B}
DEMFC ⁺	2	86 (11)
	12	74 (3)
	24	58 (13)
	48	35 (6)
Fc ⁺	2	308 (37)
	12	238 (34)
	24	256 (23)
	48	249 (10)

Tabella 1.5.1.2. b. Citotossicità di DEMFc⁺ e Fc⁺ su cellule MCF-7 trattate in fase di crescita logaritmica per 2, 12, 24, 48 h: valori di IC₅₀. Dopo il trattamento le cellule venivano lavate con terreno fresco. **A:** valore medio di tre esperimenti indipendenti. I limiti di confidenza ($P=0,1$, $t=2.92$) sono riportati tra parentesi. **B:** concentrazione richiesta per ridurre del 50% il numero di cellule rispetto al controllo non trattato.

1.5.1.3. Studio del meccanismo di azione dei Sali di Ferrocinio. Determinazione del danno ossidativo sul DNA da parte dei Sali di Ferrocinio

In considerazione del meccanismo d'azione di tipo radicalico proposto per questi composti, si è valutata la presenza sul DNA delle cellule MCF-7 trattate con essi, di danni indotti da radicali liberi (Figura

1.5.1.3). DEMFc⁺, è risultato in grado di aumentare il livello di 8-oxoG ed indurre uno stress ossidativo nelle cellule MCF-7 trattate alle concentrazioni 10⁻⁶, 10⁻⁵ e 10⁻⁴ M in modo dose dipendente. Fc⁺ in esperimenti condotti in condizioni simili non ha rivelato incrementi dei valori di 8-oxoG significativi rispetto a quelli indotti da DEMFc⁺ (dati non mostrati).

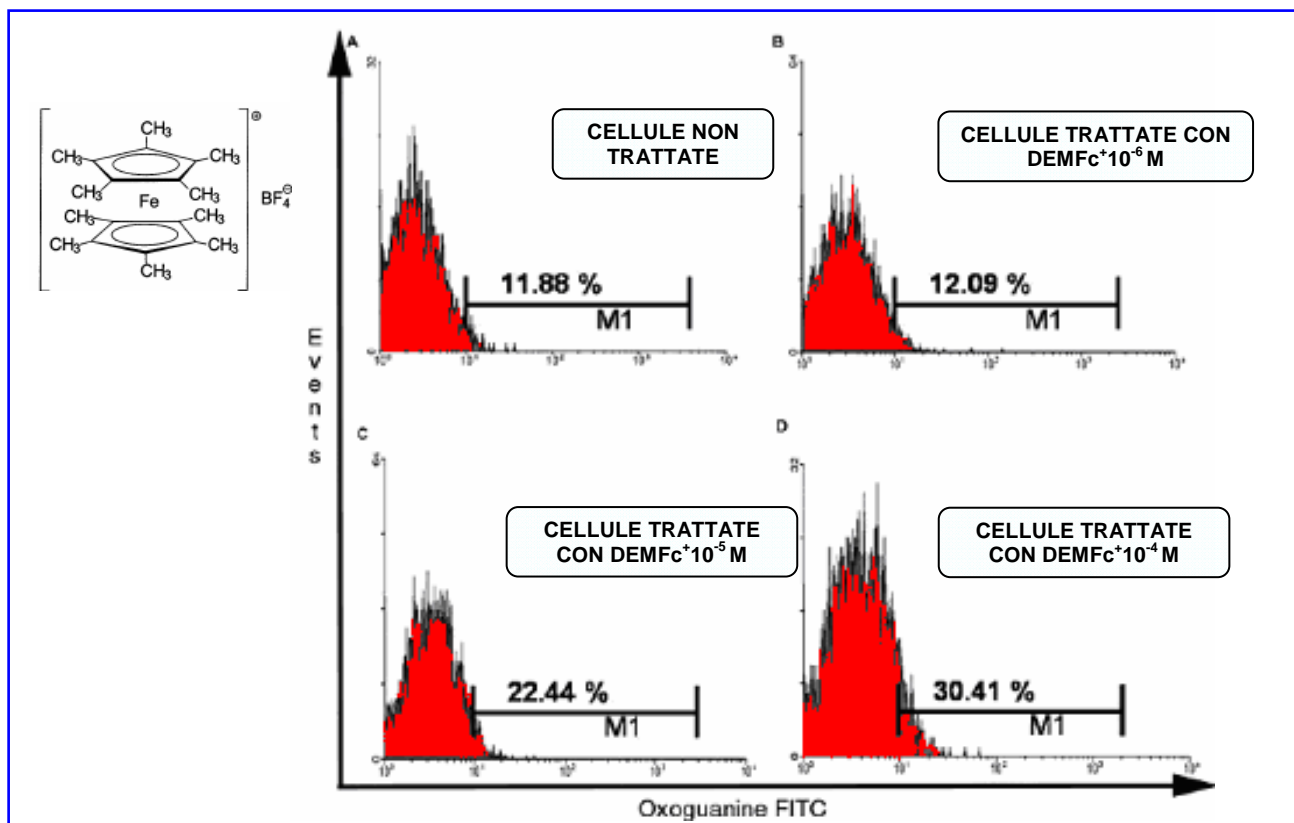


Figura 1.5.1.3. 4 istogrammi univariati di esperimenti rappresentativi del danno al DNA. Dopo 30 minuti di trattamento con DEMFc⁺, le cellule MCF-7 sono state incubate con terreno fresco e staccate dopo 2 h. Le cellule dopo il fissaggio in paraformaldeide sono state incubate con una sonda FITCH-coniugata e la fluorescenza è stata misurata con il citofluorimetro (FACS). Il numero delle cellule è espresso come numero di eventi (asse delle y) vs l'intensità di fluorescenza della sonda per l'8-OXOGuanina del canale filtro per FITCH (asse delle x). L'8-oxo-guanina risulta essere un marker diretto del danno radicalico sul DNA (De Zwart et al., 1999).

Inoltre in uno studio precedente (Osella D. et al., 2000) era già stato dimostrato come il composto CAFc⁺ in soluzione acquosa fosse in grado di produrre radicali liberi, probabilmente responsabili della sua citotossicità.

1.5.1.4. Spin trapping per definire le specie radicaliche coinvolte nel meccanismo di azione

Per definire meglio le specie radicaliche (idrossiliche e radicali superossido) coinvolte nel meccanismo di citotossicità di tali composti sono state effettuate registrazioni di spettri ESP (electronic spin resonance) di soluzioni contenenti DEMFc⁺ o Fc⁺ in condizioni fisiologiche, utilizzando la tecnica dello spin-trapping (Buettner et al., 1987; Bielski et al., 1991; Tabbì et al., 2001; Duling D. R., 1994). I dati ottenuti da queste analisi confermano la capacità dei cationi del ferrocenio di produrre specie radicaliche all'ossigeno come conseguenza della loro degradazione e anche in condizioni simili a quelle intracellulari. Per valutare se il meccanismo di degradazione proposto fosse l'unico operante, si è voluto controllare se la produzione radicalica fosse in accordo con la degradazione osservata tramite spettroscopia UV-visibile. Fc⁺, composto instabile, dovrebbe produrre una quantità di radicali maggiore di DEMFc⁺, composto stabile, nello stesso intervallo di tempo. Una stima della quantità di radicali prodotti può essere ottenuta per doppia integrazione dei segnali ESR misurati. In questa valutazione bisogna però tenere conto che non stiamo osservando direttamente il radicale prodotto ma un suo addotto con lo *spin-trap*. Questi addotti sono sicuramente più stabili dei radicali primari che vengono "intrappolati" ma restano comunque specie radicaliche con un tempo di vita breve rispetto alla cinetica osservata tramite spettroscopia UV-visibile (DMPO-OH $t_{1/2}$ = 2.6 ore). Non è quindi possibile ipotizzare un accumulo in soluzione di questi addotti per tempi lunghi. Considerando quanto appena esposto, lo studio è stato limitato ai primi 90 minuti di incubazione (Figura 1.5.2.4.).

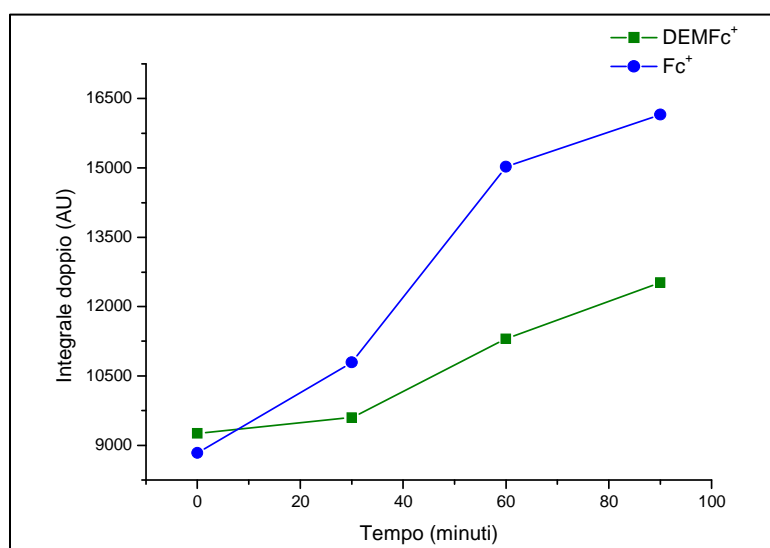


Figura 1.5.1.4. Confronto della produzione di radicali tra Fc⁺ e DEMFc⁺. La quantità di radicali prodotta è stata stimata con la doppia integrazione dei segnali ESR misurati.

Come si può osservare in Figura 1.5.1.4, solo per tempi molto brevi l'intensità dei segnali EPR, e quindi la produzione radicalica, sono simili per i due cationi. Al trascorrere del tempo il segnale di Fc⁺ cresce

molto più velocemente di quello di DEMFc⁺ confermando l'andamento di stabilità osservato tramite le misure UV-visibile. Il buon accordo tra la stabilità osservata tramite la tecnica UV-visibile e la produzione di radicali conferma il meccanismo di degradazione proposto.

1.5.1.5. La spettrofotometria ad assorbimento atomico ha dimostrato che tutti i composti passano facilmente la membrana cellulare per diffusione passiva (l'equilibrio è raggiunto in 30 minuti).

1.5.2. Complessi del Platino

1.5.2.1 Screening di attività antitelomerica in un test su enzima estratto (test biochimico)

Per valutare l'efficacia di tutti i composti sintetizzati è stato utilizzato un primo saggio di tipo biochimico poiché un saggio cellulare non avrebbe potuto chiarire se le eventuali interazioni osservate fossero dovute a fenomeni specifici sull'enzima o aspecifici sulla cellula (Tabella 1.5.2.1.).

COMPOSTI	SOLVENTI	CONC. (M)	% INIBIZIONE TELOMERASI	Interferenza con Taq polimerasi (+ o - del 5%)
K[PtCl₃py] Tricloro-pirrolidina Platinato (II) di potassio	H ₂ O	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	6 8 8	-
K[PtCl₃ (isoq)] TricloroisochinolinaPlatinato (II) di potassio	H ₂ O	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	8 8 11	-
Cis-[PtCl₂ (isoq)₂] Cis-dicloro-bis (isochinolina)platino (II)	DMSO	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	2 1 10	+
Cis-[PtCl₂NH₃ (isoq)] Cis-(amminodicloro-Isochinolina) platino(II)	DMSO	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	5 5 3	+
Cis-[PtCl₂py (isoq)] Cis-dicloro piridina-Isochinolinaplatino (II)	DMSO	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	3 5 5	+
Cis-[PtCl₂py (5-OH-isoq)] Cis-dicloropiridina-5 -idrossiisochinolina platino (II)	DMSO	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	8 4 10	+
Cis-[PtCl₂py (5-NH₂-isoq)] Cis-dicloropiridina(5amminoisochinolina) platino (II)	DMSO	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	4 17 18	+
Cis-[PtCl₂py (5-NO₂-isoq)] Cis-dicloropiridina (5-nitroisochinolina) platino (II)	DMSO	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	5 7 11	+
Cis-DDP Cis-diclorodiammino platino (II) (cisplatino)	H ₂ O	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	0 0 0	0
Cis-[PtCl₂py (5-SO₃H-isoq) Ptquin8 Cis-dicloropiridina (5-solfonilisochinolina) platino (II)	H ₂ O	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	9 21 35	+
Trans-DDP		10 ⁻¹¹	0	

<i>Trans</i> -diclorodiammino platino (II)	DMSO	10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	0 0	0
<i>Trans</i> -[Pt (py) ₂ Cl ₂] <i>Trans</i> -PtPy	DMSO	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	20 26 20	+
<i>Cis</i> -[Pt (py) ₂ Cl ₂] <i>Cis</i> -PtPy	DMSO	10 ⁻¹¹ 10 ⁻⁹ 10 ⁻⁷	13 26 36	+

Tabella 1.5.2.1. Valori riferiti all'attività inibitoria della telomerasi in un test biochimico dei principali composti del platino valutati in questo studio.

Si può osservare come il *cisplatin* ed il *transplatin* non siano risultati in grado di inibire direttamente la telomerasi, e ciò in accordo con i dati della letteratura (Burger et al., 1997). Questo test, esclusivamente biochimico, permetteva quindi di esaminare un gran numero di molecole e forniva una serie di dati sull'attività che venivano quindi convalidati sui test *in vitro*. Molti composti solubili in cosolvente DMSO non presentavano un significativo effetto antitelomerasico, ma solo un'aspecifica inibizione della Taq polimerasi, per cui sono stati scartati. Sono di seguito riportati i risultati ottenuti dai composti che sembrano avere alcune caratteristiche promettenti: un isomero *cis* denominato *Ptquin8*, il *trans*- PtPy ed il *cis*- PtPy (Figura 1.5.2.1.).

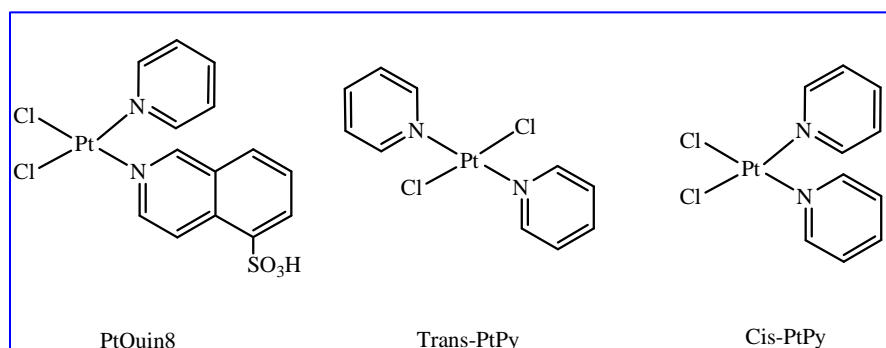


Figura 1.5.2.1. Strutture di alcuni composti analizzati in questo studio.

1.5.2.2. Effetto dei complessi *Ptquin8*, *Trans* e *Cis*-PtPy sull'enzima telomerasi estratto da cellule MCF-7 (Test biochimico 1) e sulla Taq polimerasi (Test biochimico 2)

Ptquin8 era in grado di inibire l'attività telomerasica in modo dose-dipendente (9_±4% - 35_±3%) rispetto al controllo non trattato, nell'intervallo di concentrazioni 10⁻¹¹-10⁻⁷M. Un effetto dose-dipendente era evidenziabile anche per il composto *Cis*-PtPy(13% - 36%, rispettivamente per la concentrazione 10⁻¹¹M e 10⁻⁷M) (Figura 1.5.2.2.). Il *trans*-PtPy dimostrava un effetto inibitorio ~20% non dose-dipendente. Per i

composti dipiridinici era evidenziabile una minima interazione del cosolvente DMSO (1:100). Il controllo interno al test era ottenuto valutando l'attività della Taq polimerasi in seguito all'aggiunta del composto (da 10^{-4} a 10^{-7} M) effettuata immediatamente prima dell'inizio della fase di amplificazione del protocollo TRAP, ossia al termine dell'allungamento, avvenuta in condizioni ottimali da parte della telomerasi del telomero sintetico TS. I dati ottenuti non hanno dimostrato un'interferenza significativa sul sistema di amplificazione indicando un'azione inibitoria specifica e selettiva dei composti sulla telomerasi.

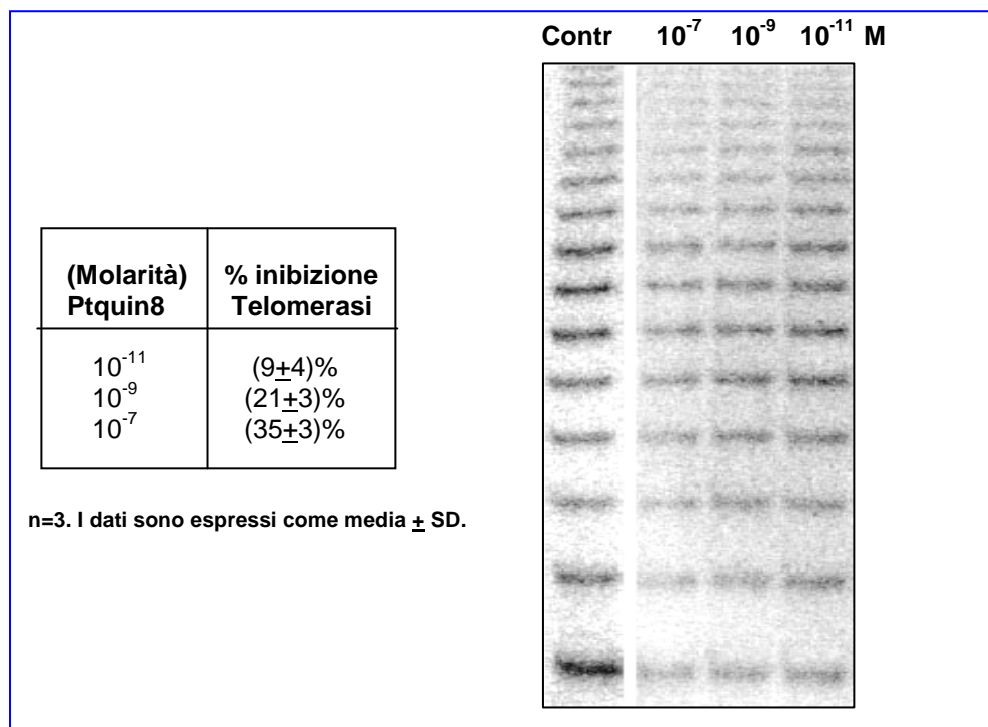


Figura 1.5.2.2. Risultato di un test di inibizione telomerasica di Ptquin8. PAGE risultante da un test biochimico. Il bandeggio, costante per ogni colonna, rappresenta il prodotto di allungamento dovuto all'attività telomerasica, rappresentato dall'aggiunta di unità esameriche multiple al telomero sintetico TS. Vi sono variazioni di intensità complessiva delle bande. L'intensità della radioattività delle bande era direttamente proporzionale alla quantità di DNA amplificato che aveva incorporato α^{32} dCTP. Veniva quindi rilevata l'intensità complessiva di tutta la banda elettroforetica ottenuta in ogni campione ed espressa come volume di attività/ area di analisi. L'intensità complessiva della banda elettroforetica era direttamente proporzionale all'attività telomerasica.

1.5.2.3. Effetti di composti Pt(II) sulla vitalità di cellule MCF-7 dopo trattamento continuo di 24 h

Venivano calcolati i valori di IC_{50} dopo 24h di trattamento con i composti alla concentrazione 0.1 μ M, seguite da 48 h di recovery in terreno completo fresco (Tabella 1.5.2.3.).

Complessi- Pt(II)	IC ₅₀ μM
Cisplatino	28 ± 3.1
Carboplatino	250 ± 10
Oxaliplatino	5.7 ± 0.8
Ptquin8	3250 ± 30
Cis-PtPy	45 ± 5.2
Trans-PtPy	8 ± 0.63

Tabella 1.5.2.3. Risultati di IC50 calcolati per diversi i composti analizzati.

1.5.2.4. Effetti di Ptquin8, *Trans* e *cis*-PtPy sulla telomerasi di cellule MCF-7 dopo trattamento continuo di 24 h

Ptquin8: i risultati ottenuti indicavano un'inibizione massima di ~46% nell'intervallo di concentrazione 10⁻⁷-10⁻⁴ M, progressivamente decrescente a concentrazioni più basse: (21±6)% per 10⁻⁸ M e (12±7)% per 10⁻⁹ M (Figura 1.5.2.4.).

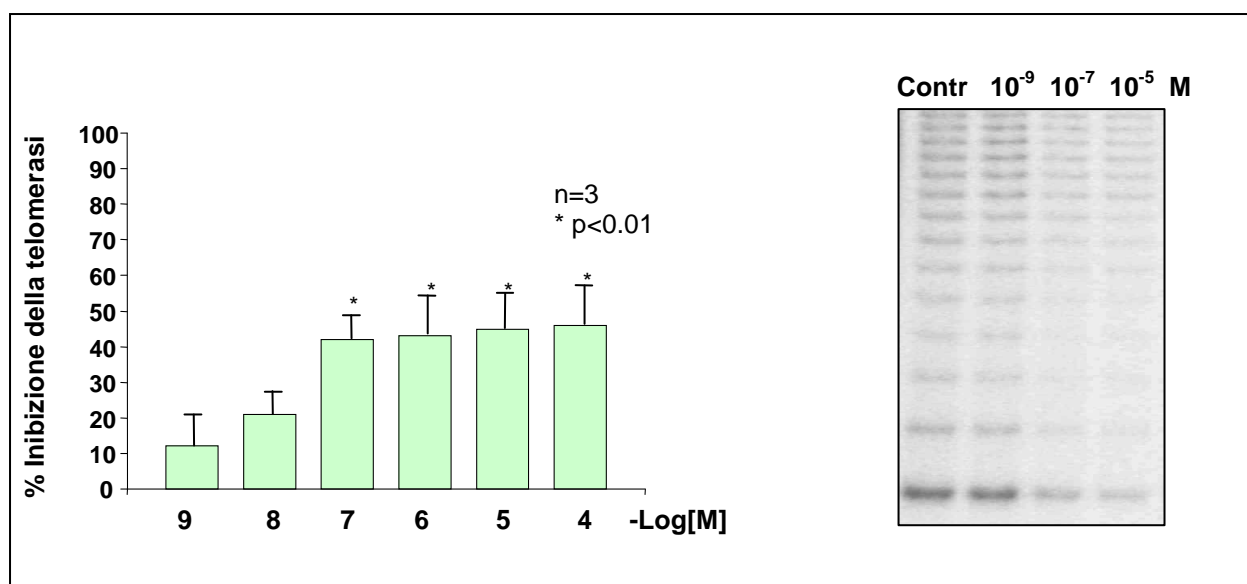


Figura 1.5.2.4. Tipico esperimento di TRAP ASSAY risolto su PAGE.

cis-PtPy: era evidenziabile un'inibizione pari a ~40% per la concentrazione 10⁻⁹ M e ~del 49% per 10⁻⁷ M, significativo

Trans-PtPy: l'effetto di inibizione telomerastica era di ~21% fino a raggiungere il valore di ~47% rispettivamente con il trattamento alla concentrazione 10^{-9} M e 10^{-7} M, evidenziando una buona dose-dipendenza dell'effetto di tale composto.

1.5.2.5. Effetti di Ptquin8 sulla vitalità di cellule MCF-7 dopo trattamento continuo di 10 gg

L'intervallo di somministrazione del composto era di 24 h, alle concentrazioni comprese tra 10^{-9} e 10^{-4} M. Erano rilevabili effetti citotossici significativi solo a concentrazioni maggiori di 10^{-5} M. In seguito a tale osservazione si è deciso di utilizzare le concentrazioni 10^{-9} e 10^{-7} M per ottenere significativi effetti specificamente dovuti all'inibizione della telomerasi e non a citotossicità aspecifica.

1.5.2.6. Effetti di Ptquin8 sulla telomerasi di cellule dopo trattamento continuo a lungo termine, 30gg

Cellule MCF-7: l'attività telomerastica di tali cellule veniva ridotta del $(25 \pm 3)\%$ dopo 4 h e del $(30 \pm 4)\%$ nelle prime 24 h in seguito a trattamento alla concentrazione 10^{-7} M e per il restante periodo l'inibizione di tale enzima si attestava su un valore stabile di $(20 \pm 4)\%$. Il trattamento con la concentrazione 10^{-9} M comportava una lenta ma costante inibizione telomerastica (circa del 15%)(Figura 1.5.2.6.a.).

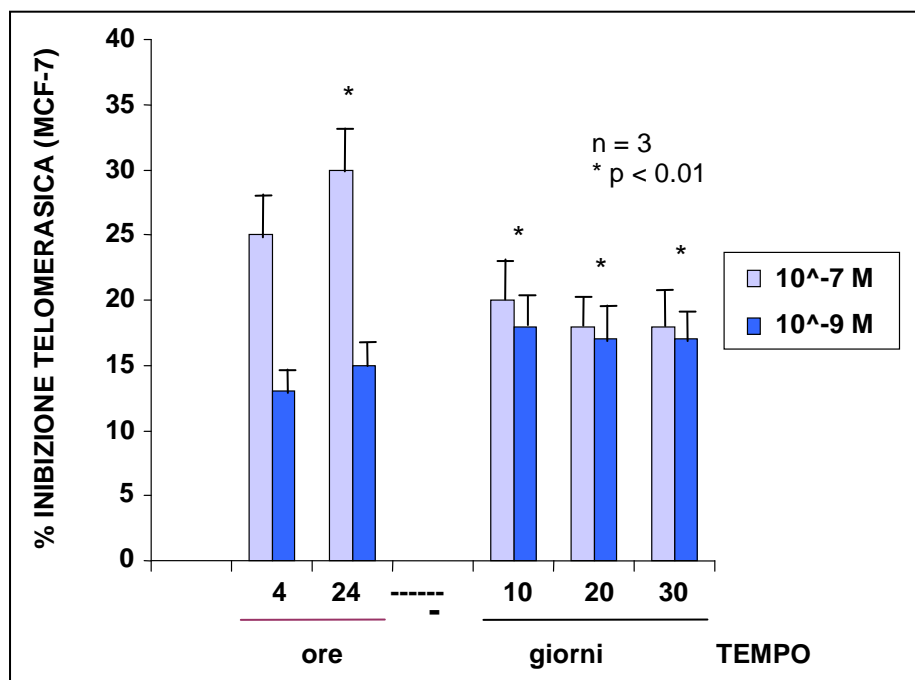


Figura 1.5.2.6.a. Inibizione telomerastica dopo 30 gg di trattamento con i diversi composti

Cellule NIH3T3: sono state seminate ad alta densità (10^6 cellule/piastra) e lasciate crescere a confluenza per 48 h. Dal momento (T_0) di piena confluenza, venivano lasciate in piastra per 14 giorni senza sostituire il terreno. Ad intervalli regolari (ogni 2 giorni) venivano lisate e l'attività residua telomerastica veniva misurata con il TRAP assay. I valori venivano calcolati considerando T_0 come livello di riferimento (100% di attività telomerastica). Si osservava che l'attività dell'enzima diminuiva in modo significativo nel tempo, fino a dimezzarsi dopo la prima settimana di quiescenza (8° giorno) e raggiungendo valori di ~40% dopo 14 giorni, probabilmente a causa di meccanismi di autoregolazione intrinseci della cellula, che vengono ad essere attivati dall'inibizione da contatto tipica di queste cellule, come dimostrato anche da altri autori (Holt et al., 1996). Questi meccanismi endogeni di modulazione dell'attività telomerastica sono alla base del corretto funzionamento delle cellule coinvolte nei processi di riparazione di danni tissutali, come nel caso dei fibroblasti, o della rigenerazione cellulare, come nel caso delle cellule germinali o ematopoietiche. L'esposizione continua a Ptquin8 inibiva l'attività telomerastica: infatti, in seguito a trattamento con 10^{-7} M all'8° giorno l'attività telomerastica residua era ~20% fino ad attestarsi su valori di ~10% al 14° giorno; l'inibizione attuata dal composto alla concentrazione 10^{-9} M era di minore entità, circa del 40% dall'8° giorno fino al 14°. La risemina delle cellule confluenti a l'8° giorno a bassa densità, facendo perdere alle cellule l'inibizione da contatto, comportava un incremento rapido dell'attività telomerastica entro 24-48 h fino al raggiungimento del suo valore massimo al 14° giorno. Il trattamento delle cellule riseminate con Ptquin8 velocemente inibiva tale effetto di ripristino dell'attività telomerastica (Figura 1.5.6.5.b. e c.).

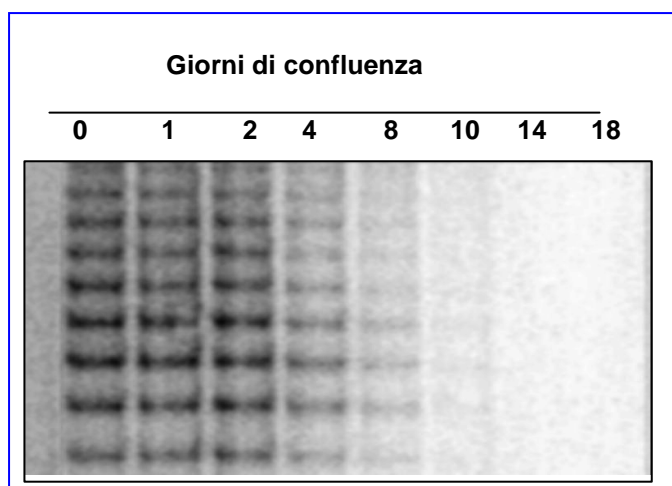


Figura 1.5.2.6.b. PAGE risultante da test Trap assay condotti per evidenziare la down-regolazione dell'attività telomerastica di cellule NIH3T3 al raggiungimento della confluenza.

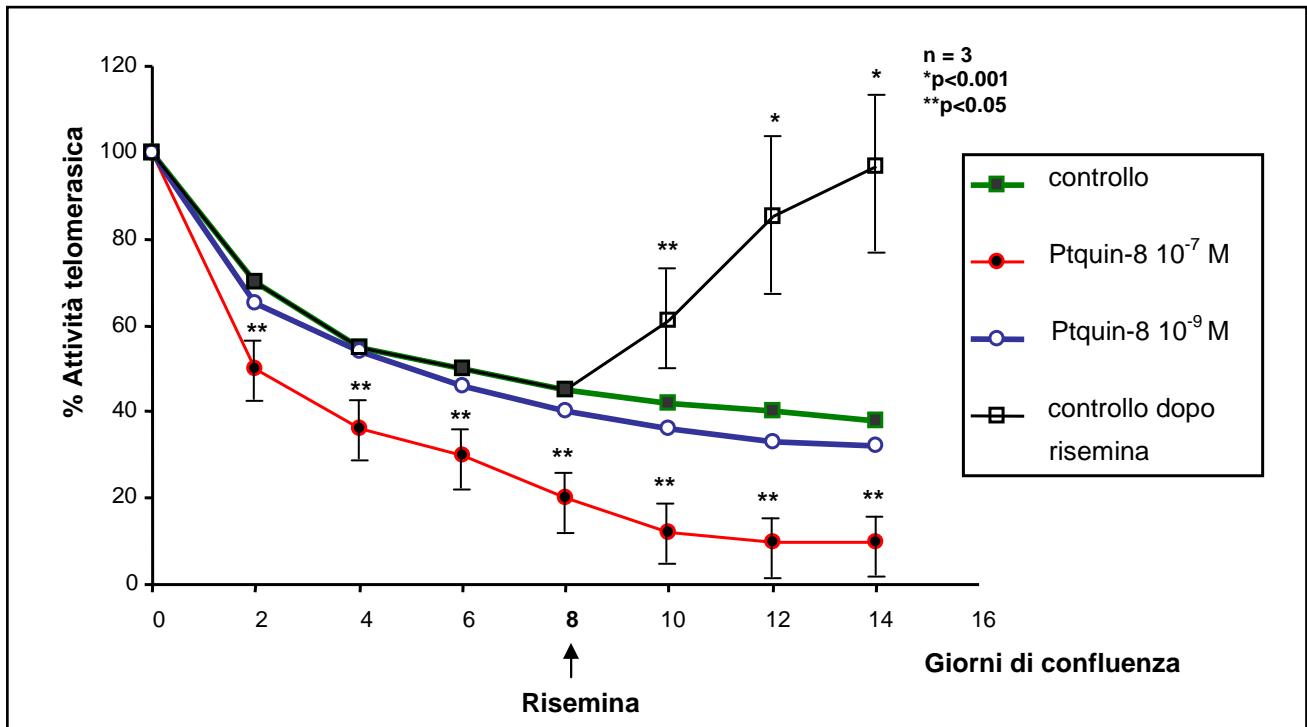


Figura 1.5.2.6.c. Trattamento con Ptquin-8 (10^{-7} e 10^{-9} M) di cellule NIH3T3: inibizione del ripristino dell'attività telomerasica dopo risemina.

1.5.2.7. Effetti di Ptquin8 (10^{-9} e 10^{-7} M) sulla capacità proliferativa e risposta apoptotica di cellule dopo trattamento di 30gg

Cellule MCF-7: Ptquin8 era in grado di ridurre la capacità proliferativa, sebbene il controllo visivo ed il test con blu tripano non rivelassero un numero consistente di cellule morte. Il trattamento con la concentrazione 10^{-7} M comportava una diminuzione del $(10 \pm 7)\%$ al 14° giorno, circa del 20% al 21° e del $(40 \pm 8)\%$ al 28° giorno, mentre con la concentrazione 10^{-9} M si osservava un valore stabile di circa 10% dal 21° al 28° giorno. Nuclei apoptotici erano evidenzia bili dal 18° giorno. Questo fenomeno era seguito da una progressiva morte cellulare dal 21° giorno, in acco rdo con i dati ottenuti dal test di vitalità. Al 30° giorno non vi erano più cellule vitali (Figura 1.5.2.7.a e b).

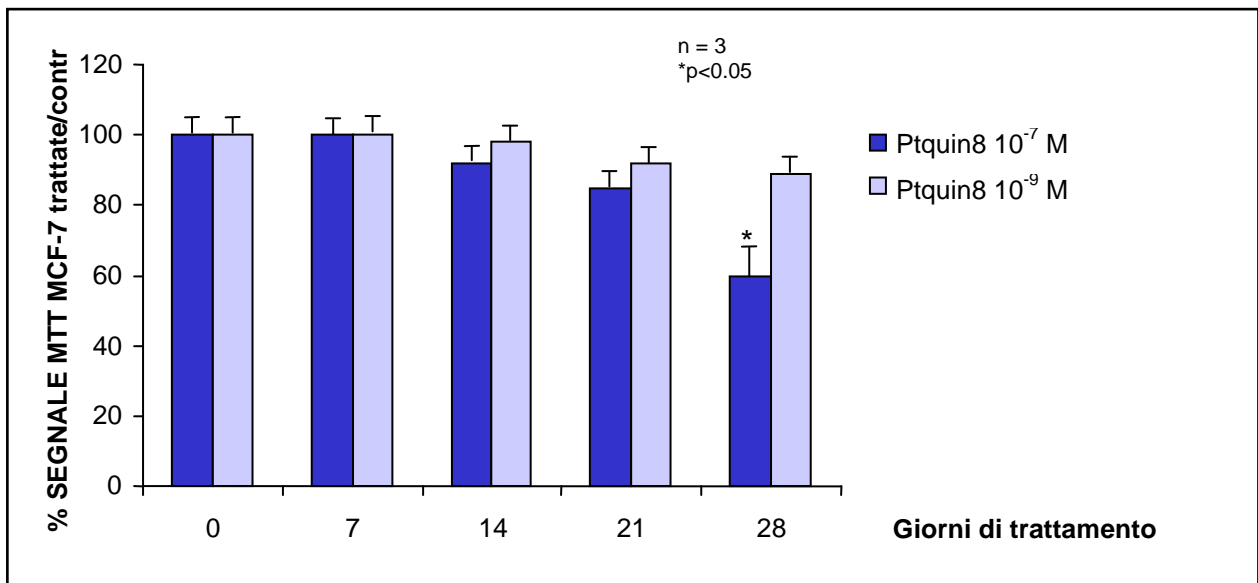


Figura 1.5.2.7.a . Effetti di Ptquin8 (10⁻⁹ e 10⁻⁷ M) sulla capacità proliferativa di cellule MCF-7 dopo trattamento di 30gg.

Cellule NHI3T3: in seguito a trattamento con Ptquin8 (10⁻⁷ M) non si osservava alcun effetto sulla capacità proliferativa e sul livello di confluenza dei monostrati cellulari e non erano evidenziabili nuclei apoptotici fino ad oltre 30 giorni di continua esposizione.

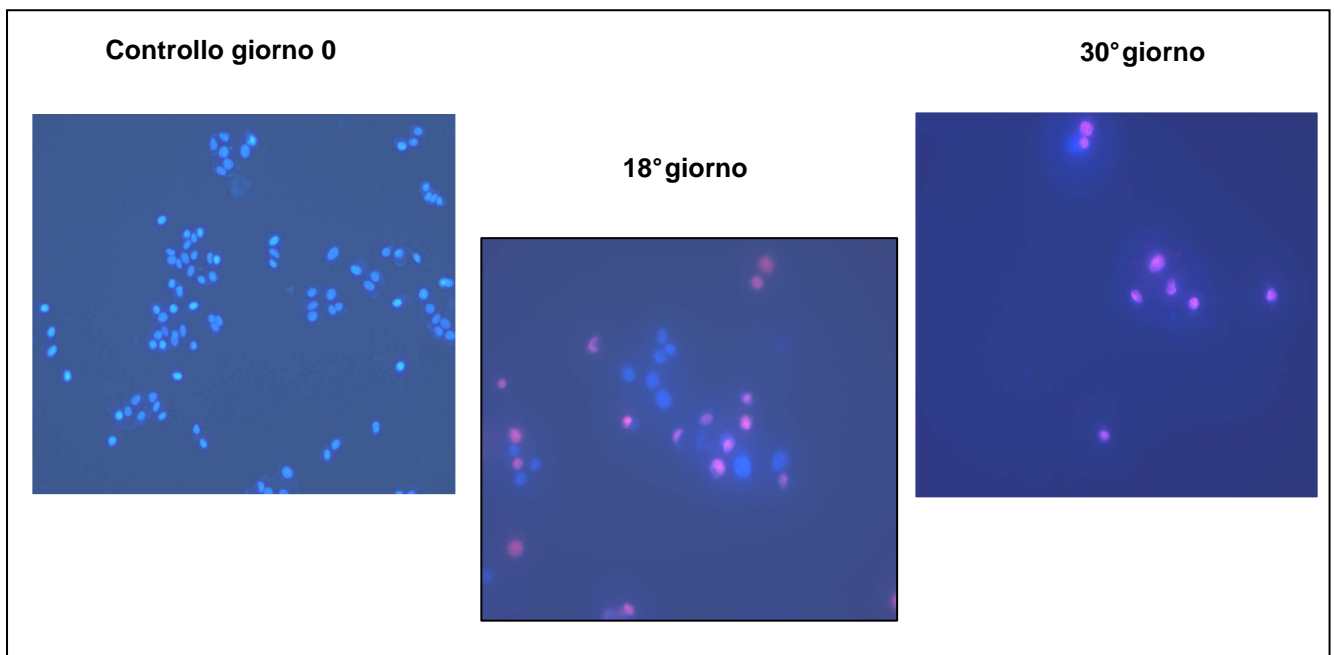


Figura 1.5.2.7.b. Test di apoptosi su cellule MCF-7 trattate con Ptquin-8 (10⁻⁷ M) per 30 giorni. Immagini al microscopio della coltura cellulare trattata ai diversi tempi. Condizioni sperimentali: le cellule venivano trattate ogni 36 h con terreno fresco condizionato con il composto. Test di doppia colorazione: **Hoechst 33342** (cellule vitali) e **ioduro di propidio** (cellule morte). A partire dal 18° giorno erano evidenziabili nuclei apoptotici. Questo fenomeno era seguito da una progressiva morte cellulare dal 21° giorno, in accordo con i dati ottenuti dal test di vitalità. Al 30° giorno non vi erano più cellule vitali.

1.5.2.8. Effetti di Ptquin8 (10^{-7} M) sulla lunghezza telomerica di cellule MCF-7

È stata evidenziata una progressiva diminuzione (~2.000 bp) della lunghezza telomerica rispetto al valore di controllo di circa 8.000 bp, a partire dal 14° giorno (Figura 1.5.2.8.).

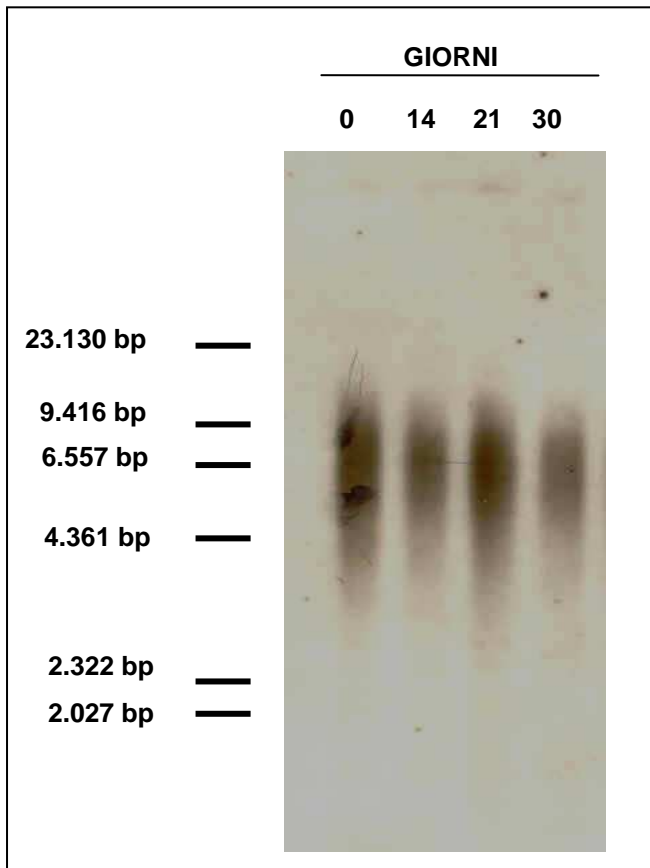


Figura1.5.2.8. Risultato di un esperimento di Southern blot per la determinazione della lunghezza telomerica. Le bande erano marcate con sonde radioattive (^{32}P) telomero-specifiche $(\text{T TAGGG})_4$. Si procedeva quindi all'analisi autoradiografica e densitometrica. Un trattamento a lungo termine con Ptquin8 induce una progressiva riduzione della lunghezza telomerica, evidenziabile dal 14° giorno. La banda corrispondente a zero (0) rappresenta il controllo non trattato. HindIII è stato utilizzato come bp ladder standard.

1.5.2.9. Effetti di Ptquin8 sull'espressione genica dei componenti della telomerasi (RT-PCR)

Ptquin8 (10^{-7} M), dopo 4, 20, 30 e 48 h di trattamento continuo non causava differenze nell'espressione di mRNA dei componenti della telomerasi, denominate hTERT, hTERC e TEP1, rispetto al controllo non trattato. I dati venivano normalizzati con l'espressione dell'housekeeper β -actina.

5.2.10. Determinazione dell'uptake dei composti del platino con ICP-MS

I dati ottenuti in seguito a trattamento continuo per 24 h di cellule MCF-7 alla concentrazione 0.1 μM di una serie di complessi Pt(II) sono riassunti in Tabella 1.5.2.10. e Figura 1.5.2.10. ed espressi come media \pm SD di 3 esperimenti indipendenti ciascuno condotto in triplicato.

complesso-Pt(II)	Uptake di Pt ng Pt/mg proteina	Concentrazione intracellulare (μM)	Grado di accumulo
Cisplatino	0,197 \pm 0,048	0,504	5,04
Carboplatino	0,063 \pm 0,017	0,162	1,62
Oxaliplatino	0,233 \pm 0,055	0,597	5,97
Ptquin8	0,193 \pm 0,053	0,495	4,95
Cis-PtPy	0,734 \pm 0,159	1,882	18,82
Trans-PtPy	2,121 \pm 0,426	5,438	54,38

Tabella 1.5.2.10. Dati di uptake ottenuti in seguito a trattamento continuo per 24h di cellule MCF-7 alla concentrazione 0.1 μM di una serie di complessi Pt(II).

In letteratura spesso l'uptake e l'accumulo di Pt sono considerati come sinonimi. Noi abbiamo considerato l'uptake di Pt come il contenuto totale di Pt riferito ad 1 mg di proteina (equivalente ad 1 milione di cellule circa), al contrario il grado di accumulo rappresenta il rapporto tra la concentrazione intracellulare e quella nel mezzo extracellulare del complesso, stimato considerando il volume di una singola cellula circa 2 pL (similmente altri autori hanno considerato il volume cellulare circa 3 μL /mg proteina). Dopo 24h di incubazione con i composti *cisplatino*, *carboplatino* ed *oxaliplatino*, era evidente un incremento lineare dell'uptake di Pt in funzione della concentrazione (0.1-10 μM). In esperimenti condotti con lunghi tempi di trattamento (1-48 h) era evidente che ogni composto esibiva una propria specifica curva di uptake, di cui caratteristica comune era la tendenza all'incremento, il raggiungimento di un equilibrio ed un inizio di diminuzione generalmente dopo 24h.

In particolare gli **isomeri PtPy** erano velocemente accumulati e quindi parzialmente eliminati dalle cellule.

L'uptake del *cisplatino* risultava rapido all'inizio del trattamento (0.1 μM , 48 h) quindi lentamente aumentava fino ad un plateau probabilmente raggiunto in seguito al danno dovuto ad un eccesso di

platinazione, che causa il blocco di proteine di membrana. Questi ultimi dati erano in accordo con la bibliografia (Reile et al., 1992).

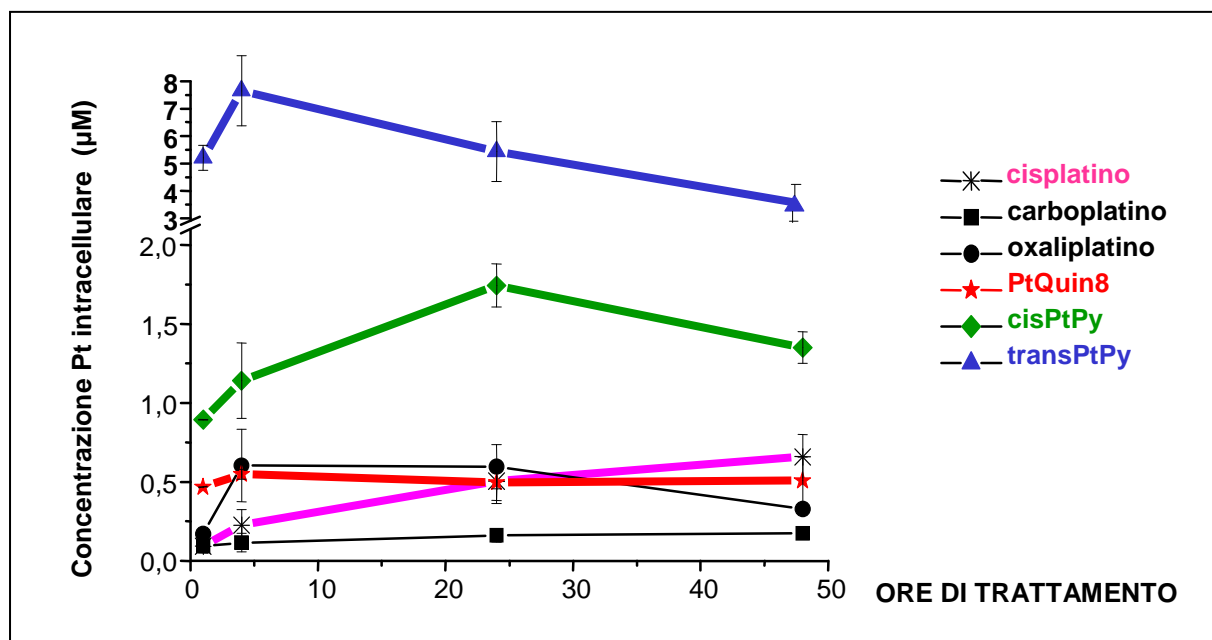


Figura 1.5.2.10. Curve di uptake di Pt da parte di cellule MCF-7 in seguito a trattamento con i diversi composti a concentrazione di 0.1 µM.

1.5.2.11. Determinazione del coefficiente di partizione ottanolo/H₂O (P₀/w)

Si è evidenziata una correlazione tra il coefficiente di partizione ottanolo/H₂O, misura della lipofilità del composto, e l'uptake del Pt. Tutti i composti testati con leganti cloro e dicarbossilici erano poco lipofili (Log P₀/w negativo), infatti i valori di (-log P₀/w) ottenuti erano: *cisplatin* ~2.5; *carboplatino* ~ 2.0; *oxaliplatino* ~ 1.8; Ptquin8 ~ 2.3 mentre il composto *trans-PtPy* esibiva la massima lipofilità (-log P₀/w ~ 0.4) e quindi il massimo valore di uptake (2,121 ± 0,426 ngPt/mg prot.). Anche il composto *cis -PtPy* risultava lipofilo (-log P₀/w ~ 0.6), in accordo con i suoi alti valori di uptake (0,734 ± 0,159 ngPt/mg prot.). Ptquin8 presentava una lipofilità simile al *cisplatin*, così come simili erano i loro valori di uptake (0,197 ± 0,048 e 0,193 ± 0,053 ngPt/mg prot., rispettivamente per il *cisplatin* e Ptquin8) (Figura 1.5.2.11).

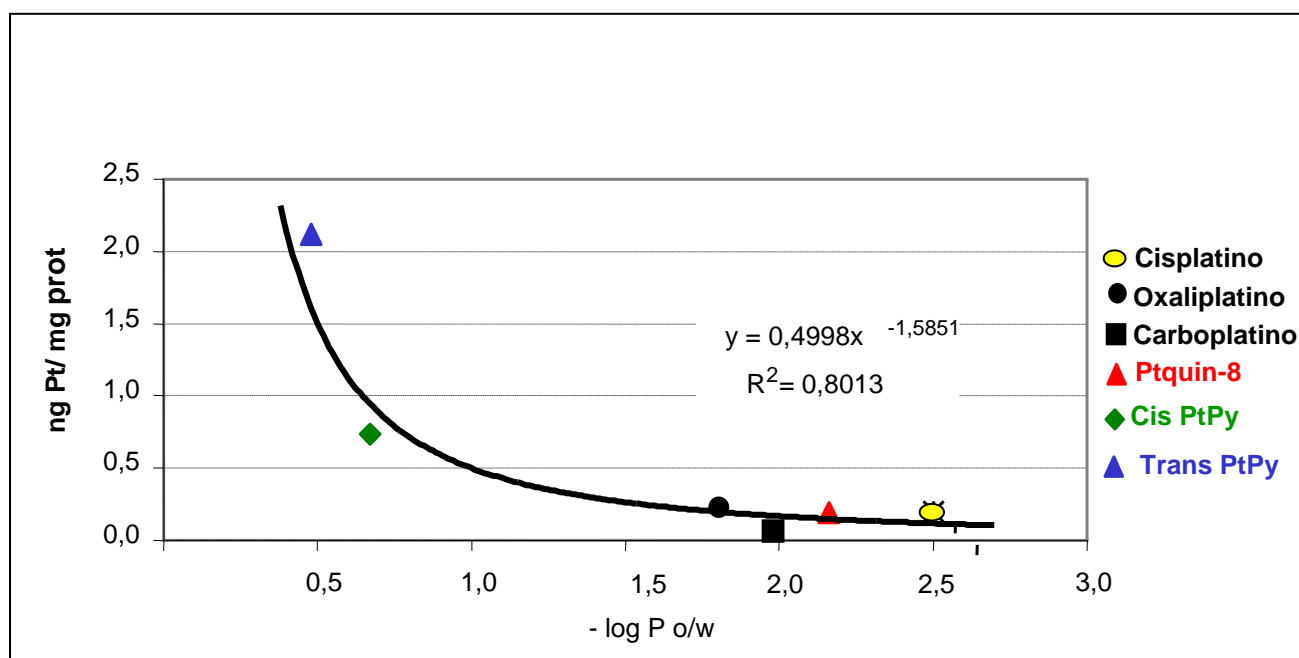


Figura 1.5.2.11. Liposolubilità di composti del platino. Contenuto di Pt come funzione dei valori di Log Po/w. Cisplatino (*), carboplatino (■), oxaliplatino (●), Ptquin8 (△), cis-PtPy (◆), trans-PtPy (▲) uptake (ng platino / mg proteina).

1.5.3. Complessi dell'Osmio

Tra tutti i composti testati solo il complesso $\text{HOs}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$ ha rivelato interessanti caratteristiche mentre tutti gli altri si sono dimostrati citotossici *in vitro* su cellule MCF-7 a concentrazioni comprese tra 10^{-5} - 10^{-9} M e con attività antitelomerasica aspecifica e non significativa (perché presentavano una significativa inibizione aspecifica nel test biochimico tipo 2). Sono quindi di seguito riportati solo i risultati ottenuti con il complesso $\text{HOs}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$.

1.5.3.1. Effetto di $\text{HOs}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$ sull'enzima telomerasi estratto

Tale composto era in grado di inibire l'attività telomerasica del $(56 \pm 3)\%$ al $(34 \pm 7)\%$ rispetto al controllo non trattato, nell'intervallo di concentrazione 10^{-4} - 10^{-7} M, con evidente stretta dose-dipendenza dell'effetto (Figura 1.5.3.1.).

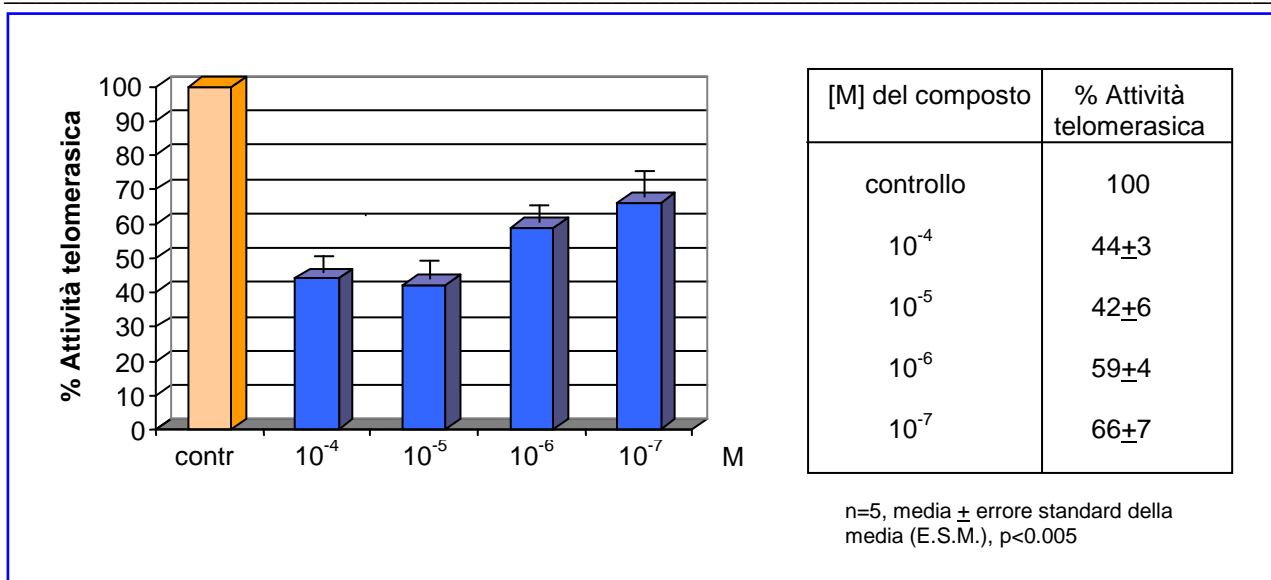


Figura 1.5.3.1. Effetto di $\text{HO}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$ sull'enzima telomerasi estratto (test biochimico tipo 1).

1.5.3.2. Effetto di $\text{HO}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$ sulla Taq polimerasi

Al fine di evidenziare possibili interazioni aspecifiche del composto con il sistema di amplificazione dei prodotti di reazione della telomerasi, si è ricorsi ad un test biochimico (di tipo 2). Si determinava l'attività della Taq polimerasi in seguito all'aggiunta del composto (da 10^{-4} a 10^{-7} M) effettuata immediatamente prima dell'inizio della fase di amplificazione del protocollo TRAP, ossia al termine dell'allungamento, avvenuta in condizioni ottimali da parte della telomerasi del telomero sintetico TS. I dati ottenuti non hanno dimostrato un'interferenza significativa sul sistema di amplificazione indicando un'azione inibitoria specifica e selettiva del composto sulla telomerasi (Figura 1.5.3.2.).

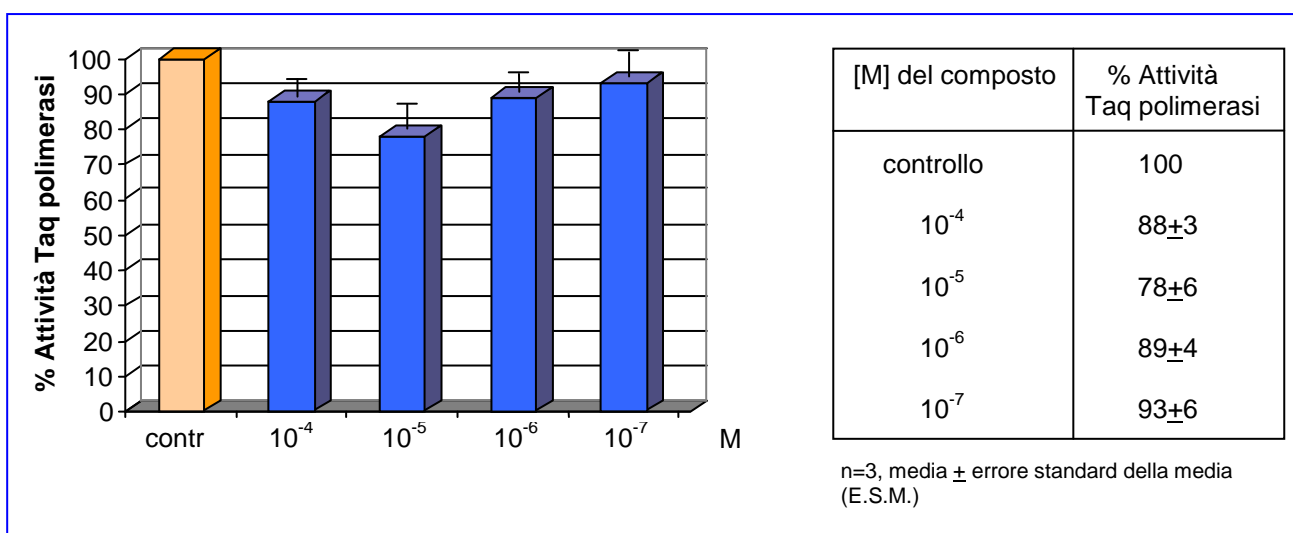


Figura 1.5.3.2. Effetto di $\text{HO}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$ sulla Taq polimerasi.

1.5.3.3. Effetti di $\text{HO}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$ sulla telomerasi di cellule MCF-7 dopo trattamento di 24 h. L'inibizione ottimale si otteneva dopo 24 h di trattamento (risultati molto simili si ottenevano infatti a 48h). I risultati ottenuti indicavano un'attività antitelomerastica compresa tra il (62±3)% ed il (25±3)% rispetto al controllo non trattato, nell'intervallo di concentrazioni 10^{-5} - 10^{-8} M, dose- dipendente. Tali dati erano in accordo con quelli ottenuti nel test biochimico 1 (Figura 1.5.3.3.).

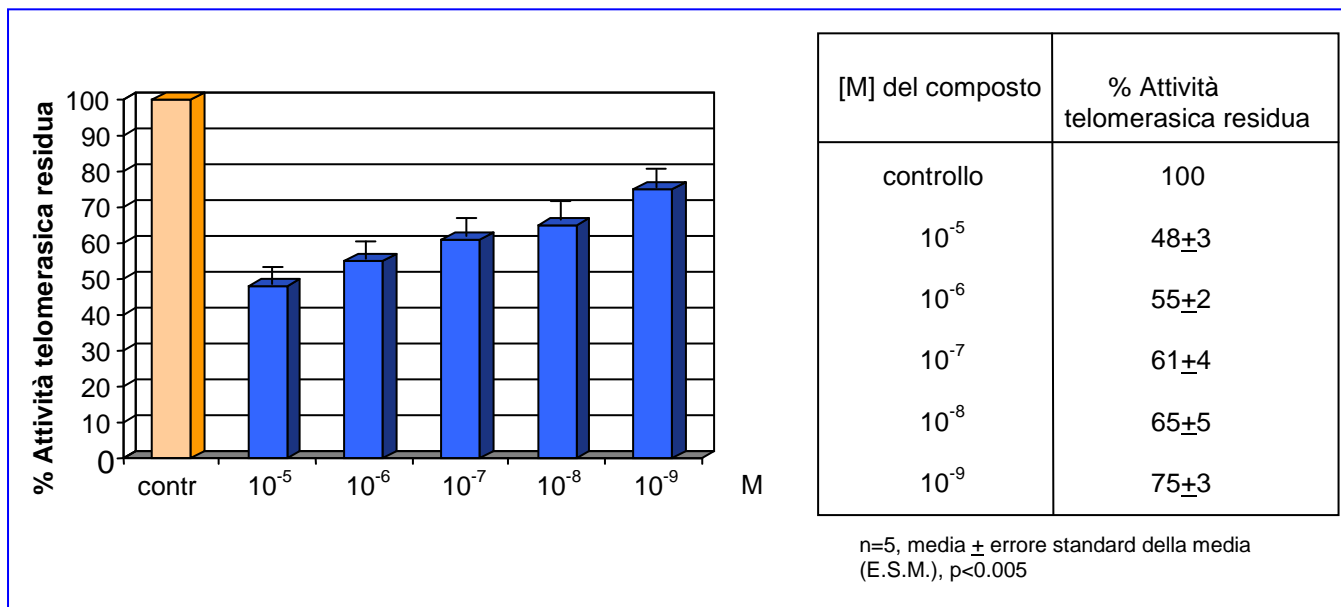


Figura 1.5.3.3. Effetti di $\text{HO}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$ sulla telomerasi di cellule MCF-7 dopo trattamento di 24 h.

1.5.3.4. Effetti di $\text{HO}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$ sulla vitalità di cellule MCF-7 dopo trattamento di 24 h. Non è stato evidenziato alcun significativo effetto citotossico alle diverse concentrazioni utilizzate (intervallo 10^{-5} - 10^{-9} M) (Figura 1.5.3.4.).

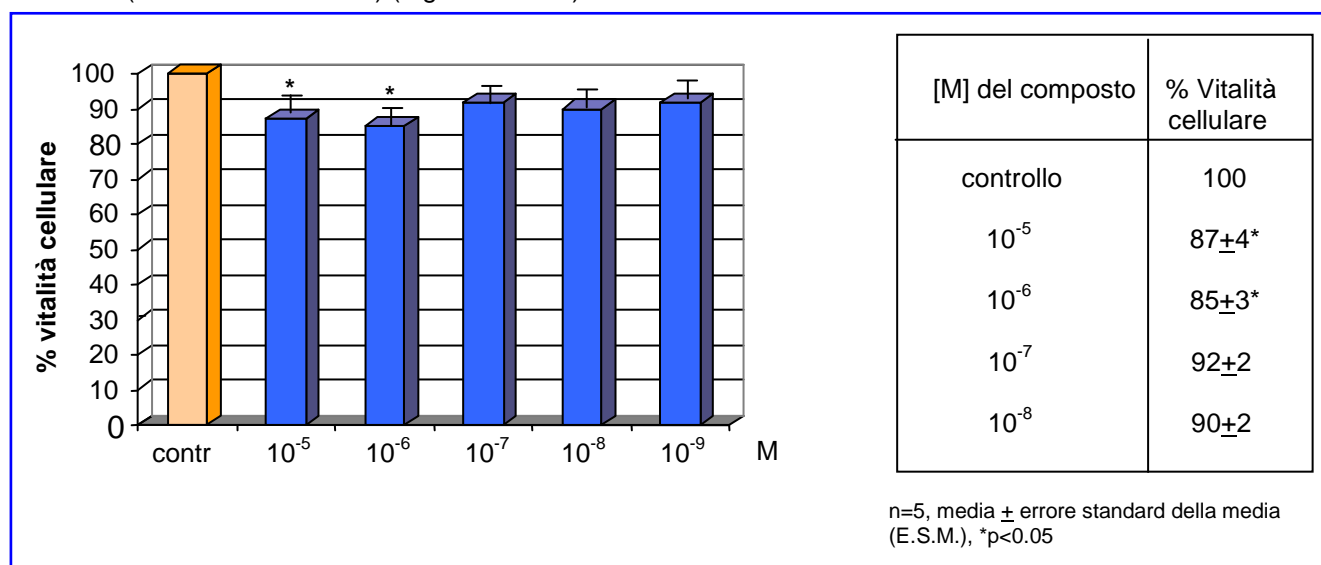


Figura 1.5.3.4. Effetti di $\text{HO}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$ sulla vitalità di cellule MCF-7 dopo trattamento di 24 h. Le cellule dopo il trattamento venivano lavate e rimesse in coltura con terreno fresco per altre 72 h.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI 1

1.6.1. Complessi a base di Sali di Ferrocenio

Il ferrocene ed i suoi derivati e corrispondenti Sali di Ferrocenio sono stati proposti da diversi autori come composti con attività antiproliferativa. I derivati del **ferrocene**, bis (η_5 ciclopentadienile) ferro (II), *in vitro* ed *in vivo* non mostrano alcuna attività antitumorale, a differenza dei loro corrispondenti **sali di ferrocenio** ($\text{Fe}^{\text{III}}-\eta^5[\text{C}_5\text{H}_5]_2^+$) X^- Fe, (Köpf-Maier et al., 1984; Houlton et al., 1991; Motohashi et al., 1990; Köpf-Maier et al., 1987; Wenzel et al., 1988). Il decametil-ferrocenio ha una buona azione citotossica a concentrazione 5 volte inferiore rispetto a quella del ferrocenio.

Il decametil-ferrocenio presenta un'attività citotossica modulabile variando il tempo di trattamento, e dose-dipendente. Il ferrocenio, invece, non presenta questo tipo di continuità nella risposta sperimentale e permette di avere solo inibizioni pressoché nulle oppure molto elevate.

La concentrazione necessaria per ottenere un'azione citotossica significativa del ferrocenio è troppo elevata per ipotizzare una futura applicazione in clinica di tale composto. Il decametil-ferrocenio, pur avendo un valore di IC_{50} abbastanza elevato, è comunque il più attivo dei Sali di Ferrocenio testati, e l'unico che potrebbe avere una qualche applicazione clinica. Tutti i composti testati mostrano un'azione antiproliferativa dovuta al processo di degradazione che porta alla formazione di specie citotossiche. La citotossicità sembra quindi strettamente correlata alla loro stabilità chimica. Infatti, per i composti stabili, come il DEMFc^+ , si può ipotizzare che nel citosol possa avvenire una produzione lenta e costante di specie radicaliche [radicali idrossilici e superossidi, come dimostrato da misure ESR (Tabbì et al., 2001) con la tecnica dello spin-trapping]. Esse quindi, sarebbero responsabili della citotossicità osservata e la loro produzione dipendente dallo stato di ossidazione +3 dell'atomo di ferro centrale. Il DMFc^+ , che mostra una trasformazione radicalica più lenta, potrebbe raggiungere concentrazioni significative all'interno delle cellule e quindi consentire una produzione costante e continua, per tempi sufficientemente lunghi, di specie radicaliche. Questo meccanismo spiegherebbe la forte dipendenza dell'effetto citotossico del decametil-ferrocenio dal tempo di trattamento delle cellule. Quindi l'effetto citotossico "finale" dipende dal tempo di esposizione delle cellule alla produzione di tali specie.

I ferroceni più instabili, invece, potrebbero subire la trasformazione radicalica già all'esterno, che si traduce in una rapida attività citotossica evidenziata solo a dosi elevate (Minotti et al., 1987 e 1992).

Queste specie radicaliche sarebbero responsabili di danni al DNA, così come è stato direttamente dimostrato mediante analisi al FACS per il composto DEMFc+. È stata quindi dimostrata una diretta correlazione tra l'attività antiproliferativa di questo composto ed i danni provocati al DNA.

1.6.2. Complessi del Platino

Il composto Ptquin8 ha presentato interessanti caratteristiche farmacologiche quali la buona attività antitelomerasica presente a dosi molto basse (10^{-9} e 10^{-7} M), la scarsa tossicità cellulare e la buona solubilità in solvente acquoso e stabilità in condizioni fisiologiche. L'osservazione che Ptquin8 induce un rapido decremento dell'attività telomerasica suggerisce una interazione diretta con il pool esistente dell'enzima piuttosto che con la sintesi dei costituenti della telomerasi, come dimostrato con il test di RT-PCR. Inoltre nelle cellule NHI3T3, in cui la neosintesi dell'enzima è down-regolata con il raggiungimento della confluenza, il composto induce una rapida riduzione dell'attività telomerasica, supportando così l'ipotesi di una interazione diretta con l'enzima.

Nonostante non si raggiunga un'inibizione totale dell'attività telomerasica con il composto Ptquin8 a nessuna delle concentrazioni testate, si ottiene una destabilizzazione dell'omeostasi telomerica, causando un progressivo accorciamento telomerico e la comparsa di apoptosi. Questi fenomeni osservati correlano con i dati ottenuti dallo studio della capacità proliferativa che risulta progressivamente ridotta ma così non la loro vitalità. Ptquin8 infatti causa apoptosi solo in seguito a trattamenti a lungo termine. Gli effetti non significativi dei trattamenti sulla risposta apoptotica e capacità proliferativa osservati per la linea NHI3T3 possono essere spiegati considerando la sua origine murina, quindi caratterizzata dal possedere telomeri molto più lunghi (Lejnine et al., 1995) delle cellule umane come appunto le MCF-7.

Non è stata rivelata una significativa correlazione tra i valori di IC_{50} e sia l'uptake che l'accumulo di Pt, come già dimostrato per il *cisplatino* (Mishima et al., 2002). I ligandi piridinici di *cis*- e *trans*-PtPy potrebbero rendere tali isomeri lipofili favorendo la diffusione passiva attraverso la membrana, giustificando così i valori alti di accumulo ed uptake ottenuti per essi rispetto agli altri composti considerati. L'alto valore di accumulo ed uptake ottenuto con il *trans*-PtPy rispetto agli isomeri *cis* potrebbe essere conseguenza della più bassa polarità intrinseca della geometria *trans* rispetto alla *cis* e comunque è in accordo con i dati della bibliografia su altri tipi cellulari e altri composti. Nel caso di Ptquin8 la lipofilità dei leganti piridina e

isochinolina risulta controbilanciata dal gruppo solfonico ionizzabile, così che il grado di accumulo ed uptake risulta minore dei composti piridinici e comparabile al *cisplatin*, ma con un IC₅₀ di molto superiore.

I possibili sviluppi dello studio di questo tipo di composti consistono nei seguenti aspetti:

- determinare l'effetto antitelomerasico e l'eventuale citotossicità di nuovi composti derivati dalla sostituzione nei carrier groups dei composti [*trans*-dicloro-dipiridina-Pt(II)] ed il corrispondente isomero *cis* con gruppi solfonici atti a ottimizzarne la solubilità in ambiente fisiologico. Si eviterebbe così l'uso del cosolvente DMSO, che potrebbe causare un effetto aspecifico sia di citotossicità che di inibizione della telomerasi
- disegno e sintesi di derivati ormonali a base di platino, in grado di direzionare l'effetto citotossico del metallo selettivamente nelle cellule neoplastiche ormone-dipendenti.

Recentemente è stato elegantemente dimostrato che l'attività della telomerasi viene modulata positivamente attraverso l'espressione diretta di hTERT indotta da estrogeni. Infatti, sulla sequenza 5'-prossimale del promoter è stato identificato un "estrogen responsive element" (ERE) che è in grado di legare il recettore per estrogeni di tipo α (ER α) (Misiti et al., 2000). La stimolazione dei recettori con 17 β -estradiolo in cellule che presentavano il recettore è in grado di indurre una notevole attività trascrizionale di hTERT entro le 3 ore. Questa osservazione permette di formulare una strategia chemioterapica che utilizzi complessi metallorganici con cui funzionalizzare ormoni, ed in questo caso particolare, il 17 β -estradiolo, con un braccio amminico in grado di coordinare un frammento di dicloroPt (II), così che la reattività alchilante del platino verrebbe concentrata in corrispondenza degli estrogen responsive elements (ERE), sul DNA (presenti anche a livello del promoter per hTERT). In questo modo si cercherà di regolare negativamente l'attività della telomerasi in cellule tumorali che presentino ancora il recettore per l'estrogeno.

- Le proprietà citotossiche o citostatiche dei derivati sono state valutate su linee cellulari ER+ quali quelle di adenocarcinoma mammario (MCF-7) e comparate con linee omologhe ER- (vedi Articolo allegato a questa tesi a pag.123: Gabano E, Cassino C, Bonetti S, Prandi C, Colangelo D, Ghiglia A, Osella D. *Synthesis and characterisation of estrogenic carriers for cytotoxic Pt(II) fragments: biological activity of the resulting complexes*. Org Biomol Chem. **2005 Nov** 7;3(19):3531-9. **Epub 2005 Aug** 22.)
- utilizzo di nucleotidi funzionalizzati con un frammento a base di platino reattivo, in grado di essere riconosciuti come substrati dell'enzima telomerasi ed interagire attivamente con la porzione catalitica dell'enzima stesso

-
- molecole costituite da opportuni complessi cationici di platino in grado di interagire con i quartetti guaninici dei telomeri e/o di inibire l'enzima telomerasi in modo diretto.

Studi *in vivo* su animali potranno in futuro dimostrare l'importanza dell'attività degli inibitori della telomerasi ed il loro ruolo nel disegno di una terapia antitumorale.

1.6.3. Complessi dell'Osmio

Il composto $\text{HOs}_3(\text{CO})_9(3\text{-amminochinolina})[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_3]$ ha dimostrato di possedere interessanti caratteristiche farmacologiche così riassumibili:

- la buona attività antitelomerasica evidenziabile a dosi molto basse (10^{-6} - 10^{-7} M);
- la scarsa tossicità cellulare;
- la buona solubilità in solvente acquoso.

I risultati sopra riportati suggeriscono quindi la possibilità di un'azione specifica di tale composto nell'inibire la telomerasi.

Per questo composto si propone un' interazione con la sua subunità catalitica hTERT (inibizione per ingombro sterico di tale sito attivo), che necessita di ulteriori studi più approfonditi, sia biologici che chimici. L'identificazione dei meccanismi influenzati da trattamenti di cellule tumorali a lungo termine (es.10 gg.) con questo composto potrebbero chiarirne la relazione tra struttura ed effetto consentendo di migliorare la potenza e selettività di questa classe di complessi di osmio.

CONCLUSIONI 1

La chemioterapia attuale si avvale di composti di natura organometallica che agiscono con diversi meccanismi di azione. Recentemente molti studi farmacologici sono rivolti alla realizzazione di composti con attività più specifica e selettiva verso bersagli tumorali, tra cui appunto la telomerasi. Nell'ambito di questo Dottorato di ricerca il mio studio sperimentale ha riguardato l'analisi dell'attività di nuovi complessi organometallici originali. Il disegno e sintesi di tali complessi sono stati realizzati con l'intento di esaltarne o conferirne una possibile attività specifica antitelomerasica, quindi alla luce delle conoscenze riguardanti il meccanismo d'azione dell'enzima e la sua struttura.

Tra i composti organometallici analizzati i Sali di Ferrocenio, scelti in quanto caratterizzati da attività antitumorale dimostrata *in vitro*, non presentavano un'attività antitelomerasica specifica, evidenziando una citotossicità aspecifica correlata con un meccanismo di tipo radicalico responsabile di danni al DNA.

I composti a base di Platino ed Osmio invece hanno evidenziato un'attività antitelomerasica in un range di concentrazioni 10^{-7} - 10^{-9} M, sia nei test di tipo biochimico su enzima isolato che in esperimenti *in vitro* (attività complessiva residua dell'enzima estratto da cellule trattate).

Tra queste due classi di composti basati su metalli differenti, il Platino e l'Osmio, i più promettenti sembrano essere i primi, di cui sono noti molti aspetti del meccanismo d'azione, identificabile in un'attività di tipo alchilante delle basi nucleotidiche, specificamente delle regioni ricche di guanina come le telomeriche del DNA e la componente ad RNA della telomerasi.

L'inibizione antitelomerasica può essere di due tipi, diretta od indiretta e l'apporto di ciascuno di essi all'effetto finale non è sempre chiaramente quantificabile.

Un'inibizione di tipo diretta, consistente nell'interazione con il sito catalitico della telomerasi e la sequenza dei telomeri, è dimostrabile per i complessi a base di Platino, mentre probabilmente i composti di Osmio risultano attivi per ingombro sterico impedendo il riconoscimento telomero-telomerasi.

L'inibizione di tipo indiretta, identificabile per esempio in un effetto negativo a livello trascrizionale delle componenti dell'enzima stesso, non è stata riscontrata per questo tipo di composti.

Questi dati, presi nel loro complesso, dimostrano come la possibilità di costruire molecole in grado di interagire con la telomerasi possa rappresentare un interessante sviluppo chemioterapico.

Questa tesi ha permesso di dimostrare che i complessi organometallici per essere attivi contro target specifici devono necessariamente possedere alcune caratteristiche: anzitutto la reattività del metallo sul quale

è disegnata la molecola deve essere tale da consentire una interazione che avvenga con una cinetica e una selettività di legame che solo il Platino sembra possedere. L'estesa letteratura ha dimostrato infatti per tutti i composti a base di Platino una selettività di legame non solo diretta contro le basi nuclotidiche ma soprattutto per la guanina.

Dati sperimentali da noi prodotti hanno del resto cercato di migliorare la selettività del platino stesso, cercando di veicolarlo con ormoni direttamente su porzioni specifiche del menoma (vedi Articolo allegato a questa tesi a pag. 123: Gabano E, Cassino C, Bonetti S, Prandi C, Colangelo D, Ghiglia A, Osella D. *Synthesis and characterisation of estrogenic carriers for cytotoxic Pt(II) fragments: biological activity of the resulting complexes*. Org Biomol Chem. **2005 Nov** 7;3(19):3531-9. Epub **2005 Aug** 22.)

Questi esperimenti dimostrano che è possibile aumentare notevolmente il grado di selettività per un target cellulare, anche se hanno mostrato il limite della veicolazione di un frammento citotossico mediante un ormone. Il numero dei recettori ormonali, infatti, non giustificerebbe in alcun modo un grado sufficiente di citotossicità e rappresenta quindi solo un modello sperimentale.

Altri metalli, come ad esempio il ferro, hanno una reattività che prescinde dal bersaglio con il quale interagiscono e che è mediata esclusivamente da meccanismo ossidoreduttasico. All'opposto, un metallo come l'osmio non ha una capacità di indurre interazioni di tipo irreversibile in condizioni fisiologiche opportune e quindi non rappresenta un modello ottimale sul quale sviluppare farmaci dotati di attività citotossica.

La telomerasi rimane sicuramente un interessante target sul quale continuare a sperimentare molecole che ne inibiscano la funzione perché garantirebbe una specificità di intervento terapeutico ed una riduzione del potenziale citotossico aspecifico della chemioterapia.

BIBLIOGRAFIA 1

A.Bar Din et al., *Pplyhedron* **1998**, vol. 17.

Ahmed S, Henderson E. Formation of novel hairpin structures by telomeric C-strand oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **1992** Feb 11;20(3):507-11.

Aragona M, Maisano R, Panetta S, Giudice A, Morelli M, La Torre I, La Torre F. Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis. *Int J Oncol.* **2000** Nov;17(5):981-9.

Atkinson SP, Hoare SF, Glasspool RM, Keith WN. Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters. *Cancer Res.* **2005** Sep 1;65(17):7585-90.

Autexier C, Lue NF. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase. *Annu Rev Biochem.* **2006** Mar 14; [Epub ahead of print].

Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J, Shay JW, Bacchetti S, Greider CW. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res* **1996** Feb 1;56(3):645-50.

B.K. Keppler (ed), *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, Weinheim.

Bancroft, D P , Lepre ,C A , Lippard , SJJ..*Am Chem Soc* **1990**,112,6860-6871.

Berners-Price SJ, Frenkiel TA, Frey U, Ranford JD, Sadler PJ. *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 789-791.

Bielski B.; Cabelli,D. E.Highlights of Current Research Involving Superoxide and Perhydroxyl Radicals in Aqueous Solutions.*Int.J.Radiat.Biol.* **1991**, 59,291-319 (19.)

Bierbach U and N Farrell. *Inorg Chem*, 36 (1997)3657-3665.

Blackburn EH.Structure and function of telomeres. *Nature* **1991** Apr 18;350(6319):569-73 (a).

Blackburn EH.Telomeres. *Trends Biochem Sci* **1991** Oct;16(10):378-81 (b).

Blackburn EH.Telomerases. *Annu Rev Biochem* **1992**;61:113-29.

Blommaert FA, van Dijk-Knijnenburg HC, Dijt FJ, den Engelse L, Baan RA, Berends F, Fichtinger-Schepman AM. Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry.* **1995** Jul 4;34(26):8474-80.

Brabec V, Leng M. DNA interstrand cross-links of trans-diamminedichloroplatinum(II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993** Jun 1;90(11):5345-9.

Bryan TM, Goodrich KJ, Cech TR.Telomerase RNA bound by protein motifs specific to telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell.* **2000** Aug;6(2):493-9.

Budarf M, Blackburn E..S1 nuclease sensitivity of a double-stranded telomeric DNA sequence. *Nucleic Acids Res* **1987** Aug 11;15(15):6273-92.

Buettner G. R. Spin Trapping: ESR Parameters of Spin Adducts. *Free Radic. Biol. Med.* **1987**, 3, 259-303.

-
- Burger AM**, Double JA, Newell DR.. Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur J Cancer* **1997** Apr;33(4):638-44.
- Cavigliolo G**, Benedetto L, Boccaleri E, Colangelo D, Viano I, Osella D. Pt(II) complexes with different N-donor aromatic ligands for specific inhibition of telomerase. *Inorg Chim Acta* **305** (2000) 61-68.
- Cech and Angew**, *Chem Int. Ed*, 2000.
- Chen JL**, Blasco MA, Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*. **2000** Mar 3;100(5):503-14.
- Cheng H**, Wu Z, Zheng J, Lu G, Yan J, Liu M, Huang D, Lin J. Inhibition on telomerase activity and cytotoxic effects by cisplatin in cultured human choroidal melanoma cells. *Yan Ke Xue Bao*. **2003** Mar;19(1):54-9.
- Chu G**. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem*. **1994** Jan 14;269(2):787-90.
- Cohen SM** and Lippard SJ. Cisplatin:from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **2001**; 67:93-130.
- Colangelo D**, Osella D. Telomerase inhibition and cancer: might platinum based drugs have a future as anti-telomerase pharmacological approach? *Curr Med Chem*. **2005**;12(26):3091-102.
- Collins K**, Gandhi L. The reverse transcriptase component of the Tetrahymena telomerase ribonucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998** Jul 21;95(15):8485-90.
- Davies MS**, Berners-Price SJ, Cox JW, Farrell N. The nature of the DNA template (single- versus double-stranded) affects the rate of aquation of a dinuclear Pt anticancer drug. *Chem Commun (Camb)*. **2003** Jan 7;(1):122-3.
- Davies MS**, Cox JW, Berners-Price SJ, Barklage W, Qu Y, Farrell N. Equilibrium and kinetic studies of the aquation of the dinuclear platinum complex $[[\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2]_2(\mu\text{-NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2)]_2^{2+}$: pKa determinations of aqua ligands via $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ NMR spectroscopy. *Inorg Chem*. **2000** Apr 17; 39 (8): 1710-5.
- Dedon PC** e Borch RF. Characterization of the reactions of platinum antitumor agents with biologic and nonbiologic sulfur-containing nucleophiles. *Biochem Pharmacol*. **1987** Jun 15;36(12):1955-64.
- De Kok JB**, Zendman AJ, van de Locht LT et al. Real-time htert quantification : a promising telomerase-associated tumor marker. *Laboratory Investigation*, July **1999**, vol. 79, n°7: 911-912.
- De Zwart L. L.**; Meerman, J. H. N.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans. *Free Radical Biol. Med*. **1999**, 26, 202-226.
- Dhaene K**, Van Marck E, Parwaresch R, 2000 Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch* **2000**, 437: 1-16.
- Di Biasi P**, Bernaggeri A, Beggiolin G, Piazzoni L, Menta E, Formento ML. Cytotoxicity, cellular uptake and DNA binding of the novel trinuclear platinum complex BBR 3464 in sensitive and cisplatin resistant murine leukemia cells. *Anticancer Res* **1998**, 18, 3113-3118.
- Dikmen E**, Kara M, Dikmen G, Cakmak H, Dogan P, Detection of telomerase activity in bronchial lavage as an adjunct to cytological diagnosis in lung cancer *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* **2003**, 23: 194-200.
- Duling D. R**. Simulation of Multiple Isotropic Spin Trap EPR Spectra. *J. Magn. Reson*. **1994**, B 104, 105-110.
- Eastman A**, Schulte N. Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*. **1988** Jun 28;27(13):4730-4.

-
- Eastman A.** Glutathione-mediated activation of anticancer platinum (IV) complexes. *Biochem. Pharmacol.*, **1987**, *46*, 4177.
- Faiola F,** Liu X, Lo S, Pan S, Zhang K, Lyman E, Farina A, Martinez E. Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol.* **2005** Dec;25(23):10220-34.
- Falchetti ML,** Levi A, Molinari P, Verna R, D'Ambrosio E. Increased sensitivity and reproducibility of TRAP assay by avoiding direct primers interaction. *Nucleic Acids Res.* **1998** Feb 1;26(3):862-3.
- Faraoni I,** Graziani G, Turriziani M, Masci G, Mezzetti M, Testori A, Veronesi U, Bonmassar E. Suppression of telomerase activity as an indicator of drug-induced cytotoxicity against cancer cells: in vitro studies with fresh human tumor samples. *Lab Invest.* **1999** Aug;79(8):993-1005.
- Farrell N.** Current status of structure-activity relationships of platinum anticancer drugs. Activation of the trans geometry. *Metal Ions in Biol Syst* **1996**, 32603.
- Farrell N,** Kelland LR, Roberts JD, Van Beusichem M.. Activation of the trans geometry in platinum antitumor complexes: a survey of the cytotoxicity of trans complexes containing planar ligands in murine L1210 and human tumor panels and studies on their mechanism of action. *Cancer Res* **1992** Sep 15;52(18):5065-72.
- Farrell N,** Qu Y, Hacker MP. Cytotoxicity and antitumor activity of bis(platinum) complexes. A novel class of platinum complexes active in cell lines resistant to both cisplatin and 1,2-diaminocyclohexane complexes. *J Med Chem.* **1990** Aug;33(8):2179-84.
- Feng J,** Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, et al. The RNA component of human telomerase. *Science.* **1995** Sep 1;269(5228):1236-41.
- Fichtinger-Schepman AM,** van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* **1985** Jan 29;24(3):707-13.
- Fram RJ,** Cusick PS, Wilson JM, Marinus MG. Mismatch repair of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA damage. *Mol Pharmacol.* **1985** Jul;28(1):51-5.
- Fu W,** Killen M, Culmsee C, Dhar S, Pandita TK, Mattson MP. The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function. *J Mol Neurosci.* **2000** Feb-Apr;14(1-2):3-15.
- Fuertes MA,** Castilla J, Alonso C and Pérez JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem* **2003**, 10:1241-1253.
- Furuta M,** Nozawa K, Takemura M, Izuta S, Murate T, Tsuchiya M, Yoshida K, Taka N, Nimura Y, Yoshida S. A novel platinum compound inhibits telomerase activity in vitro and reduces telomere length in a human hepatoma cell line. *Int J Cancer.* **2003** May 10;104(6):709-15.
- Gately DP** and Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *Br J Cancer* **1993**, 67:1171-1176.
- Ge Z,** Liu C, Bjorkholm M, Gruber A, Xu D. Mitogen-activated protein kinase cascade-mediated histone H3 phosphorylation is critical for telomerase reverse transcriptase expression/telomerase activation induced by proliferation. *Mol Cell Biol.* **2006** Jan;26(1):230-7.
- Gilson E,** Roberge M, Giraldo R, Rhodes D, Gasser SM. Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J Mol Biol.* **1993** May 20;231(2):293-310.
- Glukhov AI,** Zimnik OV, Gordeev SA, Severin SE. Inhibition of telomerase activity of melanoma cells in vitro by antisense oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* **1998** Jul 20;248(2):368-71.

Goddard PM, Orr RM, Valenti MR, Barnard CF, Murrer BA, Kelland LR, Harrap KR. Novel trans platinum complexes: comparative in vitro and in vivo activity against platinum-sensitive and resistant murine tumours. *Anticancer Res* **1996** Jan-Feb;16(1):33-8.

Goldstein G.; Meyerstein, D.; Czapski, G. The Fenton Reagents. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, 15, 435-445.

Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol.* **2001** Apr;59(4):657-63.

Goytisolo FA, Blasco MA Many ways to telomere dysfunction: in vivo studies using mouse models. *Oncogene.* **2002** Jan 21;21(4):584-91

Guminski AD, Harnett PR, deFazio A. Scientists and clinicians test their metal-back to the future with platinum compounds. *Lancet Oncol* **2002**; 3:312-18.

Guo Z, Chen Y, Zang E, Sadler PJ. *J. Chem Soc., Dalton Trans.* **1997**, 4107-4111.

Hahn W. C., *Journal of clinical oncology*, Vol 21, No 10 (May 15), **2003**: pp 2034-2043.

Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* **1999** Oct;5(10):1164-70.

Hanahan D and Weinberg RA The hallmarks of cancer *Cell* **2000**, 100:57-70.

Harley CB. Telomerase is not an oncogene. *Oncogene.* **2002** Jan 21;21(4):494-502.

Harrington L. Biochemical aspects of telomerase function. *Cancer Lett.* **2003** May 15;194(2):139-54.

Havener JM, McElhinny SAN, Bassett E, Gauger M, Ramsden DA and Chaney SG. Translesion synthesis past platinum DNA adducts by human DNA polymerase μ . *Biochemistry* **2003**, 42, 1777-1788.

Henderson E, Hardin CC, Walk SK, Tinoco I Jr, Blackburn EH. Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell* **1987** Dec 24;51(6):899-908.

Hindmarsh K, House DA, Turnbull MM. *Inorg. Chim. Acta* **1997**, 257, 11-18.

Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett.* **2003** May 15;194(2):221-33.

Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* **2002**, 21:643-649.

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Shay JW. Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia*, **2001**, 3: 17-26.

Holt SE, Wright WE, Shay JW Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol Cell Biol.* **1996** Jun;16(6):2932-9.

Horikawa I, Cable PL, Afshari C, Barrett JC Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res.* **1999** Feb 15;59(4):826-30.

Hou M, Xu D, Bjorkholm M, Gruber A. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chem.* **2001**, 47(3):519-24.

-
- Houlton A.**; Roberts, R. M. G.; Silver, J. Studies on the Anti-tumour Activity of Some Iron Sandwich Compounds. *J. Organomet. Chem.* **1991**, *418*, 107-112.
- Johnson NP**, Hoeschele JD, Rahn RO. Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA. *Chem Biol Interact.* **1980** May;30(2):151-69.
- Kakuo S**, Asaoka K, Ide T. Human is a unique species among primates in terms of telomere length. *Biochem Biophys Res Commun* **1999** Sep 24;263(2):308-14.
- Kang SS**, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* **1999** May 7;274(19):13085-90.
- Karlseder J** Telomere repeat binding factors: keeping the ends in check *Cancer Letters* **2003**, *194*: 189-197.
- Kasahara K**, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, Matsuda T, Saijo N. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res.* **1991** Jun 15;51(12):3237-42.
- Kasparkova J**, Novakova O, Farrell N and Brabec V. DNA binding by antitumor trans-[PtCl₂(NH₃)(thiazole)]. Protein recognition and nucleotide excision repair of monofunctional adducts. *Biochemistry* **2003**, *42*, 792-800.
- Katano K**, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, Kuo YM, Rochdi M, Howell SB. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res.* **2002** Nov 15;62(22):6559-65.
- Kelland LR**, Abel G, McKeage MJ, Jones M, Goddard PM, Valenti M, Murrer BA, Harrap KR. Preclinical antitumor evaluation of bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine platinum(IV): an orally active platinum drug. *Cancer Res.* **1993** Jun 1;53(11):2581-6.
- Kim NW**, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW..Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **1994** Dec 23;266(5193):2011-5.
- Kondo S**, Kondo Y, Li G, Silverman RH, Cowell JK. Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA. *Oncogene* **1998** Jun 25;16(25):3323-30 (a).
- Kondo S**, Tanaka Y, Kondo Y, Hitomi M, Barnett GH, Ishizaka Y, Liu J, Haqqi..Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation. *FASEB J* **1998** Jul;12(10):801-11 (b).
- Kondo Y**, Kondo S, Tanaka Y, Haqqi T, Barna BP, Cowell JK.. Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* **1998** Apr 30;16(17):2243-8.
- Köpf-Maier, P.**; Klapötke, T. Tumor Inhibition by Ferricenium Complexes. *Arzneim.-Forsch.* **1989**, *39*(I), 369-371.
- Köpf-Maier P.**; Köpf, H. Non-platinum-group Metal Antitumor Agents: History, Current status, and Perspectives. *Chem.Rev.* **1987**, *87*, 1137-1152.
- Köpf-Maier, P.** Tumor Inhibition by Ferricenium Complexes: Systemic Effect in Vivo and Cell Growth Inhibition in Vitro. *Z.Naturforsch.,C:Biosci.* **1985**, *40*,843-846.
- Köpf-Maier P.**; Köpf, H.; Neuse, E. W. Ferricenium Complexes: a New Type of Water-soluble Antitumor Agent. *Cancer Res. Clin.Oncol.* **1984**, *108*, 336-340.
- Ku WC**, Cheng AJ, Wang TC. Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* **1997** Dec 29;241(3):730-6.

-
- Kyo S**, Inoue M. How to inhibit telomerase activity for cancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. **2002 Sep**;2(5):613-26.
- Kyo S**, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy? *Oncogene*. **2002 Jan 21**;21(4):688-97.
- Kunifuji Y**, Gotoh S, Abe T, Miura M, Karasaki Y. Down-regulation of telomerase activity by anticancer drugs in human ovarian cancer cells. *Anticancer Drugs*. **2002 Jul**;13(6):595-8.
- Ivanov AI**, Christodoulou J, Parkinson JA, Barnham KJ, Tucker A, Woodrow J, Sadler PJ. Cisplatin binding sites on human albumin. *J Biol Chem*. **1998 Jun 12**;273(24):14721-30.
- Legassie JD**, Jarstfer MB. Telomerase as a DNA-dependent DNA polymerase. *Biochemistry*. **2005 Nov 1**;44(43):14191-201.
- Lejnine S**, Makarov VL, Langmore JP. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1995 Mar 14**;92(6):2393-7.
- Leng M**, Locker D, Giraud-Panis MJ, Schwartz A, Intini FP, Natile G, Pisano C, Boccarelli A, Giordano D, Coluccia M. Replacement of a NH₃ by an iminoether in transplatin makes an antitumor drug from an inactive compound. *Mol. Pharmacol*. **2000**, 58, 1525-1535
- Levine AJ**. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **1997 Feb 7**;88(3):323-31.
- Li H**, Zhao LL, Funder JW, Liu JP. Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *Biol Chem*. **1997 Jul 4**;272(27):16729-32.
- Lingner J**, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **1997 Apr 25**;276(5312):561-7.
- Liu JP**. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* **1999 Dec**;13(15):2091-104.
- Loh SY**, Mistry P, Kelland LR, Abel G, Harrap KR. Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum(II) and (IV) ammine/amine complexes. *Br J Cancer*. **1992 Dec**;66(6):1109-15.
- Lue NF** A physical and functional constituent of telomerase anchor site. *J Biol Chem*. **2005 Jul 15**;280(28):26586-91. Epub 2005 May 18.
- M. Joynal Abedin et al.**, *Coordination Chemistry Reviews* **1999**; 190-192:975-1002.
- Marcand S**, Gasser SM, Gilson E. Chromatin: a sticky silence. *Curr Biol*. **1996 Oct 1**;6(10):1222-5.
- Masutimi K**, Hahn WC. Telomerase and tumorigenesis *Cancer Lett*. **2003 May 15**;194(2):163-72.
- McEllingott**, Wellinger RJ The terminal DNA structure of mammalian chromosomes *EMBO J* **1997**, 16:3705-3714.
- Meeker AK**, Coffey D. Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. A review. *Biochemistry* **1997 Nov**;62(11):1323-31.
- Melana SM**, Holland JF, Pogo BG. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Clin Cancer Res* **1998 Mar**;4(3):693-6.

-
- Mergny JL**, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res.* **2002 Feb 15**;30(4):839-65.
- Minotti G.**; Aust, S. D. The Requirements for The Iron(III) in The Initiation of The Lipid Peroxidation by Iron(II) and Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 1098-1104.
- Minotti G.**; Aust, S. D. Redox Cycling of Iron and Lipid Peroxidation. *Lipids* **1992**, 27, 219-226.
- Mishima M**, Samimi G, Kondo A, Lin X, Howell SB The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance *Eur J Cancer.* **2002 Jul**;38(10):1405-12.
- Misiti S**, Nanni S, Fontemaggi G, Cong YS, Wen J, Hirte HW, Piaggio G, Sacchi A, Pontecorvi A, Bacchetti S, Farsetti A. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol.* **2000 Jun**;20(11):3764-71.
- Mistry P**, Kelland LR, Abel G, Sidhar S, Harrap KR. The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines. *Br J Cancer.* **1991 Aug**;64(2):215-20.
- Mosmann T**. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* **1983**, Dec 16;65 (1-2):55-63.
- Motohashi N.**; Meyer, R.; Gollapudi, S. R.; Bhattiprolu, K. R. Synthesis and Activity of Potential Antitumor Ferrocenes. *J. Organomet. Chem.* **1990**, 398, 205- 217.
- Moyzis RK**, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999 Sep**;85(18):6622-6.
- Muntoni A**, Reddel RR. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet.* **2005 Oct 15**;14 Spec No. 2:R191-6.
- Nagatani G**, Nomoto M, Takano H, Ise T, Kato K, Imamura T, Izumi H, Makishima K, Kohno K. Transcriptional activation of the human HMGI gene in cisplatin-resistant human cancer cells. *Cancer Res.* **2001 Feb 15**;61(4):1592-7.
- Naka K**, Yokozaki H, Yasui W, Tahara H, Tahara E, Tahara E. Effect of antisense human telomerase RNA transfection on the growth of human gastric cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **1999 Feb 24**;255(3):753-8.
- Natile G**, Coluccia M, Current Status of trans-platinum compounds in cancer chemotherapy, *Coord. Chem. Rev.*, **2001**; 216-217; 383-410.
- Neuse E. W.**; Kanzawa, F. Evaluation of The Activity of Some Water-soluble Ferrocene and Ferricenium Compounds. Against Carcinoma of the Lung by The Human Tumor Clonogenic Assay. *Appl. Organomet. Chem.* **1990**, 4, 19-26.
- Nicolini, L. Sindellari** (eds), *Lectures in Bioinorganic Chemistry*, Raven Press, New York.
- Norton JC**, Piatyszek MA, Wright WE, Shay JW, Corey DR. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nat Biotechnol* **1996 May**;14(5):615-9.
- Nugent CI**, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.* **1998 Apr 15**;12(8):1073-85.
- Osa T**, Hino H, Fujieda S, Shimizu F, Arakawa M. Synthesis and antitumor activity of cis-platinum complexes of aromatic amines. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **1986 May**;34(5):1881-7.
- Osella D.**; Ferrali, M.; Zanello, P.; Laschi, F.; Fontani, M.; Nervi, C.; Cavigliolo, G. On The Mechanism of the Antitumor Activity of Ferrocenium Derivatives. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, 306, 42-48.

-
- Oulton R**, Harrington L. Telomeres, telomerase, and cancer: life on the edge of genomic stability. *Curr Opin Oncol*. **2000** Jan;12(1):74-81.
- Pascoe J M**, Roberts JJ. Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Biochem Pharmacol*. **1974** May 1;23(9):1359-65.
- Pendino F**, Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, Lanotte M, Aradi J, Segal-Bendirdjian E. Telomeres and telomerase: Pharmacological targets for new anticancer strategies? *Curr Cancer Drug Targets*. **2006** Mar;6(2):147-80.
- Perego P**, Ceserini C, Gatti L, Carenini N, Romanelli S, Supino R, Colangelo D, Viano I, Leone R, Spinelli S, Pezzoni G, Manzotti C, Farrel N, Zunino F. A novel trinuclear complex overcomes cisplatin resistance in an osteosarcoma cell system. *Mol. Pharm.*, **1999**, 55, 528-534.
- Pérez JM**, Kelland LR, Montero EI, Boxall FE, Fuertes MA, Alonso C, Navarro-Ranninger C. Antitumor and cellular Pharmacological properties of a novel platinum (IV) complex: trans-[PtCl₂(OH)₂(Dimethylamine) (Isopropylamine)] . *Mol. Pharmacol*. **2003**; 63:933-944.
- Pérez JM**, Montero EI, Quiroga AG, Fuertes MA, Alonso C, Navarro-Ranninger C. Cellular uptake, DNA binding and apoptosis induction of cytotoxic trans-[PtCl₂(N,N-dimethylamine) (Isopropylamine)] in A2780cisR ovarian tumor cells. *Metal Based Drugs* **2001**, 8: 29-37.
- Pérez JM**, Fuertes MA, Alonso C, and Navarro-Ranninger C. Current status of the development of trans-platinum antitumor drugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. **2000**, 35:109-120.
- Pérez RP** . Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* **1998**, 34:1535-1544P.
- Platts JA**, Hibbs DE, Hambley TW, Hall MD. Calculation of the hydrophobicity of platinum drugs. *J Med Chem*. **2001** Feb 1;44(3):472-4.
- Pinto AL**, Lippard SJ. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta*. **1985**;780(3):167-80.
- Poklar N**, Pilch DS, Lippard SJ, Redding EA, Dunham SU, Breslauer KJ.. Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability, and energetics of a 20-mer DNA duplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996** Jul 23;93(15):7606-11.
- Prins R.**; Korswagen, A. R.; Kortbeek, A. G. T. G. Decomposition of the Ferricenium Cation by Nucleophilic Reagents. *J. Organomet. Chem*. **1972**, 39, 335-344.
- Raymond E**, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther*. **2002** Jan;1(3):227-35.
- Reed E**, Dabholkar M and Chabner BA. Platinum analogues. In: *Cancer chemotherapy and biotherapy*, 2nd edition. Chabner BA and Longo DL (Eds), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, **1996**, 357.
- Reile H**, Bernhardt G, Koch M, Schonenberger H, Hollstein M, Lux F. Chemosensitivity of human MCF-7 breast cancer cells to diastereoisomeric diaqua(1,2-diphenylethylenediamine) platinum(II) sulfates and specific platinum accumulation. *Cancer Chemother Pharmacol*. **1992**;30(2):113-22.
- Rhyu MS**. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* **1995** Jun 21;87(12):884-94.
- Rosenberg E**, Abedin MJ, Rokhsana D, Osella D, Milone L, Nervi C, Fiedler J. *Inorg. Chim. Acta* **2000**; 300:769-777.
- Rosenberg B**, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH. *Nature (London)* **1969**; 222,385.

-
- Salazar M**, Thompson BD, Kerwin SM, Hurley LH. Thermally induced DNA:RNA hybrid to G-quadruplex transitions: possible implications for telomere synthesis by telomerase. *Biochemistry* **1996** Dec 17;35(50):16110-5.
- Saretzki G**. Telomerase inhibition as cancer therapy. *Cancer Lett.* **2003** May 15;194(2):209-19.
- Scanlon KJ**, Kashani-Sabet M, Miyachi H. Differential gene expression in human cancer cells resistant to cisplatin. *Cancer Invest.* **1989**;7(6):581-7.
- Shay JW**, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer *Eur J Cancer* **1997**, 33: 787-791.
- Sherman S E** and S J Lippard. Structural aspects of Platinum anticancer drug interactions with DNA. *Chem. Rev.*,87 (1987) 1153-1181.
- Shon R. B.**; Hendrickson, D. N.; Gray, H. B. Electronic Structure of Metallocenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 3603-3612.
- Siddik ZH**, al-Baker S, Burditt TL, Khokhar AR. J Differential antitumor activity and toxicity of isomeric 1,2-diaminocyclohexane platinum (II) complexes. *Cancer Res Clin Oncol.* **1993**;120(1-2):12-6.
- Smogorzewska A.** et al., *The EMBO Journal*, Vol.21 No. 16 pp.4338-4348, **2002**.
- Soder AI**, Hoare SF, Muir S, Going JJ, Parkinson EK, Keith WN. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene.* **1997** Mar 6;14(9):1013-21.
- Strahl C**, Blackburn EH. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol* **1996** Jan;16(1):53-65.
- Strahl C**, Blackburn EH. The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in Tetrahymena. *Nucleic Acids Res* **1994** Mar 25;22(6):893-900.
- Sugihara S**, Mihara K, Marunouchi T, Inoue H, Namba M. Telomere elongation observed in immortalized human fibroblasts by treatment with ⁶⁰Co gamma rays or 4-nitroquinoline 1-oxide. *Hum Genet.* **1996** Jan;97(1):1-6.
- Sun, D**, Thompson B, Lathers B.E, Salazar M. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex interactive compound. *J. Med. Chem* **1997**, 40, 2113-2116.
- Sundquist e** Lippard. The coordination chemistry of platinum anticancer drugs and related compounds with DNA. *Coordination Chemistry review* (1990) 293-322.
- Tabbi G.**; Fry, S. C.; Bonomo, R. P. E.S.R. Study of Non-enzymic Scission of Xyloglucan by an Ascorbate-H₂O₂-copper System: The Involvement of The Hydroxyl Radical and The Degradation of Ascorbate. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, 98, 1153-1169.
- Tommerup H**, Dousmanis A, de Lange T. Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol* **1994** Sep;14(9):5777-85.
- Tutsch KD**, Arzoomanian RZ, Alberti D, Tombes MB, Feierabend C, Robins HI, Spriggs DR, Wilding G. Phase I clinical and pharmacokinetic study of an one-hour infusion of ormaplatin (NSC 363812). *Invest New Drugs.* **1999**;17(1):63-72.
- Vásquez-vivar J.**; Hogg, N.; Pritchard, K. A.; Martasek, K. P.; Kalyanaraman, B. Superoxide Anion Formation from Luigenin: an Electron Spin Resonance Spin-trapping Study. *FEBS Lett.* **1997**, 403, 127-130.
- Vaziri H**, Benchimol S From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* **1996** Jan-Apr;31(1-2):295-301.

Villa R, Porta CD, Folini M, Daidone MG, Zaffaroni N. Possible regulation of telomerase activity by transcription and alternative splicing of telomerase reverse transcriptase in human melanoma. *J Invest Dermatol.* **2001 Jun**;116(6):867-73.

von Zglinicki T. Telomeres: influencing the rate of aging. *Ann N Y Acad Sci* **1998 Nov 20**;854:318-27.

von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* **1995 Sep**;220(1):186-93.

Vrana O, Brabec V. L-methionine inhibits reaction of DNA with anticancer cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry.* **2002 Sep 10**;41(36):10994-9.

Wang X, Wong SC, Pan J, Tsao SW, Fung KH, Kwong DL, Sham JS, Nicholls JM. Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res.* **1998 Nov 15**;58(22):5019-22.

Wellinger RJ, Sen D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* **1997 Apr**;33(5):735-49.

Wenzel M.; Wu, Y.; Liss, E.; Neuse, E. W. Stability of Ferricinium and its Cytostatic Effect. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **1988**, 43c, 963-966.

Wheelhouse R, Sun D, Han, H, Han F X, Hurley, L H. Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: the interaction of tetra -(N). *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3261-3262.

Wong E and Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* **1999**; 99:2451-2466.

Wong JM, Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet.* **2003 Sep 20**;362(9388):983-8.

Woynarowski JM, Chapman WG, Napier C, Herzig MC, Juniewicz P. Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Mol Pharmacol.* **1998 Nov**;54(5):770-7.

Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* **1997 Nov 1**;11(21):2801-9.

Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res.* **1995 Sep 25**;23(18):3794-5.

Yegorov YE, Chernov DN, Akimov SS, Bolsheva NL, Krayevsky AA, Zelenin AV. Reverse transcriptase inhibitors suppress telomerase function and induce senescence-like processes in cultured mouse fibroblasts. *FEBS Lett* **1996 Jul 1**;389(2):115-8.

Yokoyama Y, Takahashi Y, Shinohara A, Lian Z, Wan X, Niwa K, Tamaya T. Attenuation of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the template region of telomerase RNA in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res* **1998 Dec 1**;58(23):5406-10.

Zahler AM, Williamson JR, Cech TR, Prescott DM. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **1991 Apr 25**;350(6320):718-20.

Zakian VA. Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **1995 Dec 8**;270(5242):1601-7.

Zakian VA. Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* **1989**;23:579-604.

Zakovska A, Novakova O, Balcarova Z, Bierbach U, Farrell N, Brabec V. DNA interactions of antitumor trans-[PtCl₂(NH₃)(quinoline)]. *Eur J Biochem.* **1998 Jun 15**;254(3):547-57.

Zdraveski ZZ, Mello JA, Farinelli CK, Essigmann JM, Marinus MG MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA. *J Biol Chem.* **2002** Jan 11;277(2):1255-60. **Epub 2001** Nov 08.

Zhang A, Zheng C, Lindvall C, Hou M, Ekedahl J, Lewensohn R, Yan Z, Yang X, Henriksson M, Blennow E, Nordenskjold M, Zetterberg A, Bjorkholm M, Gruber A, Xu D. Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res.* **2000** Nov 15;60(22):6230-5.

Zipp, Arden e Sybil G,Zipp.. Pt (NH₃)₂Cl₂ and cancer .*Journal of Chemical Education* vol 54, n°12 Dec **1977**.

Zunino F, Perego P, Pilotti S, Pratesi G, Supino R, Arcamone F. Role of apoptotic response in cellular resistance to cytotoxic agents. *Pharmacol Ther.* **1997** Oct-Dec;76(1-3):177-85.

Water Stability and Cytotoxic Activity Relationship of a Series of Ferrocenium Derivatives. ESR Insights on the Radical Production during the Degradation Process†

Giovanni Tabbi,[‡] Claudio Cassino,[§] Giorgio Cavigliolo,[§] Donato Colangelo,[¶] Annalisa Chiglia,[¶] Ilario Viano,[¶] and Domenico Osella^{*§}

Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, CNR, Sezione di Catania, viale A. Doria 6, I-95125, Catania, Italy, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", corso Borsalino 54, I-15100, Alessandria, Italy, and Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", via Solaroli 17, I-28100, Novara, Italy

Received July 30, 2002

The cytotoxicity of some ferrocenium salts and the lack of activity of the corresponding ferrocenes has been already demonstrated. The cytotoxic activity in different conditions of decamethylferrocenium tetrafluoroborate (DEMFC⁺) in comparison with four other ferrocenium derivatives on MCF-7 cell line is reported. The relative stability in aqueous solutions with different buffering agents is investigated by means of UV–vis spectroscopy and correlated to the cytotoxic properties of the compounds. DEMFC⁺, the most stable compound, shows the highest efficiency in inhibiting cell growth (IC₅₀ 35 μM, for 48 h treatment). Relaxation time measurements point out the involvement of water molecules in the degradation process. ESR results confirm the ability of ferrocenium cations to produce oxygen radical species as a consequence of their degradation in water. Oxygen-dependent formation of both hydroxyl and superoxide radicals is established by the spin-trapping technique. A direct evidence of the DEMFC⁺ radical production into the viable cells is obtained by means of fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis that reveals a dose-dependent growth of 8-oxoguanine, the initial product of the guanine oxidation. This DNA oxidative stress justifies the cytotoxic effect of DEMFC⁺. Furthermore, the cytotoxic cooperative effect of bleomycin, an iron-dependent antitumor drug, and DEMFC⁺ has been tested. We have demonstrated the synergic effect between the two drugs, that is explained by the complementary oxidative damage inflicted to DNA as well as by the increasing of bleomycin activation by the iron(II/III) species available in the cell compartment from ferrocenium degradation.

Introduction

The lack of activity of bis-cyclopentadienyl iron(II) (ferrocenes) is well established in the literature.^{1–3} Increasing its water solubility either by derivatization with polar substituents or by inclusion in cyclodextrins did not lead to better results.^{4,5} On the other hand, there is a general agreement on *in vivo* antitumor activity of ferrocenium salts, indicating that only the compounds with iron in +3 oxidation state are able to trigger the toxic events.^{2,3,6} *In vitro* studies confirmed the cytotoxicity of these compounds, pointing out different activities, depending on the nature of the cell lines employed.^{4–6}

All previous studies invoked the instability of ferrocenium compounds in aqueous solutions, but few investigations dealt with this particular problem. Only the stability of 1,1'-dimethylferrocenium tetrafluoroborate,

compared to that of ferrocenium tetrafluoroborate, was reported.⁹ We evaluated the stability of five different ferrocenium compounds (see Scheme 1) under physiological conditions by means of spectroscopic and relaxometric techniques as well as their cytotoxic activity by *in vitro* assay using MCF-7 cell line.

In a previous work⁵ we stated that CAFc⁺ in aqueous solutions was able to produce free radicals, likely responsible for its antitumor activity. Moreover an indirect evidence of DNA cleavage by ferrocenium cations, suggesting the participation of [•]OH was obtained by the thiobarbituric acid method.¹⁰ To get further information on the radical species involved in the cytotoxic mechanism, we recorded ESR spectra of solutions containing either DEMFC⁺ or Fe³⁺, under physiological conditions, using the spin-trapping technique. Furthermore, we quantified *in vitro* the amount of 8-oxoguanine in viable cells, a sensitive marker for DNA damage caused by reactive oxygen species (ROS).¹¹

The clinically used antitumor drug bleomycin is known to be activated in the presence of iron. In particular, the activated bleomycin adduct (BLM[•]), responsible for the final oxidative DNA damage, carries a superoxide fragment coordinated to the iron(III) complexed by bleomycin. BLM[•] can be produced starting from either Fe(II) or Fe(III), through different

† This article includes material presented at the 1st International Symposium on Bio-organometallic Chemistry, Paris, France, July 18–20, 2002.

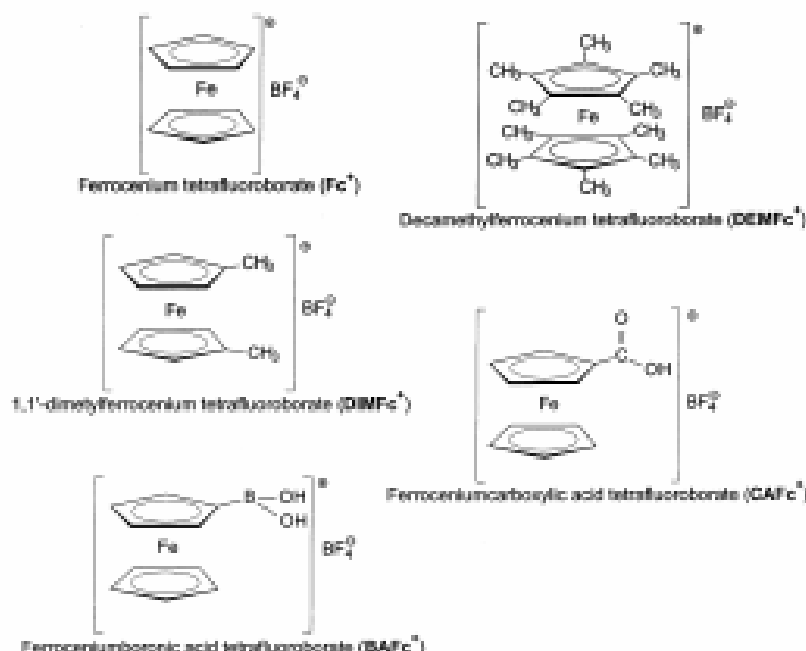
* Corresponding author: Tel.: +39-0131-287420; Fax: (internat.) +39-0131-287416; E-mail: domenicosella@mfra.unipn.it

† IBB, CNR.

‡ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università del Piemonte Orientale.

§ Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale.

Scheme 1



pathways involving different oxygen species.¹² The degradation process of ferrocenium salts in different solvents has been fully characterized by Prins et al.,¹³ who have demonstrated that both Fe(II) and Fe(III) ions are formed during the degradation. Consequently, we have evaluated the potential synergy as cytotoxic of DEMFC^+ and bleomycin on MCF-7 cell line.

Results

Five different ferrocenium compounds were synthesized by chemical oxidation (see Experimental Section) of the corresponding ferrocene derivatives. The stability of these compounds in aqueous buffer solutions was evaluated by means of two different techniques: UV-vis spectroscopy and proton relaxation.

UV-vis Spectra. The UV-vis spectra were recorded as a function of the time (from 0 to 3000 min) using four different aqueous media: phosphate-citrate buffer at pH 3, freshly distilled water (pH \approx 6.0–6.5), phosphate buffer at pH 7.4, and HEPES buffer at pH 7.4. This study was aimed to evaluate roughly the effect of the pH value and of the nature of the buffering agent on the degradation of the compounds. The decomposition of the complexes was followed by the decrease of the LMCT absorbance band ($1e_{1g} \rightarrow 2e_{1g}$),¹⁴ which falls in the 250–300 nm range.

Fc^+ (Figure 1A) was unstable in all the media utilized; both the pH value, and the type of the buffering agent did not seem to stabilize this compound in solution. DEMFC^+ (Figure 1B) displayed the greatest stability among the tested compounds under all the conditions used. DIMFC^+ (Figure 1C) showed a stability trend between those of Fc^+ and DEMFC^+ up to 500 min after its dissolution. At longer times it exhibited a deeper decrease of the absorbance at 257 nm in acidic media (phosphate-citrate buffer and distilled water). The two acid derivatives [CAFC^+ (Figure 1D), BAFC^+ (Figure 1E)] showed a stability which is highly dependent on the pH

value: they were generally stable under quite acidic conditions only.

Relaxation Measurements. We measured the paramagnetic contribution to the longitudinal relaxation time ($T_{1\rho}$) and the corresponding relaxation rate ($R_{1\rho}$) of water protons in the presence of the ferrocenium salts. Measurements were carried out in distilled water to rule out any buffer influence. Ferrocenium cations are able to increase the relaxation rate of the solvent molecules, being paramagnetic with an unpaired electron. This technique provides two kinds of information: (a) the ability of the water molecules to interact with the paramagnetic iron(III); (b) a direct evaluation of the stability of the compounds. According to Prins et al.,¹³ the ferrocenium degradation process in water leads mainly to the formation of iron(III) aquo ions. These d^5 high-spin ions cause a tremendous increase of the relaxation rate of water molecules. As a consequence, the extent of the degradation process can be followed by the increase of $R_{1\rho}$ as a function of time.

It is well-known that Fe(III)EDTA (EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid) has a water molecule in the first coordination sphere, whereas, in Fe(III)DTPA (DTPA = diethylenetriaminepentaacetic acid), the water molecules are located in the outer coordination sphere only.¹⁵ To know whether the water molecules can coordinate to the iron center in the ferrocenium salts, their $R_{1\rho}$ values were compared to those of the two reference complexes Fe(III)EDTA and Fe(III)DTPA (see Table 1)

The $R_{1\rho}$ values of all the ferrocenium cations were lower than that of the two reference complexes, thus indicating outer sphere interactions only.

Ferrocenium compounds carrying polar groups showed higher $R_{1\rho}$ values compared with Fc^+ ; on the contrary, the methyl-substituted compounds exhibited lower relaxation rates. The hydrophilicity (polar substituent) or hydrophobicity (CH_3 substituent) affected the local

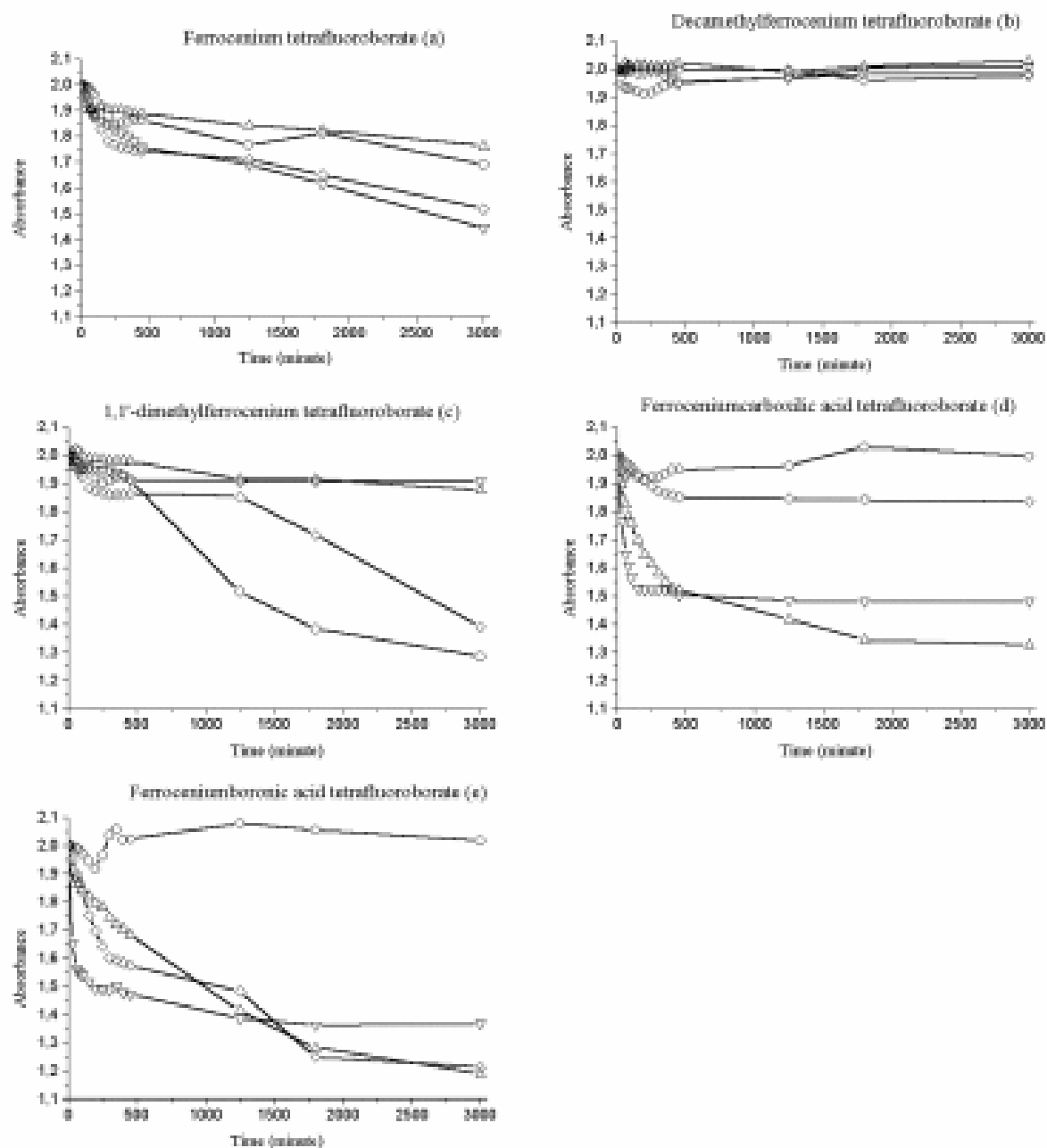


Figure 1. Stability of ferrocenium derivatives, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, in different buffers: (○) phosphate-dtrate buffer, pH 3, i.e., dicitric acid 80 mM and disodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4) 40 mM, (◐) Distilled water, pH 6.0–6.5, (◑) HEPES buffer 25 mM, pH 7.4, (◒) Phosphate buffer 65 mM, pH 7.4. (a) Fc^+ , time for decreasing of the maximum at $\lambda = 251\text{ nm}$, (b) DEMFc^+ , time for decreasing of the maximum at $\lambda = 278\text{ nm}$, (c) DIMFc^+ , time for decreasing of the maximum at $\lambda = 257\text{ nm}$, (d) CAFc^+ , time for decreasing of the maximum at $\lambda = 257\text{ nm}$, (e) BAFc^+ , time for decreasing of the maximum at $\lambda = 252\text{ nm}$.

environment of iron and the consequent interactions with the surrounding water molecules.

All the relaxation rates increased after 48 h except for that of DEMFc^+ , thus confirming its stability in water.

Cytotoxicity Tests. The cytotoxicity of the five ferrocenium derivatives was evaluated on MCF-7 cell line. A first screening was accomplished through 48 h continuous treatments of cells with different concentrations of the compounds, ranging from 5 to 500 μM . The outcomes of this first screening revealed a general

cytotoxic effect of the compounds, that leads to the total cell death for concentration values near 500 μM .

The DEMFc^+ showed the highest cytotoxic effect (IC_{50} of 37 μM), the other compounds having IC_{50} values around 300 μM (Table 2). DEMFc^+ revealed a good dose-activity relationship in the range between 5 and 100 μM . All of the other ferrocenium compounds showed negligible cytotoxic effects for concentration values up to 100 μM , and a maximum activity at 500 μM .

Further cytotoxicity tests were performed to focus on the time-exposure-activity relationship. In particular,

Table 1. Relaxation Measurements for Ferrocenium Compounds and for NaFe(II)EDTA and $\text{Na}_2\text{Fe(II)DTPA}$ (temperature = 25 °C, frequency = 11.8 MHz)

compound	concn (M)	$T_{1\rho}$ (s)	$R_{1\rho}$ ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	$T_{1\rho}$ (s)	$R_{1\rho}$ ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
Fe^+	1.0×10^{-2}	0.19	520	0.13	763
DEMFe^+	1.0×10^{-2}	1.25	80	1.23	81
DIMFe^+	1.0×10^{-2}	0.29	347	0.19	658
CAFc^+	1.0×10^{-1}	1.43	700	1.20	833
BAFc^+	5.0×10^{-1}	0.27	741	0.23	870
Fe(II)EDTA	2.0×10^{-2}	0.017	2996	—	—
Fe(II)DTPA	1.3×10^{-2}	0.072	1043	—	—

Table 2. In Vitro Cytotoxicity for MCF-7 of the Ferrocenium Derivatives^a

compound	concentration (μM)	cell survival ^{b,c}	IC_{50} (μM) ^d
Fe^+	5	100% (25)	330 (26)
	10	98% (27)	
	50	100% (15)	
	100	99% (12)	
	500	13% (10)	
DIMFe^+	5	99% (16)	320 (19)
	10	100% (19)	
	50	93% (13)	
	100	90% (16)	
	500	17% (20)	
DEMFe^+	5	100% (18)	37 (15)
	10	88% (10)	
	50	32% (13)	
	100	10% (14)	
	500	1.1% (11)	
CAFc^+	5	100% (15)	340 (16)
	10	98% (19)	
	50	97% (13)	
	100	97% (10)	
	500	17% (13)	
BAFc^+	5	102% (20)	310 (17)
	10	101% (17)	
	50	101% (14)	
	100	98% (10)	
	500	8% (7)	

^a Cells in the logarithmic phase of growth were treated for 48 h with concentrations ranging from 5 to 500 μM of the proper ferrocenium salt. After 48 h of drug exposure cells were counted by MTT method. ^b Mean values of three replications. The limits of confidence ($P = 0.1$, $t = 2.92$) are reported in brackets. ^c Percentage of viable cells relative to the untreated control. ^d Concentration required to reduce to 50% the number of the cells with respect to the untreated control.

the behavior of DEMFe^+ , the most active and stable complex, was compared with that of Fe^+ . Five different concentrations of the two selected compounds were tested for increasing exposure times from 2 to 48 h. Cells were counted 5 days since the beginning of the exposure.

Data obtained from five day culture experiments confirmed the higher cytotoxic activity of DEMFe^+ in comparison with Fe^+ , for all the drug exposure times tested (Figure 2 and Table 3). The decrease of the IC_{50} values for increasing exposure time indicated a good time-dependence of DEMFe^+ activity on this cell line. The almost constant IC_{50} values of Fe^+ suggests that the cytotoxic effect is limited to the first 12 h of treatment by the instability of Fe^+ itself.

Oxidative Damages on DNA Induced by DEMFe^+ . The results obtained from the FACS measurement of 8-oxoguanine (8-oxoG), a direct marker of ROS attack on DNA in viable cells, clearly demonstrated that DEMFe^+ was able to increase the 8-oxoG level and to induce oxidative stress in the cells in a dose-dependent

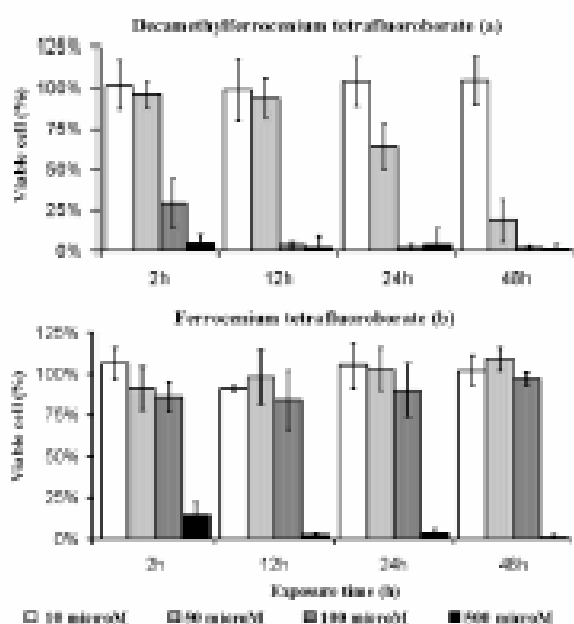


Figure 2. MCF-7 cell survival after 5 days of culture at different drug exposures (2, 12, 24, 48 h). The percentage of viable cells is referred to the control (not treated cells). Means from three independent experiments and limits of confidence ($P = 0.1$, $t = 2.92$) are reported. (a) DEMFe^+ : 10, 50, 100, 500 μM . (b) Fe^+ : 10, 50, 100, 500 μM .

Table 3. IC_{50} Values of DEMFe^+ and Fe^+ for MCF-7 Cytotoxicity Test^a

compound	exposure time (h)	IC_{50} (μM) ^{b,c}
DEMFe^+	2	86 (11)
	12	74 (3)
	24	58 (13)
	48	35 (6)
Fe^+	2	308 (37)
	12	288 (34)
	24	256 (23)
	48	240 (10)

^a Cells in the logarithmic phase of growth were incubated with the compounds for 2, 12, 24, 48 h. After the treatment, cells were washed with fresh medium and counted 5 days since the beginning of exposure. ^b Mean values of three replications. The limits of confidence ($P = 0.1$, $t = 2.92$) are reported in brackets. ^c Concentration required to reduce to 50% the number of the cells with respect to the untreated control.

manner. This method provided a direct proof of the ROS activity in cells¹¹ thus supporting the findings obtained from the spin trapping experiments described below. Figure 3 shows a representative experiment of 8-oxoG presence in the cells.

Fe^+ in similar experimental conditions clearly caused a minor increase of 8-oxoG level with regard to DEMFe^+ (data not shown).

Decamethylferrocenium and Bleomycin. The cytotoxic activity of bleomycin on MCF-7 cell line was evaluated from 24 h treatment experiments. Cell survival was measured 5 days from the beginning of the treatment. It is noteworthy that the IC_{50} (53 μM)¹⁸ was very close to the corresponding value for DEMFe^+ (58 μM , see Table 3), in the same experimental conditions.

To evaluate the potential synergy of the two compounds, MCF-7 cells were exposed to bleomycin for 24 h after a 24-h pretreatment with DEMFe^+ . In this experiment the DEMFe^+ acts both as a cytotoxic compound and as a cofactor, supplying iron cations to the

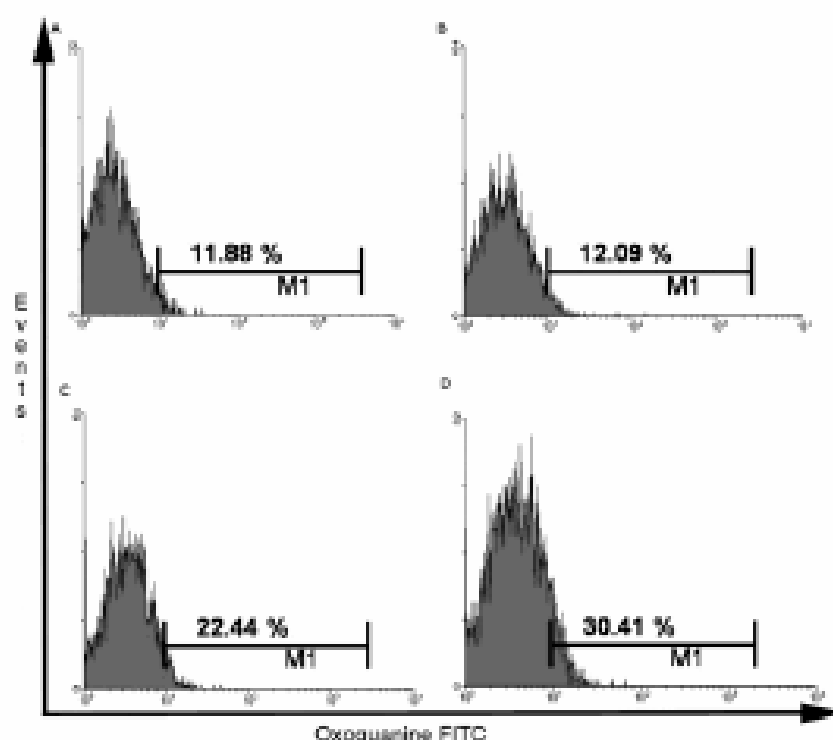


Figure 3. Flow cytometric analysis of the oxidative DNA damage induced by DEMFc⁺ visualized with a specific probe for 8-oxo-G. After 30 min of treatment, cells were incubated with fresh media and harvested after 2 h. Paraformaldehyde fixed cells were incubated with the FITC conjugate probe and fluorescence was measured with flow cytometry (FACS). The figure shows four univariate histograms of a representative experiment: cell number are expressed as number of events (*y* axis) versus 8-oxo-G fluorescence intensity of FITC-H-filter channel (*x* axis). Untreated cells are shown in panel A. Panels B, C, and D represent the 8-oxo-G moieties production (shift on *x* axis) due to the treatment with 10⁻⁶, 10⁻⁴ and 10⁻² M DEMFc⁺ respectively and evidence a dose-dependent formation of oxidative DNA damages.

Table 4. Drug Combination vs Single Drug Experiments^a

drug combination		DEMFc ⁺ (24 h treatment)		bleomycin	
concn (μM)	cell survival ^{b,c}	concn (μM)	cell survival ^{b,c}	concn (μM)	cell survival ^{b,c}
5 + 5	94% (15)	10	92% (15)	10	69% (7)
10 + 10	72% (13)	50	64% (14)	20	65% (8)
15 + 15	34% (12)	100	14% (2)	35	57% (3)
20 + 20	13% (10)	500	4% (10)	50	48% (5)
30 + 30	7% (10)			70	51% (7)
40 + 40	3% (9)				

^a Drug combination cytotoxicity was tested utilizing DEMFc⁺ and bleomycin in equimolar quantities. After 24 h of cell exposure to DEMFc⁺, medium was replaced by fresh one containing bleomycin. Cells were cultured for further 24 h, in the presence of bleomycin, afterward the medium was replaced. Cells were counted by MTT method 5 days since the beginning of drug exposure. ^b Percentage of viable cells relative to the untreated control. ^c Mean values of three replications. The limits of confidence ($P = 0.1$, $t = 2.02$) are reported in brackets.

iron-dependent activation of bleomycin.¹² Different experiments were performed using equal DEMFc⁺ and bleomycin concentrations, ranging from 5 to 40 μM. The value found for cell viability in the drug combination experiments, compared to those of the single components (see Table 4), roughly indicated a synergic effect. A more detailed analysis of the combined effect of multiple drugs has been proposed by Chou and Talalay.¹⁷ Unfortunately, their method could not be applied here, because the dose-effect curves of the two drugs had different degrees of sigmoidicity.

Spin Trapping Studies. The ESR spectra at room temperature of samples containing the DEPMPO spin-trap (50 mM) and DEMFc⁺ (0.67 mM) in HEPES buffer (25 mM) at pH 7.4 exhibited the signal pattern due to DEPMPO-OH adduct (*g* value 2.0059) ($a^N = 13.8$, $a^H =$

13.8, $a^P = 47.2$ G, Figure 4a)¹⁸ which progressively increased in intensity. The spectra were complicated by the presence of a second pattern attributable to a carbon-centered radical adduct ($a^N = 14.3$, $a^H = 21.3$, $a^P = 46.0$ G) which began to appear at the same time. The same trend was observed using DMEM as media (containing HEPES 25 mM, see Figure 4b).

A sample containing the DMPO (50 mM) spin-trap and a lower concentration of DEMFc⁺ (0.05 mM) in phosphate buffer at pH 7.4 promptly showed the formation of the DMPO-OH adduct ($a^N = 14.9$, $a^H = 14.9$ G), whose intensity increased slowly with the time (Figure 5a-e). The six-line pattern of the carbon-centered radical adduct ($a^N = 15.4$, $a^H = 23.0$ G) began to appear evidently after 0.5 h of reaction, and it can be assigned to a cyclopentadienyl radical adduct.¹⁹ A 0.05 mM

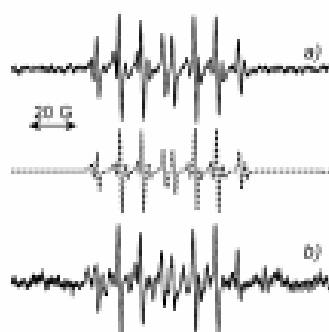


Figure 4. ESR spectra of buffered mixtures containing 50 mM DMPO and 0.67 mM DEMFc⁺ incubated for 60 min using different media: (a) HEPES 25 mM pH 7.4; (b) DMEM. Simulated spectrum (dashed lines) was obtained by using: $a^N = 13.8$ G, $a^H = 13.8$ G, $a^P = 47.2$ G (hydroxyl adduct, 62%) and $a^N = 14.3$ G, $a^H = 21.3$ G, $a^P = 46.0$ G (carbon centered radical adduct, 38%). Instrument settings: modulation frequency, 100 kHz; modulation amplitude, 0.7 G; receiver gain 8×10^4 ; time constant, 163 ns; sweep rate, 145 G/min; microwave frequency, 9.77 GHz; microwave power, 20 mW, 20 scans.

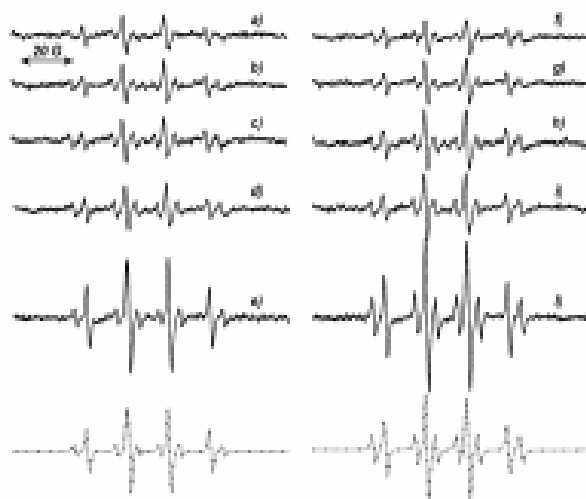


Figure 5. ESR spectra of phosphate-buffered mixtures (pH 7.4) containing 50 mM DMPO and either DEMFc⁺ 0.05 mM (a–e) or Fc⁺ 0.05 mM (f–l) incubated at different times: (a, f) 0 min; (b, g) 30 min; (c, h) 60 min; (d, i) 90 min; (e, j) 5 h. Simulated spectra (dashed lines) were obtained by using: $a^N = 14.9$ G, $a^H = 14.9$ G (hydroxyl adduct, 72% and 58%) and $a^N = 15.4$ G, $a^H = 23.0$ G (carbon-centered radical adduct, 28% and 42%, for DEMFc⁺ and Fc⁺ solutions, respectively). Instrument settings as in Figure 4.

solution of Fc⁺ displayed the same trend but with higher relative intensities (Figure 5f–l).

Cyclopentadienyl derived radical species were also detected in the absence of spin trap. In fact, ESR spectra at 77 K of samples containing either DEMFc⁺ or Fc⁺ 0.67 mM in phosphate buffer pH 7.4 (Figure 6) showed a single line with $\Delta H_{pp} = 2$ G in both cases, whose g values were 2.004 and 2.002, respectively.

Interestingly, all signal patterns disappeared when a reductant was present in the mixture. In fact, addition of ascorbate (1 mM) in the sample gave no trapped radicals even after 3 h, but the ascorbate doublet (1.8 G)²⁰ only.

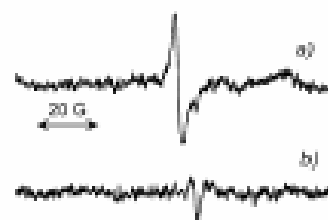


Figure 6. ESR spectra (77 K) of phosphate-buffered mixtures containing 50 mM DMPO and either DEMFc⁺ 0.67 mM (a) or Fc⁺ 0.67 mM (b) incubated for 30 min. Instrument settings: modulation frequency, 100 kHz; modulation amplitude, 0.7 G; receiver gain 8×10^4 ; time constant, 82 ns; sweep rate, 145 G/min; microwave frequency, 9.34 GHz; microwave power, 40 mW, 20 scans.

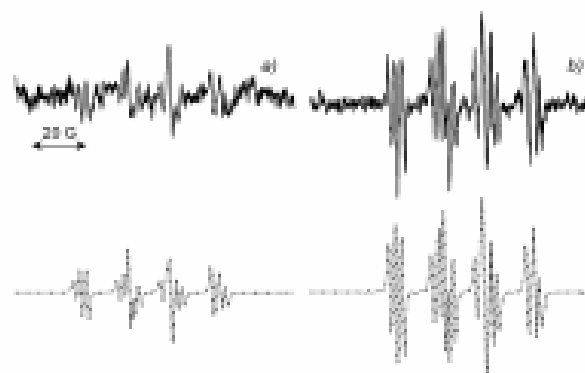


Figure 7. ESR spectra of phosphate-buffered mixtures containing 50 mM DMPO, sodium formate 67 mM and either DEMFc⁺ 0.05 mM (a) or Fc⁺ 0.05 mM (b) incubated for 30 min. Simulated spectra (dashed lines) were obtained by using: $a^N = 14.9$ G, $a^H = 14.9$ G (hydroxyl adduct, 29% and 27%), $a^N = 15.6$ G, $a^H = 18.7$ G (CO₂⁻ radical adduct, 51% and 42%) and $a^N = 15.4$ G, $a^H = 23.0$ G (carbon-centered radical adduct, 20% and 31%, for DEMFc⁺ and Fc⁺ solutions, respectively). Instrument settings as in Figure 4.

To determine if the detected hydroxyl radical adduct was formed exclusively by spin trapping of the hydroxyl radical rather than nucleophile addition of water to DMPO or decomposition of an hypothetical superoxide radical adduct, some ESR spectra were obtained on samples containing also sodium formate (67 mM). Both DEMFc⁺ and Fc⁺ showed the same trend supporting the evidence of a common reaction mechanism. In fact, three ESR patterns were found in both experimental series: the first pattern was due to the DMPO-CO₂ adduct ($a^N = 15.6$, $a^H = 18.7$ G),²¹ the second one to a carbon-centered radical adduct ($a^N = 15.5$, $a^H = 23.0$ G) and finally the hydroxyl radical adduct pattern (Figure 7).

As sodium formate is a well-known scavenger of [•]OH, the presence of DMPO-CO₂ pattern confirms the existence of "genuine" [•]OH radicals in solution.

To ascertain whether the formation of the hydroxyl radical adduct was O₂ dependent, samples were prepared and sealed under nitrogen. The corresponding spectra revealed the six-line pattern of the carbon-centered radical together with a very small signal due to DMPO-OH adduct (Figure 8a–c, f–h), thus supporting the hypothesis that dioxygen is involved in the formation of the hydroxyl radical, probably by a superoxide intermediate species. After slow diffusion of dioxygen into the same samples, the resulting ESR

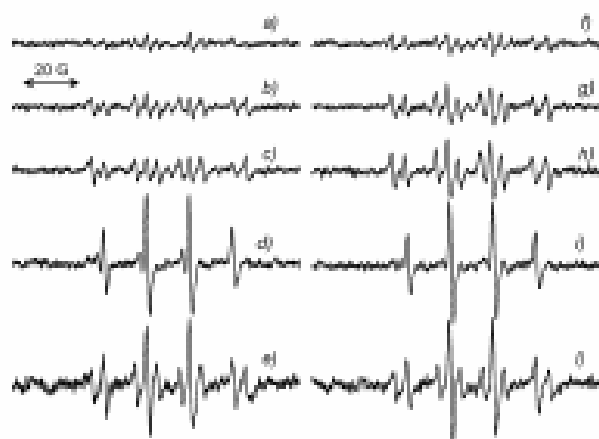


Figure 8. ESR spectra of phosphate-buffered mixtures containing 50 mM DMPO and either DEMFc⁺ 0.05 mM (a–c) or Fe⁺ 0.05 mM (f–h) incubated under nitrogen at different times: (a,f) 0 min; (b,g) 30 min; (c,h) 60 min. Spectra of samples opened after 5 h of incubation and kept in contact with air for 16 h: (d) DEMFc⁺, 21 h; (e) Fe⁺, 21 h. Spectra taken on fresh aerated samples after 90 min are given for comparison: (g) DEMFc⁺, 90 min; (h) Fe⁺, 90 min. Instrument settings as in Figure 4.

spectra (Figure 8d, 8i) showed the same DMPO-OH signal intensities as in fresh aerated samples (Figure 8g, 8j).

Evidence of the superoxide involvement was provided by the ESR spectra performed on a sample containing DEMFc⁺ (0.05 mM), formate (0.1 M), catalase (CAT, 21,400 U/mL), and superoxide dismutase (SOD, 8,300 U/mL). These spectra showed the absence of any signal even after 1 h of reaction.

The ability of DEMFc⁺ to oxidize cellular membrane lipids was tested by mixing DEMFc⁺ (final concentration 0.05 mM), oleic acid (final concentration 12 mM), and DMPO (50 mM). The resulting ESR spectra showed two carbon-centered radical adducts beside the presence of the hydroxyl radical adduct (Figure 9). The first carbon-centered adduct had $a^N = 15.5$, $a^H = 23.0$ G, whereas the second was characterized by $a^N = 16.1$, $a^H = 23.3$ G, which is compatible with a $^{\bullet}CR_2$ radical adduct coming from oxidation of a fatty acid.²² Fe⁺ produced similar, but more intense, signals (data not shown).

Discussion

The cytotoxicity tests confirmed the activity of the ferrocenium compounds. DEMFc⁺ was an order of magnitude more cytotoxic than the other ferrocenium salts investigated (i.e., IC₅₀ 37 μ M vs 310–340 μ M). Also the stability assays showed a peculiar behavior of this compound. Differently from the other salts, which revealed in the UV–vis studies a general instability in aqueous media, DEMFc⁺ was stable in all the conditions tested.

The water relaxation rates indicated only an outer sphere coordination of the solvent molecules for all the ferrocenium solutions tested. The time evolution of the relaxation rates confirmed the order of stability found in the UV–vis studies, DEMFc⁺ having the most stable R_{1p} value, almost constant over 48 h (see Table I). These data are in agreement with a degradation mechanism that involves directly the solvent molecules, as previ-

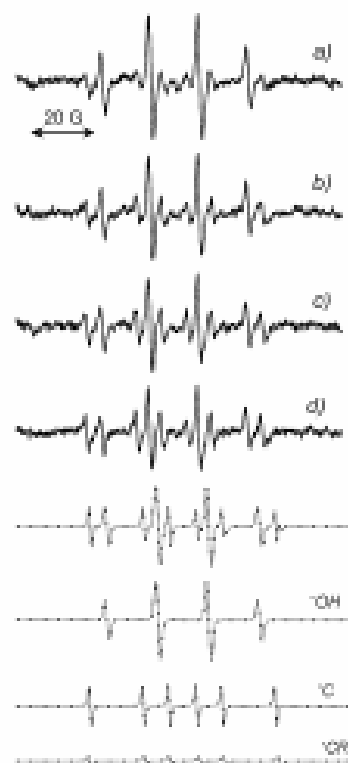


Figure 9. ESR spectra of phosphate-buffered mixtures containing 50 mM DMPO, oleic acid 20 mM and either DEMFc⁺ 0.05 mM incubated at different times: (a) 0 min; (b) 30 min; (c) 60 min; (d) 90 min. Simulated spectrum (dashed line) was obtained by using: $a^N = 14.9$ G, $a^H = 14.9$ G (hydroxyl adduct, 62%), $a^N = 16.1$ G, $a^H = 23.3$ G ($^{\bullet}CR_2$ radical adduct, 9%) and $a^N = 15.5$ G, $a^H = 23.0$ G (carbon centered radical adduct, 28%).

ously asserted by Prins et al.¹³ The initial degradation of ferrocenium derivatives in the presence of a nucleophilic solvent, (e.g. water), can account for the formation of Fe(II) species:



The ESR signal pattern due to hydroxyl radical adduct, obtained when a ferrocenium derivative is dissolved in aqueous media, suggests the occurrence of an Haber–Weiss-like cycle(2–3)^{23,24} which ends with the Fenton reaction (4) generating $^{\bullet}\text{OH}$.²⁵



We are aware that in the presence of iron salts, the DMPO-OH adduct can be formed by a nucleophilic addition of water to DMPO. This possibility has been checked by running some ESR spectra in the presence of hydroxyl radical scavengers. The partial scavenging of the hydroxyl radical and the appearance of the

DMPO-CO₂ adduct in the spectra, obtained with the addition of formate to the samples, excludes that hydroxyl radical adduct signal coming exclusively from a nucleophilic addition of water to the spin trap.

The persistence of a hydroxyl radical adduct signal in the presence of formate, can be due to the decomposition of DMPO-OOH adduct, whose half-life is about one minute at pH 7.4.²⁶ Even when DEPMPO was used in place of DMPO, no signal attributable to a superoxide adduct was detected, although the half-life of the DEPMPO-OOH adduct is about 15 times longer than that of the DMPO-OOH adduct.¹⁸ This behavior can be explained by taking into account that the superoxide radical undergoes spontaneous dismutation reaction (see reaction 3), whose rate is about $2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7.4.²⁷

ESR spectra of samples prepared and managed under nitrogen showed that DMPO-OH signal intensities were greatly decreased in comparison to those obtained from similar samples prepared in air. Interestingly, these same samples on standing in contact with air in the quartz flat cell produced, after some hours, ESR intensities which became comparable to those coming from the samples prepared in air. When SOD and CAT were added in the preparation of the sample, only noise was recorded. All these results proved that dioxygen was involved in the formation of superoxide radical, whose spin trap adduct rapidly decomposed, giving the corresponding hydroxyl adduct. The latter was actually observed in the accumulation of a full ESR experiment, and it is due to both "genuine" hydroxyl radical and degraded DMPO-OOH adducts.

A carbon-centered radical adduct attributable to a cyclopentadienyl radical was evidenced in the ESR spectra. Even though the degradation pathway of ferrocenium compounds in water accounts for the formation of the Cp[•] radical, we believe this species rearranges too rapidly²⁸ to be spin trapped. Probably, the Cp-derived adduct can be assigned to a secondary cyclopentadienyl radical produced by reaction of the hydroxyl radical with the (bonded or free) R₂Cp. Evidence of the presence of Cp-oxygen radicals comes from low-temperature ESR spectra in the presence of air, where the singlets observed have been attributed to R₂CpOO• radicals (see Figure 6).²⁹ This hypothesis is also supported by the ESR spectra in the presence of CAT and SOD, where the suppression of the oxygen radicals caused the disappearance of the carbon-centered radical signals too.

The complete quenching of all ESR spin trap signals by addition of ascorbate to the sample can be easily explained considering that ascorbate competes very efficiently with DMPO for both superoxide and hydroxyl radical,²⁹ thus producing the ascorbyl radical which is the only radical species observed.

Kirsch et al.³⁰ claimed the formation of hydrogen peroxide in HEPES containing buffers, when peroxy-nitrite is formed in the bulk. These authors stated that any oxidant strong enough to oxidize certain tertiary amines (such as HEPES) in one-electron step would be able to initiate a reaction sequence leading to the formation of hydrogen peroxide. Conversely, Simpson et al.³¹ stated that HEPES "showed a biphasic dependence on concentration: low concentrations (2.5–10

mM) stimulated the response in a dose-related fashion, and high concentrations (20 mM) inhibited completely". In addition, "HEPES in a radical-generating system is normally considered a radical scavenger" as stated by the same authors. The results presented in this work did not show any appreciable variation in the ESR spectrum intensities when HEPES was used as media. Moreover, the data obtained in HEPES and DMEM match those obtained in phosphate buffer. It is quite reasonable to assume that in our experimental condition the mechanism stated by Kirsch et al. might not occur. On the other hand, the added spin trap (DEPMPO or DMPO) should be much more easily oxidizable than HEPES. Such oxidation would lead to a 2,2'-DMPO-like dimer formation,³² which was not observed. Therefore, our results should be unaffected by the production of hydrogen peroxide due to reaction of HEPES with oxidants, as confirmed by data obtained in phosphate buffer.

The addition of oleic acid in the sample resulted in an additional feature in the ESR spectra. The simulation of the spectrum taken after 90 min reveals a contribution of the lipid derived DMPO adduct.

Conclusions

The toxicity of ferrocenium derivatives in our *in vitro* model is due to oxidative damage to DNA. This study outlines the stability–cytotoxicity relationship for this class of compounds: the most stable compound, namely DEMFc⁺, is actually the most cytotoxic. The lower degradation rate of DEMFc⁺ and its higher lipophilicity (compared with the other ferrocenium salts tested) allow the diffusion of a larger amount of "intact" molecules into the cell, where they produce •OH radicals. An extracellular cytotoxic effect is suggested for all the other unstable salts, supported also by the short time occurring for the cell killing, and the more intense lipid oxidation (ESR data on Fc⁺) suggestive of an external membrane damage. This mechanism is evident only for high concentrations, where the inflicted damage is sufficient to cause cell death. On the contrary, the DEMFc⁺ toxicity is time- and dose-dependent, as evident for prolonged treatments.

The proposed mechanism of action of DEMFc⁺ justifies the rationale for its combination with the iron-dependent drug bleomycin. The synergistic effect found in a physiological range of concentrations highlights the pharmacological potentiality of the former compound. In fact, FACS shows the ability of DEMFc⁺ of inflicting oxidative damage of the guanine nucleobase, whereas bleomycin mainly affect the sugar residues with a fully complementary mechanism of oxidative stress of DNA. Moreover the iron ions made available from DEMFc⁺ decomposition can be incorporated in bleomycin, further improving its activity.

Since there is an enormous body of knowledge on the synthesis of ferrocene derivatives,³³ the opportune choice of ring substituents will trigger the stability level of the corresponding cations toward the maximal cytotoxic effect, and possibly toward selectivity. Indeed, recent research activity has been focused on the synthesis of stable, water-soluble, ferrocenium derivatives to be tested as antitumor agents.^{34,35}

Experimental Section

Reagents and Instrumentation. Ferrocene $\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2$, decamethylferrocene $\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{CH}_3)_2$, 1,1'-dimethylferrocene $\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{C}_2\text{H}_5)_2$, ferrocenecarboxylic acid $\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{COOH}))_2$, and ferrocenylboronic acid $\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{B}(\text{OH})_2))_2$ were purchased from Aldrich, bisoxymeth A_2 from Xchem. Reagent grade organic solvents were purchased from Aldrich and used as received. AgBF_4 98% from Stream Chemicals was used as the oxidizing agent. UV-vis spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 20 spectrophotometer. Measurements of longitudinal water proton relaxation rates were carried out on a desktop M55-M spectrometer (Institute Jozef Stefan, Ljubljana, Slovenia) operating at the magnetic field strength of 0.28 T (corresponding to a proton Larmor frequency of 11.8 MHz). IR spectra were recorded using KBr pellets in the 4000–400 cm^{-1} range on a Bruker Equinox 55 FT-IR spectrophotometer at a 4 cm^{-1} resolution and coadding 16 scans. Electrospray mass spectra (ESI-MS) were obtained by a Micromass 2B-D mass spectrometer. Typically, a dilute solution of compound in water was delivered directly to the spectrometer source at 0.01 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, using a Hamilton gastight microsyringe controlled by a single-syringe infusion pump. The nebulizer tip was at 3000–3500 V and 150 °C, with nitrogen used both as a drying and a nebulizing gas. The cone voltage was usually 30 V, when clean parent ions were required, and was varied up to 130 V to investigate fragmentation processes. Molecular ion peaks were assigned from the m/z values and from the simulated isotope distribution patterns. Elemental analysis results for elements indicated by symbols were within $\pm 0.4\%$ of theoretical values. Electron spin resonance (ESR) spectroscopic measurements were carried out on a Bruker ER 200 D spectrometer driven by an ESP 3220 data system and equipped with an NMR gaussmeter. Spin trapping experiments were recorded at room temperature in a standard quartz flat cell. ESR spectra at room temperature (spin trap adducts) were simulated by using PEST WinSim developed by D. R. Duling.²⁸ Frozen solution spectra were recorded at 77 K.

Preparation of Ferrocenium Salts. AgBF_4 was added stoichiometrically to 10 mL of an acetone solution containing the ferrocene. A dark gray precipitate appeared immediately. The reaction mixture was filtered to remove metallic silver. The filtered solution was evaporated, and the solid product was dried under vacuum.

Ferrocenium tetrafluoroborate (Fc^+). Yield: 92%. Anal. ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{BF}_4\text{Fe}$) C, H, Fe. IR (KBr, cm^{-1}): 3100 s (C–H), 1415 m (C–C), 1105 vs, 851 s (CH), 816 m (CH), 460 w, 477 w. ESI-MS: m/z 186 [M]⁺.

Decamethylferrocenium tetrafluoroborate (DEMFC⁺). Yield: 91%. Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BF}_4\text{Fe}$) C, H, Fe. IR (KBr, cm^{-1}): 2982 w (CH₃), 2962 w (CH₂), 2908 mw (CH₂), 1475 m (Cp–CH₃), 1460 sh (Cp–CH₂), 1381 ms (Cp–CH₂), 1423 w (C–C), 1094 vs, 591 w, 450 w (Cp–Fe–Cp). ESI-MS: m/z 326 [M]⁺.

1,1'-Dimethylferrocenium tetrafluoroborate (DMFC⁺). Yield 89%. Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{BF}_4\text{Fe}$) C, H, Fe. IR (KBr, cm^{-1}): 3105 s (C–H), 2963 m (CH₂), 2924 m (CH₂), 2854 m (CH₂), 1477 m (Cp–CH₃), 1391 mw (Cp–CH₂), 1450 m (C–C), 1113 sh, 853 m (CH), 482 w. MS-ESI: m/z 214 [M]⁺.

Ferroceniumcarboxylic acid tetrafluoroborate (CAFc⁺). Yield 85%. Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{BF}_4\text{Fe}$) C: calcd, 41.70; found, 42.07; H, Fe. IR (KBr, cm^{-1}): 3180 sbr (O–H), 3118 s (C–H), 2632 m (C=O), 2554 m (C=O), 1706 vs (C=O), 1653 vs (C=O), 1475 s, 1415 m (CH), 1400 m (CH), 1295 s (C–O), 1283 sh (C–O), 1109 s, 914 w (OH), 858 m (CH), 483 mw. ESI-MS: m/z 230 [M]⁺.

Ferrocenylboronic acid tetrafluoroborate (BAFc⁺). Yield 82%. Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{B}_2\text{F}_4\text{Fe}$) C, H, Fe: calcd, 17.64; found, 17.38. IR (KBr, cm^{-1}): 3217 vs br (BOH), 3104 s (C–H), 1460 s (C–C), 1380 ms (B–O), 1202 s (B–C), 857 m (CH), 636 m, ESI-MS: m/z 230 [M]⁺.

UV-vis Spectra. Solutions were prepared for each ferrocenium salt, adjusting the absorbance value at 250 nm in a range between 1 and 2 absorbance units. With filtered solutions, the UV-vis spectra were recorded, and the absorbance

value of the maximum in the region between 200 and 300 nm was considered as the starting value for stability tests. For each spectrum the maximum absorbance value was baseline corrected.

Relaxation Measurements. T_1 values were measured with 180°–90° method (inversion recovery) at 11.8 MHz and 25 °C. The longitudinal net molar relaxation rate (R_{1p}) is given by: $R_{1p} = \{[\text{paramagnetic species}]T_{1p}\}^{-1}$ where $(T_{1p})^{-1} = T_1(\text{observed})^{-1} - T_1(\text{blank})^{-1}$ and $T_1(\text{blank})$ is the longitudinal relaxation time for distilled water (2.37 s). Salts were dissolved in distilled water (pH 6–6.5) at the molar concentration reported in Table 1. The reference salts $\text{NaFe}(\text{III})\text{EDTA}$ and $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{DTPA})$ were synthesized according to literature methods.^{29,30} The solutions of $\text{NaFe}(\text{III})\text{EDTA}$ ²⁹ and $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{III})\text{DTPA}$ ³⁰ were adjusted to pH 5 and 9, respectively, at which each complex is stable.

Cytotoxicity Tests. General Procedures. Human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells were cultured in DMEM culture media (with HEPES 25 mM) containing L-glutamine (2 mM) supplied with 10% of fetal calf serum (FCS) (Sigma) and incubated under standard conditions (37 °C, 5% CO₂) in plastic culture flask. All experiments were carried out using cells in the exponential phase of growth. Cells were trypsinized, resuspended in DMEM containing 10% FCS and seeded (250000 cells/well) in 6-well plates. After 24 h the medium was replaced by fresh medium containing the drug. Fresh complete medium without drugs was used for controls. At the end of the treatment, cell viability was evaluated measuring the activity of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase. This test used 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma) as substrate that was converted to a formazan product, which was detected spectrophotometrically at 570 nm using a 690 nm background correction.

First Screening Test. Cells were treated for 48 h with concentrations ranging from 5 to 500 μM of the proper ferrocenium salt. A control culture was used for each ferrocenium salt tested. After 48 h of drug exposure, MTT solution of 5 mg/mL (in saline) was added in each well, and cells were incubated for 60 min. The medium was carefully removed to eliminate the dye excess, and the formazane product was dissolved with acidified isopropyl alcohol (0.12 M HCl). The percentage cell viability was calculated by the equation:

$$\text{cell viability (\%)} = \frac{A_{570}^{\text{test}} - A_{690}^{\text{test}}}{A_{570}^{\text{ctrl}} - A_{690}^{\text{ctrl}}} \times 100$$

Decamethylferrocenium vs Ferrocenium Cytotoxicity Assay. DEMFC⁺ and Fc⁺ were tested at 10, 50, 100, 500 μM concentrations with different drug exposure times. In every single experiment cells were exposed to the same concentration of the two drugs for increasing times (2, 12, 24, and 48 h). Cells were treated with the two compounds after 24 h of growth. An untreated control for each treatment time was added. At every time point, medium was replaced by fresh one in the corresponding well (test and control). Cells were always counted 5 days since the beginning of the treatment with the same method described for the first screening. The percentage cell viability was calculated considering the control that was washed at the corresponding time

$$\text{cell viability (\%)} = \frac{A_{570}^{\text{test time (h)}} - A_{690}^{\text{test time (h)}}}{A_{570}^{\text{ctrl time (h)}} - A_{690}^{\text{ctrl time (h)}}} \times 100$$

Detection of Oxidative Damage to Cellular DNA In Vitro. The oxidative damages on DNA, due to the generation of intracellular reactive oxygen species (ROS), have been investigated by measuring the presence of 8-oxoguanine residues with a specific fluorescent probe. Cells were treated for 30 min with DEMFC⁺ dissolved in complete media at concentrations of 10⁻⁴, 10⁻⁵, and 10⁻⁶ M, washed twice with fresh media, incubated for 2 h with fresh media, finally harvested, fixed with 2% ice-cold paraformaldehyde, and treated with 70% ethanol. The detection of 8-oxoguanine was

performed by using Fluorogenic OxyDNA Assay kit (Calbiochem, CA). The FITC-labeled conjugate evidenced radical-derived DNA products, and the quantification was performed with a FACSCalibur System and CellQuest software (Becton-Dickinson, NJ).

Decamethylferrocenium and Bleomycin. Bleomycin A₂ was tested on MCF-7 cell line at 10, 20, 35, 50, 70 μ M concentrations. After 24 h of drug exposure, the medium was replaced by fresh one and cell viability was evaluated by MTT method, 5 days since the beginning of the treatment. Drug combination cytotoxicity was tested at the concentrations reported in Table 4, utilizing DEMFc⁺ and bleomycin in equimolar quantities. After 24 h of cell exposure to DEMFc⁺, medium was replaced by fresh one containing bleomycin. Cells were cultured for further 24 h, in the presence of bleomycin, afterward the medium was replaced. Cells were counted by MTT method 5 days since the beginning of drug exposure. The percentage cell viability was calculated considering the untreated control.

Spin Trapping Measurements. Spin trapping experiments were carried out to identify which radicals are produced when the ferrocenium derivatives are dissolved in aqueous media. 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) was purchased from Sigma and used after vacuum distillation to remove orange paramagnetic impurities present in the commercial samples. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO)^{19,20} was purchased from Oxis and used without any further purification. The spin trap reagent was dissolved in each solution before the addition of the proper ferrocenium derivative. The reaction mixtures for spin trap experiments were prepared by adding 100 μ L of the proper ferrocenium derivative (2 mM or 0.15 mM) to 200 μ L of aqueous media. The aqueous media mainly used were phosphate buffer (PB) 0.1 M, pH 7.4; HEPES 25 mM, pH 7.4, and culture media DMEM (with HEPES 25 mM, Sigma). Most of the measurements were run by using ferrocenium solutions, 0.15 mM (final concentration 50 μ M), in order to rule out any interference with the spin trap. In fact, ferrocenium derivatives can oxidize DMPO to 2,2' DMPO dimer²¹ ($k^1 = 14.5$, $k^2 = 16.0$ G, not shown) if added at sufficient high concentration. Several spectra were recorded for each reaction mixture at different times, to follow the evolution of the signals of the trapped radicals.

Acknowledgment. MIUR (Rome), CNR (Rome) and CIRCMSB (Bari) are gratefully acknowledged for financial support. The research was carried out in the frame of the EU COST D20 action (metal compounds in the treatment of cancer and viral diseases). We thank Prof. M. Botta and Dr. M. Ravera (Università "A. Avogadro") for the T_1 measurements and electrospray mass spectra, respectively. We are indebted to a reviewer for having greatly improved the manuscript.

References

- Kopf-Mater, P.; Kopf, H. Non-platinum-group Metal Antitumor Agents: History, Current status, and Perspectives. *Chem. Rev.* 1987, 87, 1137-1152.
- Kopf-Mater, P.; Kopf, H.; Nause, E. W. Ferrocenium Complexes: a New Type of Water-soluble Antitumor Agent. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 1984, 108, 336-340.
- Moishashi, N.; Meyer, R.; Gallapudi, S. R.; Bhattiprolu, K. R. Synthesis and Activity of Potential Antitumor Ferrocenes. *J. Organomet. Chem.* 1990, 398, 205-217.
- Nause, E. W.; Kawawa, F. Evaluation of The Activity of Some Water-soluble Ferrocenes and Ferrocenium Compounds Against Carcinoma of the Lung by The Human Tumor Clonogenic Assay. *Appl. Organomet. Chem.* 1990, 4, 19-26.
- Osella, D.; Ferrali, M.; Zanello, P.; Laschi, F.; Fontani, M.; Nervi, C.; Cavignolo, G. On The Mechanism of the Antitumor Activity of Ferrocenium Derivatives. *Inorg. Chim. Acta* 2000, 285, 42-48.
- Kopf-Mater, P.; Klappötke, T. Tumor Inhibition by Ferrocenium Complexes. *Arzneim.-Forsch.* 1989, 39 (II), 369-371.
- Kopf-Mater, P. Tumor Inhibition by Ferrocenium Complexes: Systemic Effect in Vivo and Cell Growth Inhibition in Vitro. *Z. Naturforsch., C: Biophys.* 1985, 40, 843-846.
- Houlton, A.; Roberts, R. M. G.; Silver, J. Studies on the Antitumor Activity of Some Iron Sandwich Compounds. *J. Organomet. Chem.* 1991, 418, 107-112.
- Wenzel, M.; Wu, Y.; Liss, E.; Nause, E. W. Stability of Ferrocenium and its Cytotoxic Effect. *Z. Naturforsch., C: Biophys.* 1988, 43, 983-986.
- Tamura, H.; Miwa, M. DNA Cleaving Activity and Cytotoxic Activity of Ferrocenium Cations. *Chem. Lett.* 1997, 1177-1178.
- De Zwart, L. L.; Meerman, J. H. N.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans. *Free Radical Biol. Med.* 1999, 26, 202-226.
- Burger, E. M. Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin. *Chem. Rev.* 1998, 98, 1153-1169.
- Prina, E.; Korowagan, A. R.; Kortbek, A. G. T. G. Decomposition of the Ferrocenium Cation by Nucleophilic Reagents. *J. Organomet. Chem.* 1972, 30, 335-344.
- Shen, R. B.; Hendrickson, D. N.; Gray, H. B. Electronic Structure of Metalloenes. *J. Am. Chem. Soc.* 1971, 93, 3603-3612.
- Lauffer, R. B. Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation Agents for NMR Imaging: Theory and Design. *Chem. Rev.* 1987, 87, 901-927.
- Hait, W. N.; Gonnards, J. F.; Lazo, J. S. Effect of Anti-calmodulin Drugs on the Growth and Sensitivity of C6 Rat Glioma Cells to Bleomycin. *Anticancer Res.* 1994, 14, 1711-1721.
- Chou, T. C.; Talalay, P. Quantitative Analysis of Dose-effect Relationships: the Combined Effects of Multiple Drugs or Enzyme Inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 1984, 22, 27-55.
- Frajndlik, C.; Karoui, H.; Tuccio, B.; Le Moigne, F.; Culcasi, M.; Piferi, S.; Lauricella, R.; Torck, P. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-Oxide: A New Efficient Phosphorylated Nitroso for the in Vitro and in Vivo Spin Trapping of Oxygen-Centered Radicals. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 258-265.
- Barker, P. J.; Sibart, S. R.; West, P. R. Spin Trapping of Cyclopentadienyl Radicals using Nitroso Compounds and Nitroxide. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1986, 127-130.
- Bernobsky, C.; Bandaru, B. M. Spin Trapping, Endogenous Radicals in MC-1010 Cells: Evidence for Hydroxyl Radical and Carbon-centered Acetyl Radical Adducts. *Mol. Cell. Biochem.* 1995, 148, 155-164.
- Bustner, G. R. Spin Trapping: ESR Parameters of Spin Adducts. *Free Radical Biol. Med.* 1987, 3, 259-303.
- Dikalov, S. I.; Mason, R. P. Spin Trapping of Polyunsaturated Fatty Acid-derived Peroxyl Radicals: Reassignment to Alkoxy Radical Adducts. *Free Radical Biol. Med.* 2001, 30, 187-197.
- Mircea, G.; Aust, S. D. The Requirements for The Iron(III) in The Initiation of The Lipid Peroxidation by Iron(III) and Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 1098-1104.
- Mircea, G.; Aust, S. D. Redox Cycling of Iron and Lipid Peroxidation. *Lipids* 1992, 27, 219-226.
- Goldstein, G.; Meyerstein, D.; Czapski, G. The Fenton Reagents. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, 15, 435-445.
- Bustner, G. R.; Oberley, L. W. Considerations in The Spin Trapping of Superoxide and Hydroxyl Radical in Aqueous Systems Using 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-1-oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978, 82, 69-74.
- Bialski, B.; Cabelli, D. E. Highlights of Current Research Involving Superoxide and Perohydroxyl Radicals in Aqueous Solutions. *Int. J. Radiat. Biol.* 1991, 59, 291-319.
- Davies, A. G.; Luczyk, J. Photolysis of the Carbon-Hydrogen Bond in Pentamethylcyclopentadiene. Properties of the Pentamethylcyclopentadienyl Radical. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1981, 692-696.
- Tabbi, G.; Fry, S. C.; Bonomo, R. P. E. S. R. Study of Nonenzymic Oxidation of Xyloglucan by an Ascorbate-H₂O₂-copper System: The Involvement of The Hydroxyl Radical and The Degradation of Ascorbate. *J. Inorg. Biochem.* 2001, 98, 1153-1165.
- Kirsch, M.; Lomonosova, E. E.; Karth, H.-G.; Sautmann, R.; de Groot, H. Hydrogen Peroxide Formation by Peroxynitrite with HEPES and Related Tertiary Amines. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 12716-12724.
- Simpson, J. A.; Chessman, K. H.; Smith, S. E.; Dean, R. T. Free Radical Generation by Copper Ions and Hydrogen Peroxide. *Biochem. J.* 1988, 254, 519-523.
- Thornalley, P. J. The Haemolytic Reactions of 1-Acetyl-2-Phenylhydrazine and Hydroxaline: a Spin Trapping Study. *Chem.-Biol. Interact.* 1984, 50, 339-349.
- Robert, C. K. In *Comprehensive Organometallic Chemistry II*; Abel, E. W.; Gordon, F.; Stone, A.; Wilkinson, G., Eds.; Pergamon: Oxford, 1995; Vol. 7 Chapter 2.8, pp 185-198.
- Bradley, S.; McGowan, P. C.; Oughton, K. A.; Thornton-Pett, M.; Walsh, M. E. Facile Synthesis of Amino-functionalized Ferrocenes and Vanadocenes. *Chem. Commun.* 1999, 77-78.

- (35) Bradley, S.; Camm, K. D.; Liu, X.; McGowan, P. C.; Muniz, R.; Coughton, K. A.; Podesta, T. J.; Thomson-Patt, M. Synthesis and Structural Studies of 1,1'-Bis-Amino-Functionalized Ferrocenes, Ferrocene Salts, and Ferrocenium Salts. *Inorg. Chem.* 2002, *41*, 715-728.
- (36) Duling, D. R. Simulation of Multiple Isotropic Spin Trap EPR Spectra. *J. Magn. Reson.* 1994, *B 104*, 105-110.
- (37) Lind, M. D.; Heard, J. L.; Hamor, M. J.; Hamor, T. A. Stereochemistry of Ethylenediaminetetraacetate Complexes. *Inorg. Chem.* 1961, *3*, 34.
- (38) Hall, L. H.; Spjerkman, J. J.; Lambert, J. L. Preparation and Coordination Studies of the Complex Acid, Dihydrogen Diethylenetriaminepentaacetateferrate(III) Dihydrate, and Several of Its Metal(II) Salts. *J. Am. Chem. Soc.* 1938, *60*, 2044-2048.
- (39) Bloch, J.; Neron, G. A Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Study of Iron(III) EDTA in Aqueous Solution. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1960, *42*, 693-699.
- (40) Oakes, J.; von Karlingen, C. G. Spectroscopic Studies of Transition-metal Ion Complexes of Diethylenetriaminepenta-acetic Acid and Diethylenetriamine-penta-methylphosphonic Acid. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1984, 1133-1137.
- (41) Vasquez-vivar, J.; Hogg, N.; Fritschard, K. A.; Martasek, K. P.; Kalyanasaram, B. Superoxide Anion Formation from Luiginic: an Electron Spin Resonance Spin-trapping Study. *FEBS Lett.* 1997, *403*, 127-130.

JM021003K



Cis-[Pt(Cl)₂(pyridine)(5-SO₃H-isoquinoline)] complex, a selective inhibitor of telomerase enzyme^a

Donato Colangelo¹, Anna Lisa Ghiglia¹, Ilario Viano¹, Giorgio Cavigliolo² & Domenico Osella^{2,*}

¹Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale 'A. Avogadro', via Solaroli, 17, I-28100 Novara, Italy; ²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate Università del Piemonte Orientale 'A. Avogadro', Corso Borsalino 54, I-15100, Alessandria, Italy; *Author for correspondence (E-mail: domenico.osella@unfn.unipmn.it)

Received 22 October 2002; accepted 26 November 2002; Published online: April 2003

Key words: anticancer chemotherapy, apoptosis, metallo-pharmaceuticals, platinum complexes, telomerase inhibitors

Abstract

Since it has been widely demonstrated that platinum-based drugs, like cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, bind preferentially to guanine in N7 position and that telomerase assemblage includes a RNA portion rich in guanine, we previously designed and synthesized a series of new complexes with a cytotoxic [Pt(II)Cl₂] moiety, with the aim of selecting carrier ligands able to inhibit telomerase enzyme. Among these compounds, [cis-dichloropyridine-5-isoquinolinesulfonic acid Pt(II)], named Ptquin8, showed the most significant inhibition of telomerase in a cell-free biochemical assay. In this paper, we report the biological effects of Ptquin8 on *in vitro* tumor model (MCF-7). This complex is able to reduce telomerase activity from 12 to 46%, in a concentration range between 10⁻⁹ and 10⁻⁵ M after 24 h continuous treatment. Moreover, Ptquin8 shows significant cytotoxicity after 10 days of continuous treatment only at concentrations higher than 10⁻⁵ M. The determination of residual telomere length confirmed the inhibition of telomerase action. This induced a progressive reduction of the cell proliferative capacity, and the appearance of an elevated number of apoptotic cells after 18 days. RT-PCR analysis of telomerase RNA components excluded any interaction of the compound at genomic level. The biochemical effects of Ptquin8 were also evaluated on non-neoplastic NIH3T3 cells, that are able to down-regulate telomerase activity as a consequence of the confluence contact inhibition. In this cell model, the reactivation of telomerase due to re-seeding at lower density was significantly inhibited by Ptquin8 in a dose-dependent manner. These results highlight a possible role of Ptquin8 as a selective anti-telomerase tool for cancer treatment.

Introduction

Telomerase is deputed to the elongation of chromosomal ends. This mechanism confers an unlimited proliferative potential to the cells that become able to escape replicative senescence (Parkinson *et al.*, 1997). A number of experimental evidences demonstrate a strong telomerase activity in most human tumors and their metastasis, a mild activity in germinal cells, and

undetectable levels in normal somatic tissues (Faraoni *et al.* 1997; Ogino *et al.* 1998). This enzyme, that is a specific tumor marker, represents an ideal pharmacological target, too. The inhibition of telomerase, in fact, could cause a progressive and critical reduction of telomeres, a potent signal for cell proliferation blockage and for the induction of apoptosis, especially for highly proliferative cells, like metastasis (Hahn *et al.* 1999).

An ideal anticancer strategy should be free of systemic toxicity, typical for actual chemotherapy. Telomerase-directed therapy neither affects somatic

^aThis article includes material presented at the 2nd Workshop on Pharmaco-Bio-Metals, Siena, Italy, 29 November–1 December 2002.

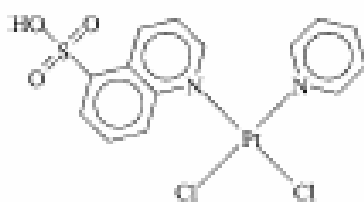


Fig. 1. Sketch of structure of Ptquin8.

cells, since they are telomerase-negative, nor compromises the survival of staminal and germinal cells, that possess low levels of the enzyme and are able to regulate its activation (Campisi 1997).

In the last years, different authors have carried out some experimental strategies to inhibit telomerase with promising results (Campisi 1997; Liu 1999; Yegorov *et al.* 1996; Strahl & Blackburn 1994; Melara *et al.* 1998; Strahl & Blackburn 1996; Lingner *et al.* 1997).

Platinum(II)-based antiproliferative drugs possess high affinity for nucleotides, especially for guanine in N7 position (Sherman *et al.* 1987; Wong *et al.* 1999). Telomerase catalytic activity is based on its RNA template, rich in guanine (Norton *et al.* 1996; Kim *et al.* 1994). Thus, platinum(II)-based compounds seem to offer a good model for telomerase-blocker design. Earlier, we have described the synthesis of a series of platinum complexes with carrier groups suitable for interacting with telomerase (Cavigiolio *et al.* 2000) in a cell-free biochemical assay. The aim of the present work is to further investigate the biological effects of the most promising molecule, i.e., [cis-dichloropyridine-5-isoquinolinesulfonic acid Pt(II)], hereafter Ptquin8 (Figure 1), on cell models.

Materials and methods

Cell culture

An established cell line, the human mammary adenocarcinoma, MCF-7, has been used for the *in vitro* experiments (ATCC HTB-22, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). In addition, for comparison studies a non-tumoral model (NIH3T3 cell line from Swiss albino mouse fibroblasts) was adopted. This cell line maintains the contact-inhibition of growth. NIH3T3 cells were plated at high density, in order to become confluent within 48 h, and grown for at least two weeks. The medium was replaced every 36 h. All the cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with

10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B. Culture reagents were purchased from Sigma. Cells were cultured at 37 °C in humidified 5% CO₂ atmosphere, and cell monolayers were periodically screened for mycoplasma contamination.

Ptquin8 was dissolved in culture medium freshly before use. For long term treatments (up to 4 weeks), the MCF-7 cells were detached with 0.05% trypsin – 0.02% EDTA solution (Sigma) every 72 h and were plated in complete medium conditioned with the compound. Every 36 h the growth medium was replaced with fresh medium containing appropriate concentration of Ptquin8.

Chemicals

Ptquin8 was synthesized according to the previously published method (Cavigiolio *et al.*, 2000).

Unless otherwise indicated, all reagents and salts were purchased from Sigma (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA).

Cell viability assay

The tetrazole-based vitality test was adopted using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Converted dye was dissolved in HCl-acidified isopropanol and measured spectrophotometrically at 570 nm (background subtraction at 630 and 690 nm). All experiments were conducted at least in triplicate. The results are presented as mean ± standard deviation (SD) and subjected to student's *t*-test statistical analysis.

Determination of the residual telomerase activity

The effects of the Ptquin8 on cell proliferation were correlated with telomerase activity. Cells were washed and the extraction of active residual telomerase was performed according to Kim *et al.* (1994). Briefly, after the treatments, cells were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS), pH 7, rinsed with a buffer containing 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl and 1 mM DTT, and incubated with 3 volumes of a cold solution containing 10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTCA, 0.5% CHAPS, 1 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1 mM PMSF and 5 mM 2-mercaptoethanol. Cell lysate was fractionated by centrifugation at 10 000 g for 30 min. Supernatants were collected quickly and stored at –80 °C until use. Total cellular protein was determined by Bradford method (1976).

A range of 0.5–1 µg total cellular protein extract was employed for the TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) reaction. Determination of telomerase activity by this semi-quantitative method was performed as previously described (Kim *et al.* 1994). The untreated cell extract was used as the positive control and a lysis buffer as the negative control.

Reaction products were resolved on an 8% polyacrylamide gel. Densitometry was performed using a GS-250 Molecular Imager (BioRad) with BI screen type and Phosphor Analyst 1.1 program for densitometric analysis.

Apoptosis

The effects of Ptquin8 on apoptotic response were evaluated by double staining of the treated cell monolayers. Cells were grown in plates and were treated continuously with Ptquin8 at 10^{-9} and 10^{-7} M concentrations. Every 3 days cells were re-seeded with fresh conditioned medium and assayed for apoptotic pattern by staining with Hoechst 33342 and propidium iodide. Nuclear morphological changes and cell membrane damage were analyzed by confocal microscopy (BioRad MRC 600 coupled to a Nikon Diaphot 200 microscope).

Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

In order to discriminate between non-specific action of the compound at the transcription level (thus interfering also with the synthesis of the telomerase) and its ability to interact exclusively with the synthesized enzyme, we evaluated the expressions of the RNA for three telomerase subunits, hTERT (human telomerase reverse transcriptase) hTERC (human telomerase RNA component), and TEP-1 (telomerase protein). Total RNA was extracted (Quiagen) and selected sequences were retrotranscribed and amplified with specific primers (AMV-RT, Sigma). We adopted 60 °C annealing temperature, 28 cycles for hTERT, hTERC, and TEP-1 and 21 cycles for β -actin. The specific primers for the three sequences were previously described by other authors (Yokoyama, 1998). The primer sets were as follows: for hTERT, 5'-TGAACCTTGCGGAAGACAGTGG-3' (forward) and 5'-ATGCGTGAAAOCCTGACGCOCT-3' (reverse); for hTERC, 5'-TTTGTCTAACCCTAACTGAGAAG-3' (forward) and 5'-TTGCTCTAGAATGAACGGTGGGA-3' (reverse); for TEP-1, 5'-TCAAGCCAAACCTGAATCTGAG-3' (forward) and 5'-CCCCGAGTGAATCTTCTAOGC-3' (reverse); for β -actin, 5'-GTGGG-

GCGCCCCAGGCACCA-3' (forward) and 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' (reverse). The products were resolved by 1.5% agarose electrophoresis and the data were normalized on β -actin expression using Gel Doc 1000 for acquisition and Quantity One program 4.0.3 (BioRad) for quantification analysis.

Determination of residual telomere length

For the telomere length determination, treated cells were detached, included in agarose plugs (10^7 per ml), and digested with proteinase K at 50 °C for 48 h. This procedure was adopted to facilitate the DNA restriction step, conducted with Hinf I enzyme (60 U per 10^7 cells). This reaction provided terminal DNA restriction fragments (TRF, 10^6 bp fragments), preserving the telomeric portion of DNA (10^3 – 10^4 bp). The samples were resolved with pulse field agarose gel electrophoresis (0.7%, 600 Vh). Resolved DNA was blotted on Nylon membranes (Hybond-N+, nylon), UV cross-linked and characterized with Southern blot analysis. Membranes were hybridized with specific probes for telomeres (TTAGGG)_n, ³²P-labeled, then analyzed with autoradiography and densitometry (PhosphorImager). Ladders were referred to the Hind III standard.

Results

As previously described by our group, Ptquin8 (Figure 1) was able to inhibit the enzyme in a cell-free biochemical assay in a dose-dependent manner in a concentration range of 10^{-11} – 10^{-7} M (Carigiolo *et al.* 2000).

The effect of this compound has been then evaluated directly on cells. The treatment of log-phase growing MCF-7 monolayers for 24 h with Ptquin8 evidenced a maximum inhibition of ca. 44% in 10^{-7} – 10^{-4} M interval. This inhibition progressively decreased at lower concentrations (Figure 2). A typical dose-response TRAP assay is shown Figure 3.

The toxicity profile of Ptquin8 was evaluated by culturing the cells for 10 days (with administration interval of 24 h) with complete medium containing 10^{-9} – 10^{-4} M of the compound. Results obtained from MTT assay showed that this compound had significant cytotoxic effects only at concentrations higher than 10^{-5} M. Therefore, in further experiments, we employed Ptquin8 at 10^{-9} and 10^{-7} M concentrations in order to keep significant anti-telomerase activity and avoid any specific cytotoxic effects.

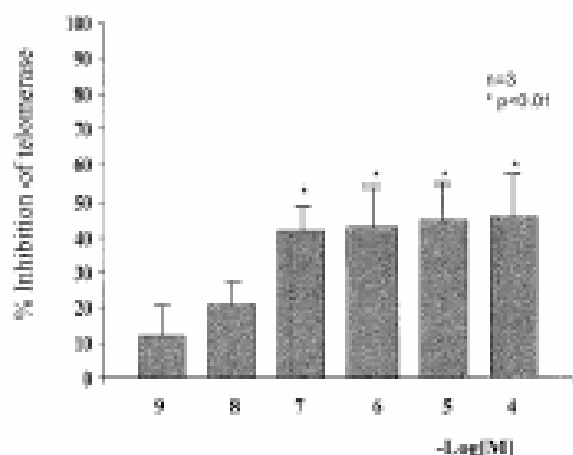


Fig. 2. Antitelomerase activity of Piquin8 on tumoral cells. MCF-7 were treated for 24 h with Piquin8 in a concentration range of 10^{-4} – 10^{-9} M. The average reduction of residual telomerase activity extracted from the cells was 46% for 10^{-4} – 10^{-7} M range. Data are expressed as the mean \pm SD.

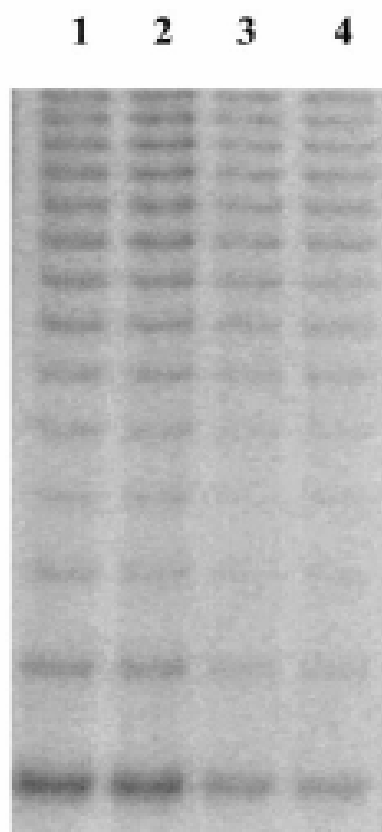


Fig. 3. Typical TRAP assay resolved with PAGE. Lane 1: untreated MCF-7 (control), Lane 2 to 4: MCF-7 cells treated with 10^{-9} , 10^{-7} and 10^{-5} M Piquin8 for 24 h.

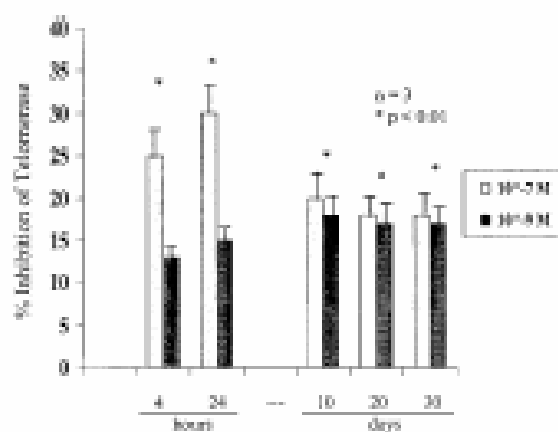


Fig. 4. Long term effects (30 day continuous treatment with conditioned media renewal every 36 hours) on telomerase activity of Piquin8 at two concentrations, namely 10^{-7} and 10^{-8} M. Data are expressed as the reduction of activity respect to the untreated control at the same time point.

To investigate the effect of long term treatments on telomerase and the relative consequences on cell growth pattern, a 30-day continuous incubation with Piquin8 at 10^{-9} and 10^{-7} M concentrations was performed. At given time intervals, telomerase activity, cell vitality, apoptosis, and telomere length were evaluated.

The analysis of telomerase activity with TRAP assay at 10^{-7} M Piquin8 showed a significative decrease (ca. 30%) in the first 24 h, and a stable reduction (ca. 20%) for the remaining period (Figure 4). Incubation at 10^{-9} M led to a lower, but constant (ca. 15%) reduction of telomerase activity. Starting from day 15, Piquin8 was able to reduce the proliferation of the cells with respect to the untreated control (Figure 5), even if the visual assessment of the culture or the trypan blue dye exclusion did not reveal a consistent number of dead cells. However, apoptotic nuclei were visible from day 18. This phenomenon was followed by a progressive cell death from day 21, and matched the vitality assay results.

In order to demonstrate that the reduction of telomerase activity was not due to a reduction of the transcription of the components of telomerase, we measured their expression levels, as shown in Figure 6. Piquin8 (10^{-7} M) after 4, 20, 30 and 48 h of continuous treatment, caused no differences in expression of mRNA of telomerase components, namely hTERT, hTERC and TEP-1, compared to the untreated control. These data were obtained by RT-PCR and normalized with the housekeeper β -actin expression.

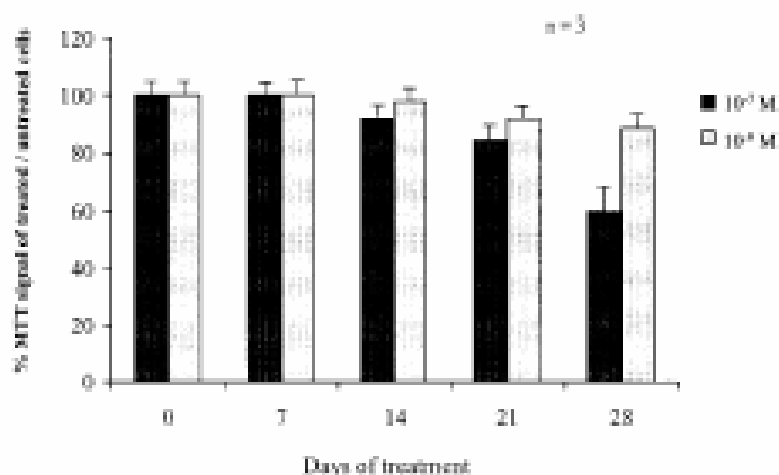


Fig. 5. Long term effects of Piquin-8 on proliferation of MCF-7. Cells were continuously incubated with Piquin8, 10^{-7} and 10^{-9} M, freshly replaced every 36 h. After 72 h, the cells were detached and re-seeded at 1/3 density. Data are expressed as the mean \pm SD.

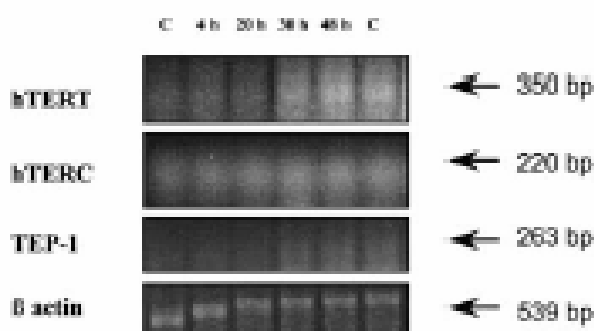


Fig. 6. Effects of Piquin8 on the transcription of the different components of telomerase. Piquin8 10^{-7} M for 4, 20, 30 and 48 h continuous treatments induced no differences on the expression of the mRNA of hTERT, hTERC and TEP-1, respect to the untreated control (C). The expression of the components was measured by RT-PCR and normalized with beta-actin. No differences in the expression could be appreciated.

The telomere analysis revealed that the continuous exposure of cells with Piquin8 and the relative telomerase inhibition caused a progressive reduction of their length (Figure 7). The overall experimental protocol has been applied also to the non-tumoral fibroblastic NIH3T3 cell line. The cytotoxic profile of Piquin8 (10^{-7} M) on these cells, revealed no effects up to 14 days of continuous treatment (data not shown). These cells, when confluent, naturally down-regulate telomerase activity, as already demonstrated by other authors (Holt *et al.* 1996). The continuous exposure to Piquin8 contributed to down-regulate the enzyme activity (Figure 8). Re-seeding of confluent cells at lower density led to a fast increase in telomerase activity within 24 h. Treatment of re-seeded cells with Piquin8

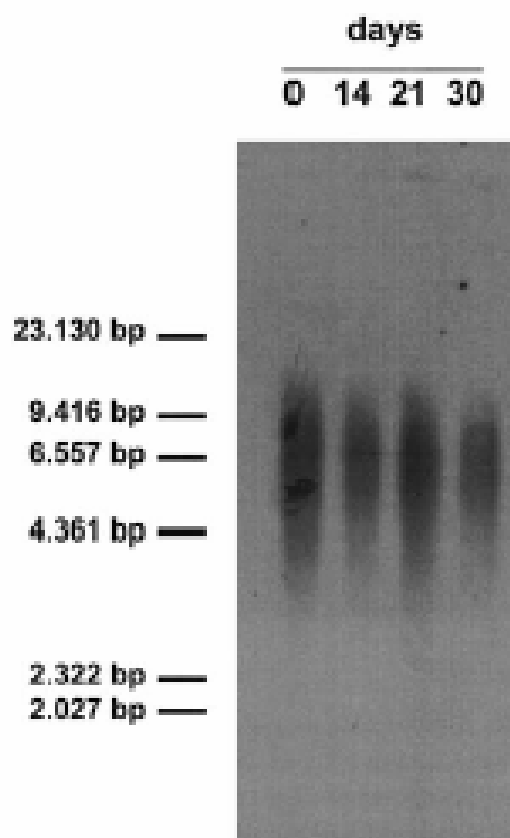


Fig. 7. Effects of Piquin8 on telomere length. Long term treatments induced a progressive reduction of telomere length, evident from day 14. Lane 0 days represents the untreated control. Hind III was the reference bp ladder.

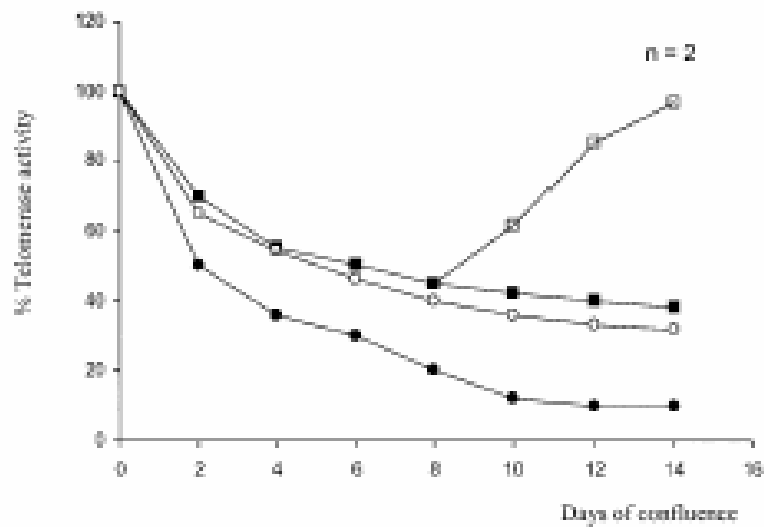
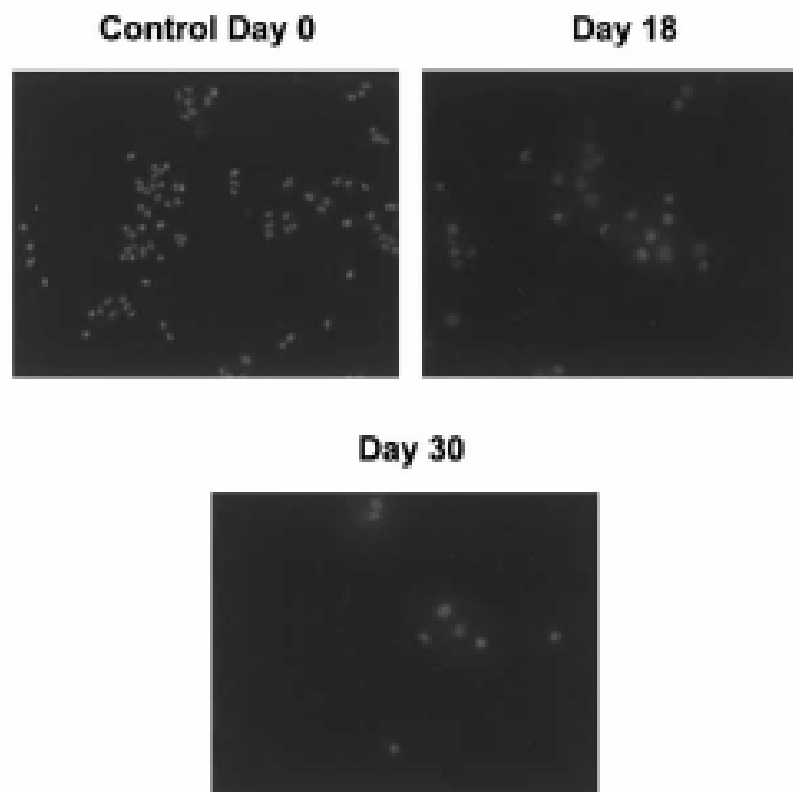


Fig. 8. Down-regulation of telomerase activity induced by contact inhibition of the growth in MCF-7. Data points represent telomerase activity. Cells were grown to confluence and kept without media renewal for up to 14 days (filled squares). Pequin8 10^{-7} M (filled circles) or 10^{-9} M (empty circles) treatments induced a faster disappearance of telomerase activity. Re-seeding of the cells at lower density at day 8, promoted a fast recovery of telomerase activity in 24–48 h (empty squares). Pequin8 abolished this re-activation. $n = 2$.



Panel showing the effects of long term continuous treatments with Pequin8 on MCF-7 cell-line. Cells were kept under standard culture conditions, passed every 4 days, and fresh complete medium conditioned with 10^{-7} M Pequin8 was renewed every 48 h. Untreated cells represented day 0 control. Control picture is characterized by the presence of normal living cells as evidenced by blue spots due to Hoechst 33342, and is representative of day 7, 21, 30 controls. Starting from day 7, the presence of late apoptotic cells could be appreciated, and was exponentially increasing after day 21, as demonstrated by the red staining due to propidium iodide. At day 30 no living cells could be detected.

(10^{-7} M) strongly inhibited the recovery of the telomerase activity. Moreover, neither the proliferative rate nor the level of confluence of the monolayers were affected, when compared to the untreated controls. In this cell line, Ptquin8 did not cause the appearance of apoptotic nuclei even after 30 day continuous exposure (data not shown).

Discussion

Among a number of molecules synthesized by our group, Ptquin8 has been selected because of its ability to reduce telomerase activity in a cell-free system (Caviglioglio *et al.* 2000). In this paper, we show that Ptquin8 is also capable of reducing telomerase activity in living cells to a similar extent.

The observation that Ptquin8 induced a fast decrease of telomerase activity suggests a direct interaction between the compound and the existing pool of telomerase, rather than interference with the synthesis of the constituents of the enzyme. The RT-PCR data lead support to this finding, and suggest that the complex is not able to affect genomic DNA, at least in the concentration interval employed. On the contrary, the telomerase inhibition caused by cisplatin seems the result of genomic alteration (Burger *et al.* 1997; Zhang *et al.* 2002). Although Ptquin8 is not able to completely abolish the enzyme activity at any concentration tested, the inhibition obtained is sufficient to destabilize the telomeric homeostasis, causing the telomere shortening and the appearance of apoptotic pattern. This correlates with the impaired proliferative potential of the cells, as expressed by a progressive reduction of their replication.

In the non-tumoral NIH3T3 cell line, where neo-synthesis of telomerase is down-regulated in confluent cells, Ptquin8 induces a faster reduction of the enzyme, thus strengthening the hypothesis of a Ptquin8-telomerase direct interaction.

However, Ptquin8 does not induce apoptosis in these cells, even for long term treatments. Indeed, NIH3T3 cells derived from mouse where telomeres are much longer compared to those of human cells (Lejnine *et al.* 1995).

Interestingly, Ptquin8 is active at very low concentrations (10^{-8} – 10^{-7} M) where no specific cytotoxic effects have been observed. Therefore, this molecule can represent a new tool for cancer chemotherapy, where long term treatments, selectivity, and low systemic toxicity are required.

Studies to fully characterize the mechanism of action of Ptquin8, and its effect on cisplatin-resistant cell lines are in progress.

Acknowledgements

This work was financially supported by MIUR (Roma) and CNR (Roma). We are indebted to Johnson Matthey Ltd. for a generous loan of K_2PtCl_4 . A.G. thanks CIRCMSB (Bari) for research fellowship. This research was carried out in the frame of the EU Cost D20 action (Metal compounds in the treatment of cancer and viral diseases).

References

- Akiyama H, Honiguchi-Yamada J, Saito S, Hoshi Y, Yamada O, Maeguchi H, Yamada H. 1999 Cytostatic concentrations of anti-cancer agents do not affect telomerase activity of leukemic cells *in vitro*. *Eur J Cancer* 35 (2): 309–315.
- Bradford M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Burger AM, Double JA, Newell DR. 1997 Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur J Cancer* 33, 638–644.
- Campisi J. 1997 Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence. *J Am Geriatr Soc* 45: 482–488.
- Campisi J. 1997. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 33 703–709.
- Caviglioglio G, Benedetto L, Boscalini E, Colangeli D, Viano L, Quella D. 2000 Pt(II) complexes with different N-donor aromatic ligands for specific inhibition of telomerase. *Inorganica Chimica Acta* 305, 61–68.
- Furconi I, Turiniani M, Masci G, De Vecchio L, Shay JW, Bonmaman E, Graziani G. 1997 Decline in telomerase activity as a measure of tumor cell killing by antineoplastic agents *in vitro*. *Clin Cancer Res* 3, 579–585.
- Fong J, Funk WD, Wang SS, Weirick SL, Avilion AA, Chia CR, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J *et al.* 1995 The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236–1241.
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Kroll JH, Meyerson M, Weinberg RA. 1999 Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 5, 1164–1170.
- Hek SE, Wright WE, Shay JW. 1996 Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol Cell Bio* 16(6): 2932–2939.
- Kim NW, Bayazit MA, Prosen ER, Harley CB, West MD, Ho PL, Covatta GM, Wright WE, Weirick SL, Shay JW. 1994 Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011–2015.
- Lejnine S, Makarew VL, Langman JP. 1995. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92, 2303–2307.
- Linger J, Hughes TR, Shewchuk A, Mann M, Lundblad V, Coch TR. 1997 Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276, 361–367.

- Lippard B (ed.) 1999. *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. Weinheim: Wiley - VCH.
- Liu JP 1999 Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 13, 2091-2104.
- Melana SM, Holland JF, Dago BC. 1998 Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells *in vitro* by 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Clin Cancer Res* 4, 693-696.
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrick SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. 1997 Telomerase catalytic subunit homologues from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.
- Notson JC, Rutyszak MA, Wright WE, Shay JW, Conry DR. 1996 Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nat Biotechnol* 14, 615-619.
- Ogino H, Nakabayashi K, Suzuki M, Takahashi E, Fujii M, Suzuki T, Agunawa D. 1998 Release of telomeric DNA from chromosomes in immortal human cells lacking telomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 223-227.
- Parkinson EK, Newbold RF, Keith WM. 1997 The genetic basis of human keratinocyte immortalization in squamous cell carcinoma development: the role of telomerase reactivation. *Eur J Cancer* 33 (5), 727-734.
- Sherman SE and Lippard SJ. 1987 Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. *Chem Rev* 87, 1153-1181.
- Strahl C and Blackburn EH. 1994 The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in *Tetrahymena*. *Nucleic Acids Res* 22, 893-900.
- Strahl C and Blackburn EH. 1996 Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol* 16, 53-63.
- Wong E, Christen MG. 1999 Current status of platinum-based anticancer drugs. *Clin Rev* 99, 2451-2466.
- Yagourov YE, Chernov DN, Akinov SS, Bolshova NL, Kravtsov AA, Zelenin AV. 1996 Reverse transcriptase inhibitors suppress telomerase function and induce senescence-like processes in cultured mouse fibroblasts. *FEBS Lett* 389, 115-118.
- Yokoyama Y, Takahashi Y, Shinohara A, Liu Z, Wan X, Nawa K, Tamaya T. 1998 Attenuation of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the template region of telomerase RNA in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res* 58, 5406-5410.
- Zhang RG, Zhang RP, Wang XW, Xia H. 2002 Effects of cisplatin on telomerase activity and telomere length in BEL-7404 human hepatoma cells. *Cell Research* 12: 55-62



Might telomerase enzyme be a possible target for *trans*-Pt(II) complexes? [☆]

Donato Colangelo ^a, AnnaLisa Ghiglia ^a, Ilario Viano ^a, Homa Mahboobi ^b,
AnnaRita Ghezzi ^b, Claudio Cassino ^b, Domenico Osella ^{b,*}

^a Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Via Solaroli 17, I-28100 Novara, Italy

^b Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Corso Borsalino 54, I-15100, Alessandria, Italy

Received 30 April 2003; received in revised form 6 August 2003; accepted 18 August 2003

Abstract

Telomerase is a ribonucleoprotein polymerase that synthesizes telomeric DNA (TTAGGG) repeats. Previously, we have studied the effect on telomerase enzyme of several *cis*-platinum(II) complexes bearing aromatic amines as bulky carrier groups. All these complexes possess *cis*-geometry, according to the Chlore and Hoschele's rule. Since recent reports have dealt with the anti-cancer activity of *trans*-platinum compounds, in this study we have investigated the Farrell's prototypical *trans*-[Pt(Cl)₂(pyridine)₂], hereafter called *trans*-PtPy, in order to understand whether it may possess any anti-telomerase activity. The *trans*-PtPy has low water solubility and requires dimethyl sulfoxide (DMSO) as co-solvent, thus making the biological tests problematic. The effect of *trans*-PtPy on MCF-7 cell line concerning long-term telomerase inhibition, telomerase-related gene expression, viability, and apoptosis was evaluated. In a cell-free biochemical assay, *trans*-PtPy showed significant and dose-dependent inhibition of semi-purified telomerase. The bulk of data indicate that *trans*-PtPy acts as a non-properly selective anti-proliferative agent, although it shows an initial telomerase inhibitory effect. Telomere length reduction seems not to be the main mechanism causing the observed cell apoptosis. For comparison purpose, results on *cis*-[Pt(Cl)₂(pyridine)₂], hereafter *cis*-PtPy, are reported.
© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Telomerase; Platinum complexes; Anti-tumor chemotherapy

1. Introduction

Human telomerase is a large ribonucleoprotein enzyme that adds telomeric repeat unit TTAGGG to the 3' end of telomeric DNA, and is composed of different components: the RNA subunit hTERC (human telomerase RNA component and template), the catalytic subunit hTERT (human telomerase reverse transcriptase), and associated proteins. Telomere stabilization by the enzyme contributes to preserve unlimited cell proliferation potential [1].

A number of experimental evidences demonstrated a strong telomerase activity in most human tumours,

a mild activity in germinal cells, and undetectable levels in normal somatic tissues [2,3]. Moreover, high activity of this enzyme is usually found in metastasis. Since this enzyme is a specific tumour marker, it represents an ideal pharmacological target too. Inhibition of telomerase results in a progressive and critical reduction of telomeres. This represents a potent signal for cell proliferation blockage and for the induction of apoptosis, especially for highly proliferative cells [4].

The absence of telomerase in normal somatic cells renders the anti-telomerase approach highly specific for tumour cells and metastases. Since the treatment has to be prolonged in order to permit the telomeres to be shortened to a critical length to induce senescence and apoptosis, as a consequence of deactivation of the enzyme, an anti-telomerase therapy should employ drugs with low non-specific cytotoxicity.

[☆] This article includes materials presented at the SCI 2003 (G. Natta centenary celebration), Turin, Italy, 22–27 June 2003.

* Corresponding author. Tel.: +39 131287429; fax: +39131 287416.

E-mail address: domenico.osella@mfh.unipmn.it (D. Osella).

Up to date, several compounds have shown promising results in the inhibition of telomerase. These include peptide nucleic acid (PNA) [5], didodecyguanines (ddG) and others anti-sense oligonucleotides [6,7] retrotranscriptase inhibitors as 3'-azidothymidine (AZT) and carbovir [8–11], agents able to promote or stabilize quadruplex formation of guanine bases (G4) in telomeric DNA as derivatives of porphyrins [12,13] and anthraquinones [14] or high affinity small peptide [15] and hammerhead ribozyme against RNA components of telomerase [16,17].

The anti-cancer complex cisplatin, and its "second generation" congeners i.e. carboplatin and oxaliplatin, are the most extensively used anti-tumor drugs in the world [18,19]. Their target is DNA, since they interact with nucleobases, especially guanine (G) in N7 position [20,21]. Platinum(II) complexes could represent ideal drugs targeting telomeres themselves and the G-rich RNA portion of telomerase. We have previously investigated the effects of various *cis*-Pt(II) complexes, designed to produce an electrophilic [Pt(II)(amine)₂]²⁺ group. We have chosen sterically hindered aromatic amines, with the aim of reducing extensive DNA platination and promoting selective interaction with RNA portion of telomerase. In this screening, the water-soluble *cis*-[Pt(Cl)₂(py)(5-SO₃H-isoquinoline)] (Fig. 1) offered the best compromise in term of effective telomerase inhibition and low non-specific cytotoxicity [22,23]. Interestingly enough, a *cis*-Pt(II) complex, based on 2-(methyl-amino methyl)pyridine as the carrier group and 2,3-dibromosuccinato as the leaving group, efficiently inhibits telomerase in a human hepatoma cell line [24].

The standard structure-activity relationship of Pt(II) anti-tumor complexes suggests only the *cis* geometry as therapeutically active [25,26]. However, several biologically active *trans*-Pt complexes have been reported [27–30] and these contravene the original Cleare and Hoschele's rule [25,26]. In particular, Farrell et al. [31–34] showed that *trans*-[Pt(Cl)₂(pyridine)₂], *trans*-PtPy, is at least as active as its *cis*-isomer (Fig. 1). In general, the reaction with DNA of *cis*- and *trans*-isomers shows a

striking difference in that the *trans*-isomers (because of their geometrical conformation) cannot form 1,2-intra-strand adducts with adjacent G residues (which is the major damage inflicted to DNA by cisplatin). Mono-functional (protein associated) adducts and interstrand cross-links are believed to represent the most important interactions of the *trans*-isomers with DNA [27–30]. Therefore, to evaluate the potentiality of *trans*-Pt(II) complexes as telomerase inhibitors, we have studied the biological activity of the prototype *trans*-PtPy complex, and briefly compared with that of its *cis*-congener.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The *trans*- and *cis*-[Pt(Cl)₂(py)₂] were synthesized according to published procedures [29,30]. Their purity was verified by high performance liquid chromatography (HPLC), Raman and multinuclear NMR spectroscopy.

The *trans*- and *cis*-PtPy compounds were initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and further dilutions were made with complete medium. The concentration of cosolvent never exceeded 1% *v/v*.

All reagents were purchased from Sigma. K₂PtCl₄ was a loan from Johnson Matthey.

2.2. Cell culture

MCF-7 cells (human mammary adenocarcinoma) (ATCC HTB-22, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were used for *in vitro* experiments. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B. Cells were cultured at 37 °C in humidified 5% CO₂ atmosphere and cell monolayers were periodically screened for mycoplasma contamination.

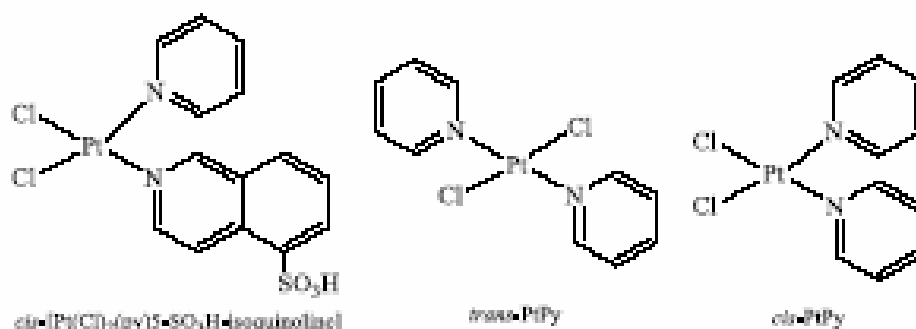


Fig. 1. Sketch of structures of the compounds.

2.3. Cell-free biochemical test

Exponentially growing cells were lysed and telomerase was extracted as described in literature [35]. Briefly, cells were trypsinized and washed with cold buffer containing 10 mM Hepes [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid, sodium salt, pH 7.4], 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, and 1 mM DTT [dithiothreitol]. The pellets were then resuspended in lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl [tris(hydroxymethyl)amino-methane hydrochloride, buffered at pH 7.5], 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA [ethylenbis(oxoethylenitrilo) tetracetic acid], 0.5% CHAPS [3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate], 10% glycerol, 0.1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF), and 5 mM 2-mercaptoethanol. Lysis was carried out for 30 min on ice and samples were separated at 20,000g for 30 min at 4 °C. Fractions containing active telomerase were immediately stored at –80 °C. Protein content was determined using BCA Protein Assay (Pierce) [37]. Aliquots were diluted in order to obtain a low chloride concentration (about 1 mM), compatible with intracellular concentration. Telomerase fractions were challenged with the complex under investigation at a final concentration ranging from 10⁻¹¹ to 10⁻⁵ M. Incubations were carried out for 15 min at 23 °C, to ensure the preservation of enzyme efficiency. After the treatment, the mixture was adjusted to obtain a final salt composition of: 20 mM Tris-HCl, pH 8.3; 1.5 mM MgCl₂; 63 mM KCl; 1 mM EGTA; 0.1 mg/ml BSA; and 0.005% Tween 20 (TRAP buffer). The residual telomerase activity was determined by TRAP assay (telomeric repeat amplification protocol).

2.4. Determination of the residual telomerase activity in cells

The effects of *trans*-PiPy on cell proliferation were correlated with telomerase activity. Sub-confluent cell monolayers were treated *trans*-PiPy at different concentration (10⁻⁹–10⁻⁶ M) for 24 h. Telomerase-containing extract was prepared as described in Section 2.3. A range of 0.5–1 µg total cellular protein was analysed for the TRAP reaction.

2.5. Telomeric repeat amplification protocol assay

The residual telomerase activity was determined by semi-quantitative TRAP assay [36]. The elongation substrate for telomerase, the synthetic oligonucleotide TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT), was added to a mixture containing 1 µg of enzyme (derived from cell-free biochemical assay or from lysate of the treated cells), 2U Taq polymerase (Roche, Germany), 50 µM dNTPmix, 2 µCi (α -³²)dCTP (Amersham, UK) and TRAP buffer. The elongation step was conducted at

23 °C for 30 min. At the end of this step, the downstream primer CX (5'-GCGGGCTTACCCCTACCC TTACCCTAACCC) was added to the reaction buffer and the amplification of the hexameric elongation products was made by polymerase chain reaction, PCR, (30 cycles; 50 °C annealing temperature). We included a true positive control (the untreated cell lysate), and two interference controls (1% DMSO, and the complex under study added only after the elongation step). The amplification reaction products were resolved by non-denaturing 8% polyacrylamide electrophoresis. Densitometry was performed using a GS-250 Molecular Imager (BioRad) with BI screen type and Phosphor Analyst 1.1 program for densitometric analysis. Internal amplification control was included (ITAS, forward 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAA AAGGCCGAGAA GCGAT, backwards 5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT) in the reaction and used for densitometric calculation.

2.6. Cell viability assay

Viability was measured by using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [38], which evaluates the reduction of the tetrazolium salt by mitochondrial dehydrogenase in metabolically active cells. Converted dye was dissolved in HCl-acidified isopropanol (0.1 N) and measured spectrophotometrically at 570 nm (background subtraction at 630 and 690 nm). All experiments were conducted at least in triplicate. The results are presented as means \pm standard deviation (SD). The percentage of growth inhibition was plotted against concentration of the compound in medium, and IC₅₀ value (defined as the concentration of drug required to reduce 50% cell viability respect to untreated control) was calculated.

2.7. Apoptosis

Cells were grown in plates and treated continuously with *trans*-PiPy 10⁻⁷ M for 14 days. The cells were passed and assayed for apoptotic pattern every 3 days. We used Hoechst 33342 and propidium iodide for double staining of nuclei and cells; nuclear morphological changes and cell membrane damage were evaluated by confocal microscopy (BioRad MRC 600 coupled to a Nikon Diaphot 200 microscope).

2.8. Reverse transcription-PCR

In order to discriminate between non-specific action of *trans*-PiPy at transcription level (thus interfering also with the synthesis of the telomerase) and its ability to interact directly with the synthesized enzyme, we analysed mRNA expression of telomerase subunits (hTERT and hTERC). Total RNA was extracted and selected sequences were retro transcribed and amplified with

specific primers (AMV-RT Sigma). We adopted 60 °C annealing temperature, 28 cycles for hTERT and hTERC; and 21 cycles for β -actin. The specific primers for the three sequences were previously described by other authors [39] the primer sets were as follows: for hTERT: 5'-TGAACCTGCGGAAGACAGTGG-3' (forward) and 5'-ATGCGTGAAACCTGTACGCT (reverse); for hTERC: 5'-TTTGTCTAACCCTAACTGAGAAG (forward) and 5'-TTGCTCTAGAATGAACGGTGGA; for β -actin: 5'-GTGGGGCGCCCCAAGCACC (forward) and 5'-CTCCTTAATGTCAACGCACGATTTC (reverse). The products were resolved with 1.5% agarose electrophoresis and the data were normalized on β -actin expression using Gel Doc 1000 for acquisition and Quantity One program 4.0.3 (BioRad) for quantification analysis.

2.9. Total cellular platinum measurements

Exponentially growing cells were treated with 10^{-7} M of the complex under study. After 1, 4, 24, and 48 h of incubation, cell monolayers were washed three times with cold saline solution, harvested and resuspended in mQ water. Aliquots of the cell suspension were sonicated for protein determination (BCA method) or mineralized with 65% HNO₃ for platinum determination. The dry material was then dissolved in 2% HNO₃ and the Pt content was measured by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). The major isotopes of platinum and indium (internal standard) were monitored at 195 and 115 m/z, respectively. Cellular platinum levels were expressed as ng Pt/mg protein.

2.10. Oil–water partition coefficient

Oil–water partition coefficient (P) was used as a mean of measuring lipophilicity of biologically active compounds; furthermore it was shown that the diffusion through biological membranes roughly depends on P . Over the years, olive oil was replaced by *n*-octanol as a reference for the lipids, and the “shake flask” method was replaced by the use of reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) employing water–methanol mixtures. We used the Minick’s method slightly modified for less lipophilic compounds [40].

3. Results and discussion

In order to evaluate the possible direct interaction between *trans*-PtPy and telomerase, we employed a semi-purified enzyme cell-free quantitative biochemical assay. Under these experimental conditions, *trans*-PtPy was able to significantly inhibit telomerase activity ranging from 15% to 38% in a 10^{-11} to 10^{-5} M concentration range. The results were calculated respect to

the untreated control and corrected for all possible interferences (as described in Section 2) (Fig. 2a). It is worthy to recall that anti-telomerase drugs so far reported seldom inhibit telomerase activity at 100% level [24].

Under identical experimental conditions *cis*-PtPy was almost inactive (Fig. 2b).

Log-phase growing MCF-7 cell monolayers was treated for 24 h with 10^{-9} – 10^{-5} M *trans*-PtPy and the residual telomerase activity after extraction of the enzyme was 15–40%, thus paralleling the cell-free test results (Fig. 3).

The observation that *trans*-PtPy induced a rapid, albeit moderate, decrease of telomerase activity within 24 h, suggests a direct interaction between *trans*-PtPy and the existing pool of telomerase, rather than interference with the synthesis of the enzyme having a turnover of about 24 h.

In order to demonstrate that the reduction of telomerase activity was not due to interference of the transcription of its components (namely, hTERT and hTERC), as found for treatment with genotoxic cisplatin [41–43], we measured their mRNA expression levels. The *trans*-PtPy 10^{-7} M after 4, 20, 30 and 48 h of continuous treatment, caused no alteration in mRNA expression of the telomerase components, compared to the untreated control. These data were obtained by Reverse transcription-PCR (RT-PCR), and normalized with the housekeeper β -actin expression (Fig. 4).

The effect of *trans*-PtPy on viability of MCF-7 cells was determined after 24 h of treatment in concentration range of 10^{-9} – 10^{-4} M (Fig. 5). By comparing these results with those shown in Fig. 3, the best compromise between significant telomerase inhibition and negligible cytotoxicity was settled at 10^{-7} M. Thus, this concentration was adopted for the long-term experiments.

The inhibition of telomerase was significant in the first 24 h (ca. 25%), but its activity was restored within 5 days of continuous treatment (Fig. 6). The proliferative capability pattern was considerably affected since a growth arrest was observed after day 7, leading to complete cells death within 15 days (Fig. 7). The treatment induced a progressive apoptotic pattern of the cells starting from day 3 (data not shown).

We also measured the intracellular content of platinum by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), as a function of *trans*-PtPy uptake during the incubation time (1–48 h) at 10^{-7} M. Since ICP-MS technique is at least one order of magnitude more sensitive than conventional atomic absorption spectroscopy (AAS), the cells can be challenged with *trans*-PtPy at a concentration lower than its IC₅₀. In Fig. 8, the cellular uptake of both PtPy isomers as well as of cisplatin is reported for the sake of comparison. In particular, after 4 h of treatment, *trans*-PtPy exhibited a maximum value of Pt accumulation, that progressively decreased, remaining at least three times higher to that of the corresponding *cis*-isomer, in tune with a previous report

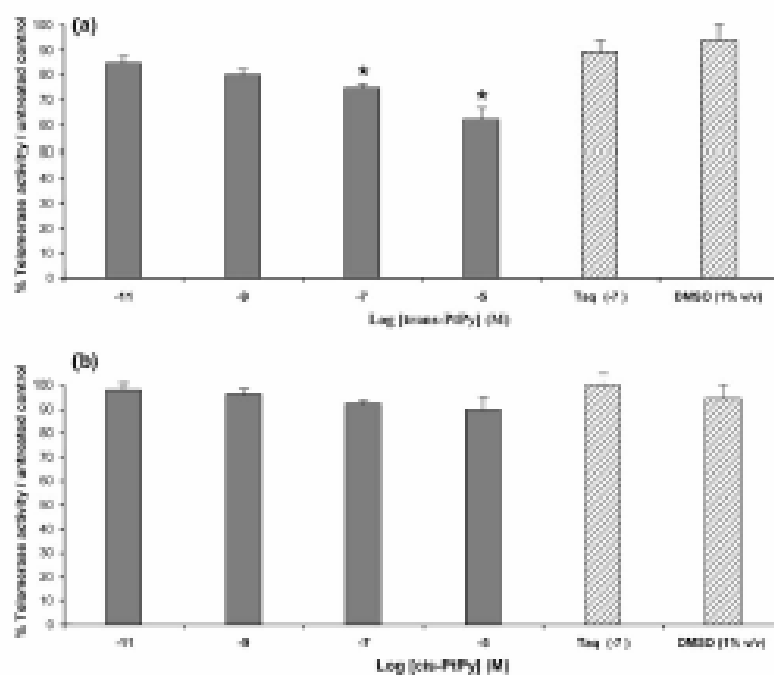


Fig. 2. Changes in telomerase activity in response to incubation of cell-free enzyme extracts with different concentrations of *trans*-PiPy (a) and *cis*-PiPy (b), respectively. Telomerase activity was measured by TRAP assay as described in materials and methods. The effects of the complex under investigation (10^{-7} M) on Tsaq polymerase, and of DMSO (1% v/v) on enzyme activity are also shown as hatched bars. The telomerase activity values were corrected for both interferences. The data are expressed as the mean of 3 independent experiments \pm SD. * $p < 0.05$ (relative to Tsaq inhibition control).

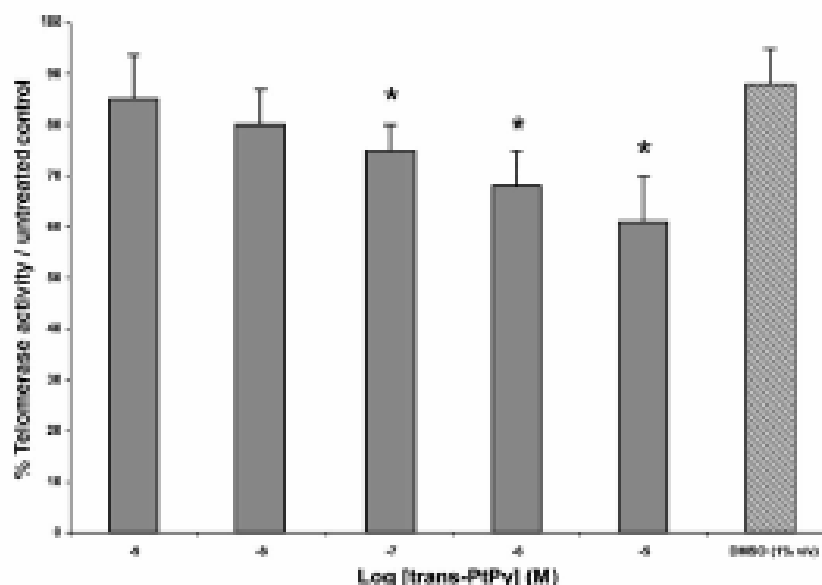


Fig. 3. Decrease in telomerase activity after 24 h treatment of the MCF-7 cells with different concentrations of *trans*-PiPy. Telomerase activity was detected by TRAP assay as described in materials and methods. The effect of DMSO (1% v/v) on enzyme activity is also shown as hatched bar. The telomerase activity values were corrected for this interference. The data are expressed as the mean of 3 independent experiments \pm SD. * $p < 0.05$ (calculated versus untreated control).

[33]. Pyridine carrier ligands render both isomers more lipophilic than cisplatin, thus justifying their major uptake by passive diffusion. The different concentration of

the two isomers can be explained by the intrinsic lower polarity of the *trans*-geometry (idealized D_{2h} symmetry) with respect to *cis*-geometry (idealized C_{2v} symmetry)

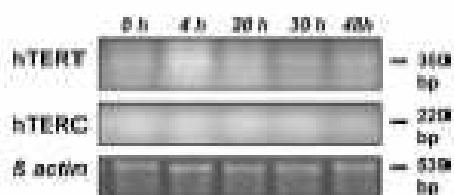


Fig. 4. Effects of *trans*-PtPy (10^{-7} M) for 4, 20, 30 and 48 h continuous treatments on the transcription of the different components of telomerase with respect to the untreated controls (0 h). The expression of the mRNA of hTERT and hTERC was measured by RT-PCR and normalized with β -actin. No differences in the expression could be appreciated.

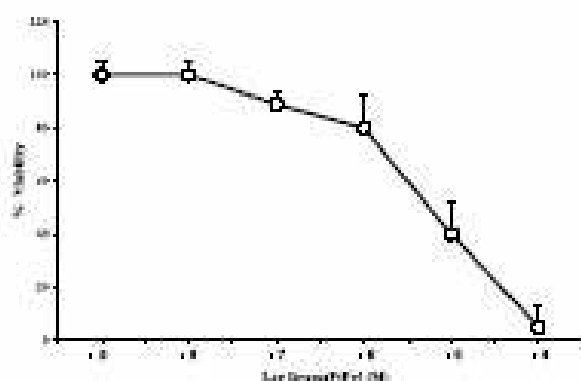


Fig. 5. Effect of various molar concentrations of *trans*-PtPy on MCF-7 cell viability after 24 h of treatment. The data are expressed as the mean of 3 independent experiments \pm SD.

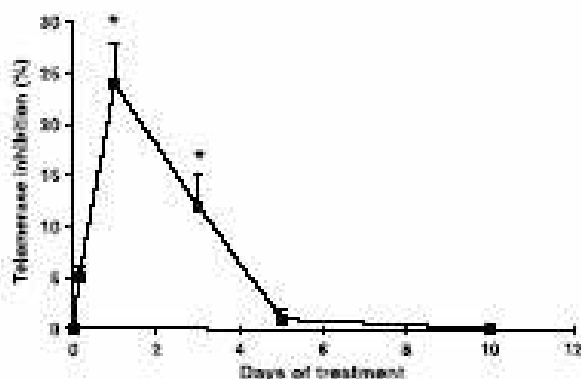


Fig. 6. Long-term effects of *trans*-PtPy (10^{-7} M) on telomerase activity. Data are expressed as telomerase inhibition relative to the untreated control, and represent the mean of 3 independent experiments \pm SD ($^*p < 0.05$). The absence of error bar on any particular point indicates that the size of the calculated SD is smaller than the symbol used for that point.

[44]. This lipophilic trend is confirmed by the *n*-octanol-water partition coefficients (P): Log $P_{o/w}$ values are -0.48 ± 0.05 ; -0.67 ± 0.06 ; -2.53 ± 0.28 for *trans*-PtPy,

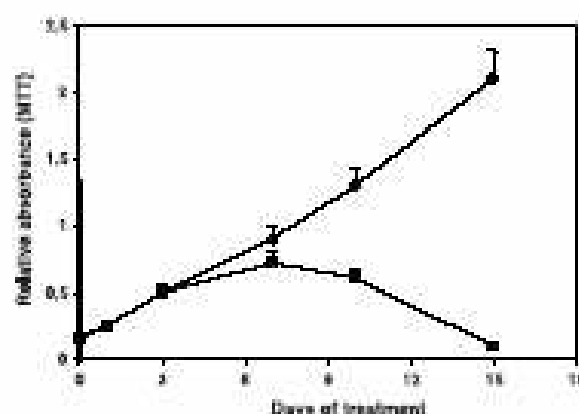


Fig. 7. Effects of *trans*-PtPy (10^{-7} M) on the growth of MCF-7 cells. Data are expressed as relative MTT absorbance of untreated control (circles) and *trans*-PtPy-treated cell monolayers (squares) at the same time points, which are the mean of 3 independent experiments \pm SD. The absence of error bar on any particular point indicates that the size of the calculated SD is smaller than the symbol used for that point.

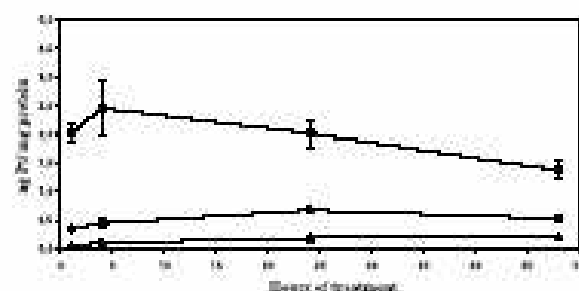


Fig. 8. Cellular uptake of the Pt complexes *trans*-PtPy (■), *cis*-PtPy (●) and cisplatin (▲) as a function of incubation time. Plotted points represent the mean \pm SD of 3 ICP-MS determinations from 2 independent experiments. The absence of error bar on any particular point indicates that the size of the calculated SD is smaller than the symbol used for that point.

cis-PtPy, and cisplatin, respectively. The observed initial reduction of telomerase activity (Fig. 6) could be explained by the rapid efflux of *trans*-PtPy into the cellular compartment. Since telomerase activity is rapidly restored after *trans*-PtPy treatment, the observed cell death cannot correlate with telomere dynamics. In fact, compounds able to reduce telomerase activity induce apoptosis as a consequence of telomere shortening and this process requires several replication cycles (for MCF-7 at least 20 days, viz. about 10 population doublings).

On the basis of the experimental results, the anti-proliferative behaviour of *trans*-PtPy (Figs. 6 and 7) cannot be accounted for by inhibition of telomerase, although a rapid and direct interaction with the enzyme pool unambiguously occurs (Figs. 2 and 3).

trans-PtPy possesses acute anti-proliferative properties on MCF-7 cells per se, as confirmed by the apoptotic pattern observed by microscopy. Its IC₅₀ value, obtained after 24 h treatment followed by 48 h of recovery with fresh complete media was $8 \pm 0.63 \mu\text{M}$, while in the same experimental conditions, *cis*-PtPy and cisplatin IC₅₀ values were 45 ± 5.2 and $28 \pm 3.1 \mu\text{M}$, respectively. This confirms once again that *trans*-complexes, bearing the opportune carrier ligands, possess biological activity [27–30], in the case of *trans*-PtPy this activity mainly corresponds to non-specific cytotoxicity.

Acknowledgements

This work was financially supported by MIUR (Roma) within PRIN2001 project. We are indebted to Johnson and Matthey (Reading, UK) for a generous loan of K₂PtCl₄. A.R.G. Thanks CIRCMSB (Bari) for research fellowship. This research was carried out in the frame of the European Cooperation Cost D20 action (Metal compounds in the treatment of cancer and viral diseases) and Cost B16 action (Multidrug resistance reversal).

References

- [1] E.K. Parkinson, R.F. Newbold, W.N. Köh, *Eur. J. Cancer* 33 (1997) 727–734.
- [2] I. Feroni, M. Turiziani, G. Masci, L. De Vecchis, J.W. Shay, E. Bonmassa, G. Graziani, *Clin. Cancer Res.* 3 (1997) 579–585.
- [3] H. Ogino, K. Nakabayashi, M. Suzuki, E. Takahashi, M. Fujii, T. Suzuki, D. Aoyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248 (1998) 223–227.
- [4] W.C. Hahn, S.A. Stewart, M.W. Brooks, S.G. York, E. Eaton, A. Kurachi, R.L. Beijersbergen, J.H. Knoll, M. Meyerson, R.A. Weinberg, *Nat. Med.* 5 (1999) 1164–1170.
- [5] J.C. Newton, M.A. Piatytsk, W.E. Wright, J.W. Shay, D.R. Corey, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 615–619.
- [6] Y. Kondo, S. Kondo, Y. Tamaki, T. Hasegawa, B.P. Bama, J.K. Cowell, *Oncogene* 16 (1998) 2243–2248.
- [7] A.I. Glukhov, O.V. Zimin, S.A. Gerdlov, S.E. Severin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248 (1998) 368–371.
- [8] C. Sisti, E.H. Blackburn, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 893–900.
- [9] Y.E. Yegorov, D.N. Chernov, S.S. Akimov, N.L. Bolshova, A.A. Kopylov, A.V. Zelenin, *FEBS Lett.* 389 (1996) 115–118.
- [10] S.M. Melani, J.F. Holland, B.G. Pogo, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 693–696.
- [11] O.A. Olivero, D.E. Gomez, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 2569–2570.
- [12] R. Wheelhouse, D. Sun, H. Han, F.X. Han, L.H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3261–3262.
- [13] E. Ishida, R.T. Wheelhouse, E. Raymond, K.K. Davidson, R.A. Lawrence, D. Sun, B.E. Winde, L.H. Hurley, D.D. Von Hoff, *Cancer Res.* 59 (1999) 639–644.
- [14] P.J. Perry, A.P. Rozka, A.A. Wood, M.A. Read, S.M. Gerwin, H.S. Dossath, J.O. Trent, T.C. Jenkins, L.R. Kelland, S. Neidle, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 4873–4884.
- [15] S.E. Hamilton, A.E. Pina, R.R. Katiapally, X. Jia, J.P. Ruter, B.A. Davies, J.W. Shay, W.E. Wright, D.R. Corey, *Biochemistry* 36 (1997) 11873–11880.
- [16] M. Foini, C. De Marco, L. Orlandi, M.G. Daidone, N. Zaffaroni, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 2137–2143.
- [17] M. Foini, G. Colella, R. Villa, S. Luicki, M.G. Daidone, N. Zaffaroni, *J. Invest. Dermatol.* 114 (2000) 259–267.
- [18] B. Lippert (Ed.), *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [19] B.K. Keppler (Ed.), *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, Weinheim, 1993.
- [20] S.E. Sherman, S.J. Lippert, *Chem. Rev.* 87 (1987) 1153–1181.
- [21] E. Wong, M.G. Christen, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2451–2466.
- [22] G. Cavignolo, L. Benvenuto, E. Baccalenti, D. Colangelo, I. Viano, D. Oella, *Inorg. Chim. Acta* 305 (2000) 61–68.
- [23] D. Colangelo, A.L. Ghiglia, I. Viano, G. Cavignolo, D. Oella, *BioMetals* 16 (2003) 553–560.
- [24] M. Furuta, K. Nomura, M. Takemura, S. Izuta, T. Murase, M. Tsuchiya, K. Yoshida, N. Taka, Y. Nishimura, S. Yoshida, *Int. J. Cancer* 104 (2003) 709–715.
- [25] M.J. Chare, J.D. Horschle, *Inorg. Chem.* 2 (1973) 187–210.
- [26] M.J. Chare, *Coord. Chem. Rev.* 12 (1974) 349–405.
- [27] N. Farrell, in: A.S. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 32, Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 603–639.
- [28] T.W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.* 166 (1997) 182–223.
- [29] J.M. Pérez, M.A. Fuentes, C. Alonso, C. Navarro-Raminger, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 35 (2000) 109–120.
- [30] G. Natile, M. Colacina, *Coord. Chem. Rev.* 216–217 (2001) 383–410.
- [31] N. Farrell, T.T.B. Ha, J.-P. Seauchal, F.L. Wimmer, S. Gros, N.P. Johnson, *J. Med. Chem.* 32 (1989) 2240–2241.
- [32] M. Van Beusichem, N. Farrell, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 634–639.
- [33] N. Farrell, L.R. Kelland, J.D. Roberts, M. Van Beusichem, *Cancer Res.* 52 (1992) 3065–3072.
- [34] Y. Zou, B. Van Houten, N. Farrell, *Biochemistry* 32 (1993) 9632–9638.
- [35] G.B. Kauffman, *Inorg. Synth.* 7 (1975) 249.
- [36] N.W. Kim, M.A. Piatytsk, K.R. Provas, C.B. Harley, M.D. West, P.L. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Wainich, J.W. Shay, *Science* 266 (1994) 2011–2015.
- [37] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallik, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Gorke, B.J. Olson, D.C. Klisak, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [38] T. Manuara, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63.
- [39] Y. Yokoyama, Y. Takahashi, A. Shinohara, Z. Lian, X. Wan, K. Niwa, T. Tamaya, *Cancer Res.* 58 (1998) 5406–5410.
- [40] D.J. Minick, J.H. Freese, M.A. Patrick, D.A. Brent, *J. Med. Chem.* 31 (1988) 1923–1933.
- [41] A.M. Barger, J.A. Doubik, D.R. Newell, *Eur. J. Cancer* 33 (1997) 638–644.
- [42] E. Raymond, D. Sun, E. Ishida, G. Margold, E. Silva, B. Winde, S. Sharma, H. Soda, R. Lawrence, K. Davidson, D.D. Von Hoff, *Br. J. Cancer* 80 (1999) 1332–1341.
- [43] R.G. Zhang, R.P. Zhang, X.W. Wang, H. Xin, *Cell Res.* 12 (2002) 55–62.
- [44] P. Colaninno, P.-L. Oriol, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1974) 1656–1659.

Synthesis and characterisation of estrogenic carriers for cytotoxic Pt(II) fragments: biological activity of the resulting complexes†

Elisabetta Gabano,^a Claudio Cassino,^a Samuele Bonetti,^a Cristina Prandi,^a Donato Colaninno,^b AnnaLisa Ghigna^b and Domenico Costi^{a*}

^a Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Vita, Università del Piemonte Orientale "M. Avogadro", Spalto Marconi 33, I-13100 Alessandria, Italy.

E-mail: domenico.costi@uni-piemonte.it; Fax: +39 0131 287416; Tel: +39 0131 287429

^b Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "M. Avogadro", via Solaroli 17, I-28100, Novara, Italy

Received 1st June 2005, Accepted 1st August 2005

First published on the web 22nd August 2005

This paper describes the synthesis and the spectroscopic characterisation of *cis*-dichloro(*N*-[4-(17-*o*-ethyl-estradiolyl)-benzyl]-ethylendiamine)platinum(II) and *cis*-diamine[2-(4-(17-*o*-ethyl-estradiolyl)-benzyl)malonate]platinum(II). These complexes were synthesised in good yield according to multi-step procedures based on the classical and non-classical Sonogashira coupling reaction, respectively. These compounds retain an acceptable degree of relative binding affinity (RBA) for the α form of estrogen receptor. Combined treatment of breast cancer cell lines, namely hormone-sensitive MCF-7 and hormone-insensitive MDA-MB-231 cell lines, indicates that these compounds maintain agonistic activity so that the potential advantage in vehiculation of the cytotoxic moiety by means of the receptor system is counteracted by the proliferative effect of the estrogenic component of the entire molecule, especially at low concentrations.

Introduction

Cisplatin and its second-generation analogues, namely carboplatin and oxaliplatin, have afforded good results in the treatment of solid tumours, especially testicular, ovarian and colon cancer (oxaliplatin only). However, there are several major drawbacks to their clinical use, such as poor selectivity between malignant and normal cells (resulting in severe side effects), and the tendency to provoke chemoresistance. The strategy of drug targeting and delivery could be applied to tumours that exhibit biochemical differences from normal tissue. Tumours possessing hormone receptors represent a large class of malignancies that includes breast, endometrial and prostate cancers. Given that 60–70% of mammary carcinoma express estrogen receptors, at least at the early stage, an estrogen-like ligand might prove useful in delivering cytotoxic agents, in particular the cisplatin [Pt(II)X₂] fragment (X = leaving group: halide or carbonylate), to such estrogen-responsive (ER+) neoplasms.^{1,2} Provided the relative binding affinity (RBA) for the estrogen receptor of the resulting Pt(II)-estrogen complex is high enough, the receptor system would selectively recognise it. Furthermore, if the cytotoxic complexes exhibit agonistic activity, the receptor would vehiculate and approximate them to key sequences of genomes in mammary tumour cells.³ This would require a coordinating arm capable of linking the PtX₂-unit to the estrogen carrier. In principle, a suitable arm could consist of a rigid spacer ending in a diamine functionality (ethylene diamine, piperazine, etc.). In order to link the nitrogen to the arm, several reactions are available, but they often require that the -NH₂ groups be protected (e.g. with *tert*-butyl carbonates, Boc). Thus, the procedure involves multi-step reactions, which generally afford low yields. The use of tertiary amines is therefore generally preferred, since it does not call for protection or deprotection steps. However, the substitution in the amine carrier groups diminishes the cytotoxic activity of the *cis*-Pt(II)X₂-moiety.⁴ Moreover, after hydrolysis of the PtX₂-unit, the necessary

reaction between the resulting estradiol-*arm*-Pt(II) nucleophile and DNA can be obstructed by the steric encumbrance.⁵

Alternatively, a [Pt(NH₃)₂]²⁺ moiety could be delivered to DNA by forming the same *cis*-Pt(NH₃)₂(Cl)(O) intrastand adduct that cisplatin does. This can be achieved by tethering the [Pt(NH₃)₂]²⁺ moiety to a coordinating arm ending in a leaving group, such as the malonate group.⁶ It has been reported that dicarboxylate ligands strongly increase the solubility of the corresponding complexes.⁷ We are aware that the hydrolysis of malonate complexes at physiological pH is enormously slower *in vivo* than that of corresponding chloride complexes, however, enzymatic removal seems to be very efficient *in vivo*.^{8,11}

17-*o*-Ethyl-estradiol represents a good starting molecule by virtue of its reactive acetylene hydrogen atom, which can easily be linked to a secondary amine or a dicarboxylate group. Considerable effort has been devoted to optimizing the reactions of organic frameworks bearing alkyne moieties. Among these, we have chosen classical Sonogashira⁹ and non-classical Sonogashira¹⁰ metal-catalysed carbon-carbon bond-forming reactions with terminal alkyne and aryl halides.

In this paper we report on the synthesis, characterisation and biological activity of two-ethylenediamide-ligands and their corresponding Pt(II)-complexes (Fig. 1).

Results and discussion

Ligand synthesis

Synthesis of *N*-[4-(17-*o*-ethyl-estradiolyl)-benzyl]-ethylene diamine, **4**. Originally introduced by Inhoffen and Holberg in 1938,¹² the majority of the synthetic approaches to ethylenediamide analogues have relied on the addition of acetylide to the resident ketone at C-17 in estrone. From a retrosynthetic perspective, we envisioned installation of the five-carbon spacer late in the synthesis (Scheme 1), thereby permitting construction of ligand **4** from the precursor 17-*o*-ethyl-estradiol. Accordingly, assembly of the requisite five-carbon linker would entail coupling of *N*-[4-(*tert*-butoxy)-*N,N'*-di-Boc-ethyl-enediamine] (**2**) with 17-*o*-ethyl-estradiol, exploiting a Cumar-Hock-Sonogashira C(sp²)-C(sp) cross-coupling reaction.^{13,14} Our starting point

† Electronic supplementary information (ESI) available: NMR spectra for ligands **4** and **6** and complexes **7** and **8**. See <http://dx.doi.org/10.1039/b557718a>

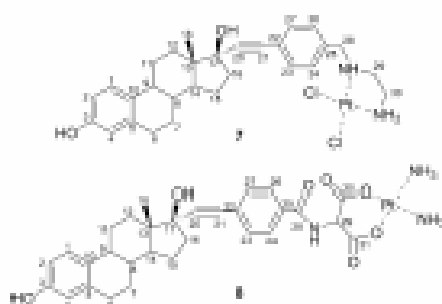
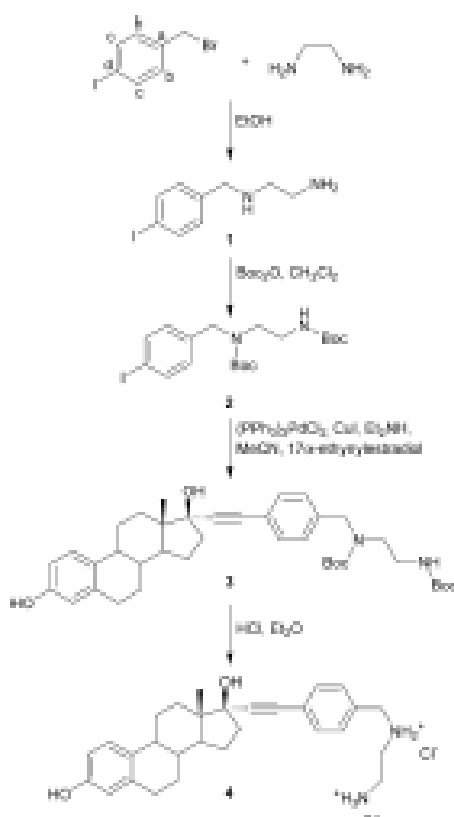


Fig. 1 Sketch of structures of the platinum complex *cis*-dichloro(*N*-(4-(17 α -ethynyl-estradiol)(benzyl)ethylsulfamoyl)benzamide)platinum(II) (7), and *cis*-dichloro(2-(4-(17 α -ethynyl-estradiol)(benzyl)amino)malonate)platinum(II) (8).

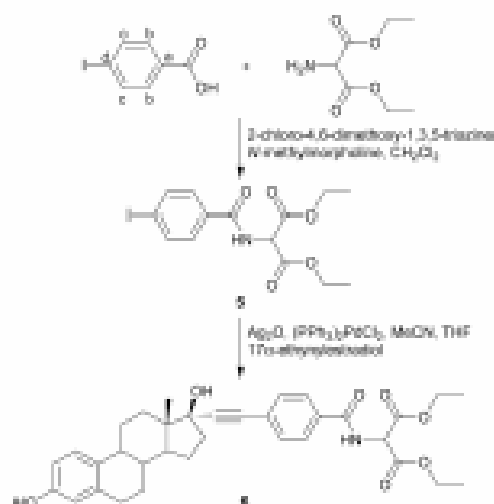


Scheme 1 Reaction pathway for the synthesis of *N*-(4-(17 α -ethynyl-estradiol)(benzyl)ethylsulfaminate) (4).

for 4 was the commercially available 4-iodobenzyl bromide. This reacted with excess ethylenediamine² in EtOH to provide the corresponding *N*-(4-iodobenzyl)ethylsulfaminate, which, by protection with di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc₂O) in CH₂Cl₂, afforded 2. Sonogashira reaction of 2 with 17 α -ethynyl-estradiol in the presence of (PPh₃)₂PdCl₂, CuI, Et₃NH in MeCN gave *N*-(4-(17 α -ethynyl-estradiol)(benzyl)-*N,N'*-di-*tert*-butylethylsulfaminate (3), and subsequent removal of the Boc groups (HCl in Et₂O) gave the required internal alkyne 4 as a hydrochloride with an overall yield of 42% (Scheme 1).

Protection of the amino groups in *N*-(4-iodobenzyl)ethylsulfaminate was imperative for the alkyne coupling reaction in order to avoid competing *ortho*-palladation of the substrate.³

Synthesis of 2-[4-(17 α -ethynyl-estradiol)-benzoylamino]-malonic acid diethyl ester, 6. The steroid-malonic ester 6 was prepared starting from commercially available diethyl 2-aminomalonate hydrochloride. Regarding the connecting arm between the 17 α -ethynyl-estradiol moiety and aminomalonic, we chose to insert a rigid, suitably functionalized, aromatic structure. 4-Iodobenzoic acid proved to be a good starting material. The first step was the synthesis of a peptide bond between aminomalonic acid and 4-iodobenzoic acid. Although it is generally accepted that carbodiimides are the most efficient condensing agents, the formation of by-products prompted us to choose 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT) as a carboxylic acid activator.⁴ The best result in the activation stage was achieved by adding *N*-methylmorpholine dropwise to a solution of diethyl 2-aminomalonate and 4-iodobenzoic acid in CH₂Cl₂ at -5 °C. The pure 2-(4-iodobenzoylamino)-malonic acid diethyl ester 5 was obtained after recrystallization with a yield of 71.5%. The following synthetic step was meant to have been a Sonogashira cross-coupling reaction between the intermediate 5 and 17 α -ethynyl-estradiol. Unfortunately, under classical Sonogashira reaction conditions (CuI, allylamine as the solvent or in stoichiometric amounts, and *B*-complex) only a trace amount of the expected product was recovered. The literature²² indicates that copper(I) iodide as co-catalyst in the presence of oxygen induces a homocoupling reaction (Glaser-type reaction)²³ of terminal alkynes; moreover, the presence of the amine may cause deprotonation of the malonic acidic proton and generation of palladium anionic species.²⁴ Copper-free methodologies employing amines as solvents have been described.²⁵ The first described copper- and amine-free procedure involves the use of stoichiometric amounts of silver(I) oxide for aryl iodide.²⁶ In a typical procedure, malonic ester 5 (1.5 mmol) and 17 α -ethynyl-estradiol (1.5 mmol) were dissolved in THF (15 mL), (PPh₃)₂PdCl₂ (5%) and Ag₂O (1.5 mmol) were added, and the reaction mixture was warmed to 60 °C. Routine workup and purification of the crude mixture by column chromatography afforded the expected coupling product 6 with a yield of 61.1% (Scheme 2).



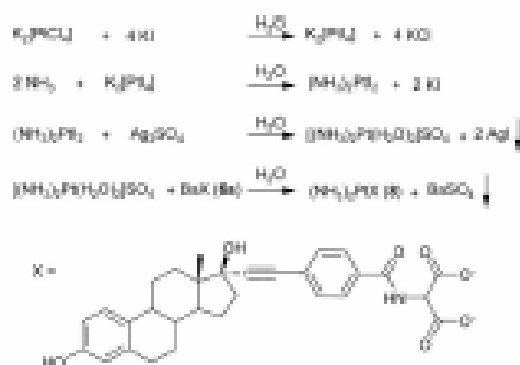
Scheme 2 Reaction pathway for the synthesis of 2-[4-(17 α -ethynyl-estradiol)-benzoylamino]-malonic acid diethyl ester, 6.

Platinum coordination

Synthesis of *cis*-dichloro-*N*-(4-(17 α -ethynyltestadiolyl)-benzoylamino)platinum(II), **7**. Compound **7** was obtained in good yield by reaction of $K_2[PtCl_4]$ and **4** according to Miller's procedure for platinum coordination.²⁸

$K_2[PtCl_4]$ was added to an aqueous solution of *N*-(4-(17 α -ethynyltestadiolyl)-benzoylamino)amine dihydrochloride at about 60 °C. During the reaction, the pH was kept at ca. 6.0 by the dropwise addition of 0.1 N NaOH. The pH value is important at this stage of the reaction: it must be high enough to deprotonate the diamine ligand, thus making it suitable for platinum coordination, but not so high as to cause the formation of inactive hydroxo-Pt species.

Synthesis of *cis*-diamino[2-(4-(17 α -ethynyltestadiolyl)-benzoylamino)malonate]platinum(II), **8**. The synthesis of the hormone-malonate platinum(II) complex **8** is shown in Scheme 3. The complex was prepared by reacting NH₃ with $K_2[PtCl_4]$, generated *in situ* according to Dinn's method,^{27,28} after which iodide ions were replaced with water by means of Ag_2SO_4 . The treatment of the estradiol-substituted malonic ester **6** with aqueous barium hydroxide gave the corresponding barium salt (**8a**). The reaction of this barium salt with an aqueous solution of *cis*-diamminodisulphateplatinum(II) sulfate yielded the final complex **8**.²⁹



Scheme 3 Platinum coordination of 2-(4-(17 α -ethynyltestadiolyl)-benzoylamino)-malonate barium salt (**8a**).

Spectroscopic characterisation

The molecular formula of each compound was verified by comparing the molecular ion peak in the DCl or ESI mass spectrum with the correct isotope distribution. The ESI-MS spectrum of carboxylate complex **8**, run in water-methanol (1 : 1), showed the molecular ion peak $[M + H]^+$. The dichloride complex **7** featured an ESI-MS spectrum in water-DMSO (3 : 1) whose main signal was attributable to the $[M - Cl + DMSO]^+$ ion.²⁹

As a general trend, the ¹H and ¹³C chemical shifts in the complexes were shifted to lower field when compared to free ligands, and atoms closer to the Pt centre were more strongly affected. 18-CH₃ appeared between 0.4 and 0.9 ppm in the ¹H NMR spectra of the complexes as well as of the parent hormone. The aliphatic skeleton protons were spread between 1.0 and 2.8 ppm, whereas the aromatic protons 1-H, 2-H and 4-H formed an AMX pattern (²*J*₁₂ 8.4, ³*J*₁₄ 2.6 Hz) between 8.0 and 8.1 ppm and the aromatic protons of the linking arm appeared between 7.8 and 7.2 ppm.^{34,35}

In the ¹³C spectra the aliphatic carbons were spread between 12 and 52 ppm; whereas aromatic carbons appeared between 112 and 157 ppm. The signals of C-20, C-21 and C-17 appeared from 98 to 74 ppm. The assignment of resonances due to C-8 and C-12 in (CD₃)₂SO was not possible owing to their partial overlap with the carbon signals of the solvent.

The purity of the complexes was further verified by ¹⁹⁵Pt NMR spectroscopy. Since the δ_P chemical shift depends on the electronic density on the Pt atom, it is sensitive to the nature of the bound donor atoms and each species will show a different signal.

Since complex **7** was not soluble in water, the spectrum was measured in (CD₃)₂SO. The only signal detectable after accumulation was observed at -3307 ppm; this signal was attributable to the chloro(dimethylsulfoxide)(*N*-(4-(17 α -ethynyltestadiolyl)-benzoyl)-ethylenediamine)platinum(II) species. This substitution of DMSO for chloride in **7** is in tune with MS results, and is typical of all Pt(DMSO) species.²⁹

As far as **8** is concerned, as previously described by Gibson *et al.*,²⁹ the presence of the nitrogen atom in the α position relative to the malonate unit promotes a coordination isomerism of the (O,O')-chelate **8** to the (N,O)-chelate **8** (see Fig. 2). Indeed, Gibson described the reaction between *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ and 2-amino malonate in water and showed that the kinetic product (O,O')-chelate was first formed and then quickly isomerized to the thermodynamically stable (N,O)-chelate. Complex **8** is barely soluble in water; when its ¹⁹⁵Pt spectrum was run in (CD₃)₂O at room temperature, it exhibited only one signal at -1718 ppm. The spectrum in CD₃OD at rt shows two peaks at -1737 ppm and -2171 ppm attributable to the (O,O')-chelate **8** and the (N,O)-chelate **8**, respectively, in a 6 : 1 ratio. With the hormonal ligand, the conversion is slower because the nitrogen responsible for this isomerization is less suitable as an anionic nitrogen for platinum coordination than the amine one. The steric hindrance further inhibits the isomerization. Thus, the ratio between the (O,O')-chelate **8** and the (N,O)-chelate **8** is still in favour of the former.

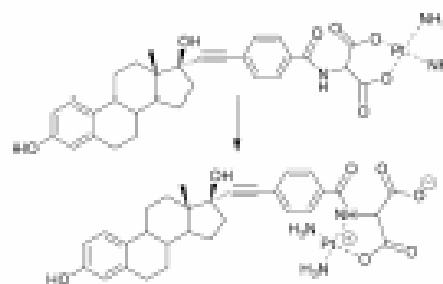


Fig. 2 Coordination isomer of **8**.

A similar behaviour has also been reported for some macro-molecular platinum complexes having the same coordination geometry.^{34,35}

This kind of isomerization is not dependent. According to the data reported by Lee *et al.*,²⁹ the coordination mode of the anionic ligand depends on the hydrogen bonding ability of the solvent. Since the (N,O)-chelate has a zwitterionic form, the hydrogen bonds between a protic solvent molecule and these zwitterionic dipole seem to be responsible for its stabilisation. Methanol has a hydrogen bonding ability that allows the (O,O')-chelate mode to coexist at room temperature. The absence (N,O)-chelate is a tri-amine cationic platinum complex, usually considered inactive as an antitumour agent. Holm *et al.*,²⁷ however, showed a non negligible antitumour activity for tri-amine cationic Pt(II) complexes.

Structure optimization by molecular mechanics (MM)

Although we have not obtained X-ray quality crystals of **7** and **8**, a reasonable model of their structures was obtained using the HyperChemTM Package. It was constructed by exploiting the published X-ray structures of the steroidal skeleton and of platinum(II) complexes having the same coordination sphere.

The starting structure of 17 β -estradiol³⁶ with the -C \equiv C-pPh-CH₂-spacer, whose bond distances and angles were adjusted to typical values,

The structure of the coordination sphere was derived from that of *cis*-[dichlorobis(2-ethoxyethylamino)platinum(II)]²⁸ replacing one of the -NH₂ protons with the methylene group of the spacer. The resulting structure was energy-minimized in the Amber force field using a steepest descent algorithm, leaving the platinum coordination geometry unchanged.

The starting point for the structure of (NCO)-chelate **8** was the same. For the platinum-containing moiety the structure of *cis*-[diamminechloro-platinum(II)]²⁸ was chosen as a model. One of the -CH₃ protons was replaced with the amide group of the -C(=O)-pPt-CO-NH-spacer. A force adjusting bond distances and angles to the normal value, the resulting structure was energy-minimized as described above.

Although this procedure is rather approximate, given that the metal centre is a fixed unit, the method provides a reasonable model of the overall molecular geometry. The resulting structures are shown in Fig. 3.

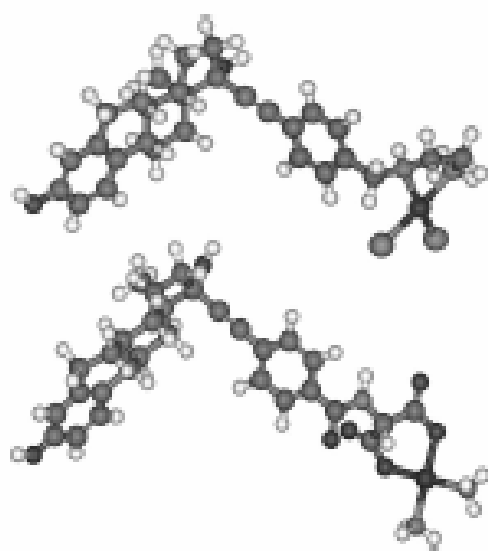


Fig. 3 Optimized structures of **7** and **8**.

As immediately visible in the optimized structures, the rigid spacer keeps the platinum core well away from the two -CH groups responsible for binding to the receptor. Interestingly enough, the MM model of the (NCO)-chelate **8** again shows that the Pt unit is still far away from the estrogen domain.

Biochemical and biological results

We have measured the relative binding affinity (RBA) of estradiol bio-ligands **4** and **6** for the α form of the estrogen receptor (ER α), which indicates whether or not these compounds could still be recognized by this receptor (these measurements were performed in a competitive radioreceptor binding assay using lamb uterine cytosol as the source of ER α and [³H]estradiol as a tracer) (Table 1). We have also determined the lipophilicity of **4** and **6** (octanol/water partition coefficient, log *P*_{ow}; this value, which is determined by means of HPLC, is a rough measure of the drug lipophilicity, related to its ability to cross cell membranes) (Table 1).

Finally, we have studied the effects of the bio-ligands **4** and **6**, and the corresponding Pt(II) complexes **7** and **8**, on the proliferation of a human mammary adenocarcinoma cell line (MCF-7), that expresses estrogen receptor (ER+) and responds to estrogen activity. As control for estrogen activity we have employed a hormone-sensitive human mammary MDA-MB-231 cell line (Figs. 4 and 5).

Table 1 RBA and log *P*_{ow} values

Compound	RBA (%)* (RBA)	Log <i>P</i> _{ow} [†]
17 β -Estradiol	100 [‡]	3.14 \pm 0.07
17 α -Ethinylestradiol	70 [‡]	3.25 \pm 0.09
4	1.9 \pm 1.1	2.21 \pm 0.04
6	5.1 \pm 1.4	4.97 \pm 0.08

[‡] The experimental values are means \pm SD of 3 independent experiments.

[†] By definition. (Ref. 4)

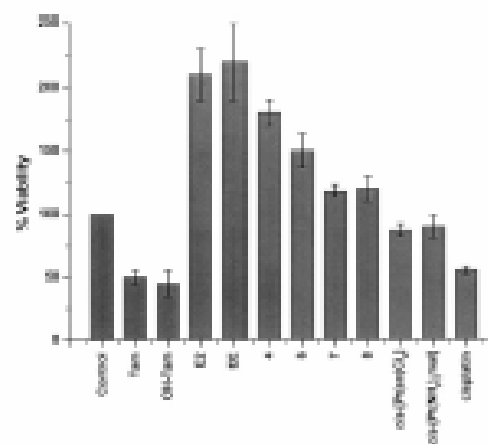


Fig. 4 Effect on MCF-7 cell viability. Cells were challenged with compounds under study at 1 μ M concentration for 5 day continuous treatment.

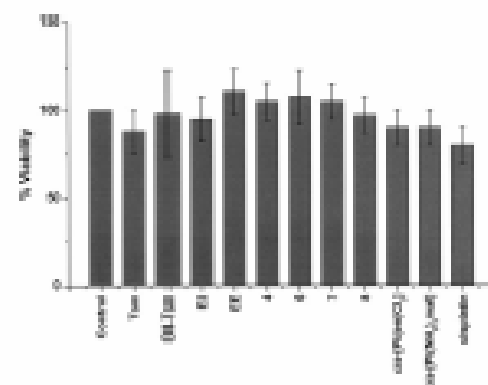


Fig. 5 Effect on MDA-MB-231 cell viability. Cells were challenged with compounds under study at 1 μ M concentration for 5 day continuous treatment.

The RBA values indicate that compounds **4** and **6** do interact with the receptor, although their affinity is moderate as compared to 17 α -ethinylestradiol, thus suggesting that they may behave as carrier for Pt delivery to the nucleus.

The RBA value for **4** was somewhat disappointing (only 1.9%). However, this result finds an explanation in the modelling study by Foy *et al.*²⁹ on the estrogen receptor binding site. This study considered the affinity of a series of 17 α -arylestradiol derivatives, demonstrating that only the *p*-NH₂ substituent dramatically reduced the RBA values. The protonated amino hydrophilic group underwent an electrostatic repulsion, likely due to a methionine group, in the active site of the estrogen receptor.

We have recently shown for a similar series of 17 α -ethynyl-estradiol-carrier binding in ethylenediamine or piperazine, that their coordination by a PX_2 -moiety, which engages the lone pair present on nitrogen ligands, thus preventing their protonation, leads to a significant increase in the RBA.¹⁰ On the contrary, the replacement for 8 of two Et groups with the $[Pt(NH_3)_2]$ ²⁺ moiety should lead to a drop in RBA.

In this context, an estimated RBA value of both compounds 7 and 8 is about 2%, in the same order of magnitude as the potent selective estrogen receptor modulator (SERM) tamoxifen (Tam).¹¹ Thus, we have indirectly evaluated the affinity of complexes 7 and 8 for the receptor on the basis of their proliferation effect on ER+ and ER- cell lines, alongside that of the corresponding ligands and reference compounds. Interestingly enough, the estimated RBA values as well as the effect on cell growth are higher for complexes 7 and 8 with respect to those of previously reported 17 α -ethynyl-estradiol-ethylenediamine- $Pt(II)$ -malonate complex.¹⁰ The presence of an aromatic spacer in the arm between estradiol and ethylenediamine moiety improves their biological activity. This is in tune with previous studies from Berabé *et al.*^{12,13} on triphenylethylene- and estradiol- $Pt(II)$ complexes having 6–10 aliphatic carbon atom spacer.

The effect of compounds 4–8 on MCF-7 growth was compared to that of 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethynyl-estradiol (EE), the reference estrogens, tamoxifen (Tam) and hydroxytamoxifen (OH-Tam), two SERMs, *cis*- $[Pt(en)Cl_2]$ (*en* = ethylenediamine) and *cis*- $[Pt(NH_3)_2(mal)]$ (*mal* = malonate), the model complex, and cisplatin as a reference antiproliferative agent, all at a concentration of 1 μ M (Fig. 4). The bars in the histogram show the inhibitory (for Tam and OH-Tam) or proliferative (for E2, EE, 4 and 6) effect of the compounds relative to the control.

As expected, all the compounds under study, except those containing the cytotoxic $Pt(II)$ moiety, have no significant effect on the MDA-MB-231 cell line (Fig. 5). The proliferative effect observed on MCF-7 cells is therefore clearly a hormonal effect mediated by the estrogen receptor.¹⁴

As far as non-hormonal $Pt(II)$ complexes are concerned, the cytotoxic effect of *cis*- $[Pt(en)Cl_2]$, *cis*- $[Pt(NH_3)_2(mal)]$ and cisplatin is lower for MDA-MB-231 with respect to that of the MCF-7 cell line, as previously reported in the literature.¹⁵

Returning to the question of viability of the MCF-7 cell line, it is disappointing that complexes 7 and 8 showed no advantage in terms of inhibition of proliferation over the corresponding model complex *cis*- $[Pt(en)Cl_2]$, *cis*- $[Pt(NH_3)_2(mal)]$ or cisplatin itself. This failure might be attributable to several factors: (i) the decrease in cytotoxicity due to the steric effect of chelating arms necessary for linking the $Pt(II)$ -moiety to the estrogen;¹⁶ (ii) the isomerization from $(\Delta\Delta)$ to $(\Lambda\Lambda)$ -chelate forms in 8; (iii) the limited number of receptors able to act as a shuttle for the estrogen-platinum intracellular adduct (see bio-stoichiometry in the experimental section) and (iv) most importantly, the estrogenic (agonistic) activity of the overall assembly. Indeed comparison of the effects of the panel of compounds on ER+ cells clearly indicates that complexes 7 and 8 are recognized by the receptor as well as the ligands 4 and 6, and all of them produce an overall proliferative effect. This is because the estrogenic effect generally operates at a nanomolar level,¹⁷ whereas a classical cytotoxic effect for cisplatin-like complexes is usually comprised in the range 1–10 μ M.

Indeed, at 0.1 μ M concentration the hormonal $Pt(II)$ complexes, namely 7 and 8 had an overall proliferative effect (Fig. 6).

In a hypothetical *in vivo* model, it is reasonable to suppose that, due to pharmacokinetic reasons, the cancer cells are exposed to optimal cytotoxic levels of these compounds only for short periods whereas, until the plasma concentration drops to 0, the stimulatory effects of the compounds (due to lower concentration) will be prevalent.

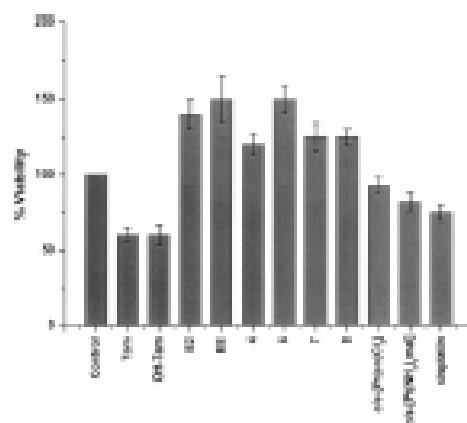


Fig. 4 Effect on MCF-7 cell viability. Cells were challenged with compounds under study at 0.1 μ M concentration for 5 day continuous treatment.

We treated both cell lines with a mixture at equimolar concentrations of estradiol (the natural ligand for ER α) and cisplatin, the most active platinum drug. The data obtained from this combination indicates that the cytotoxic effect of cisplatin is overcome by the growth stimulation of estradiol at concentrations lower than 10⁻⁷ M (Fig. 7). We are aware that the two compounds probably differ in pharmacokinetics and cellular uptake, but the gross effect appears nonetheless to be counteractable. It is important to recall that the treatment of cells with the mixture of both compounds at 10⁻⁷ M (data not shown) had a negative effect on cell viability (all the cells died within 5 days). While this concentration corresponds to the optimal activity for cisplatin, the same concentration represents an amphiphilic condition for E2, leading to strong interference of growth.¹⁸

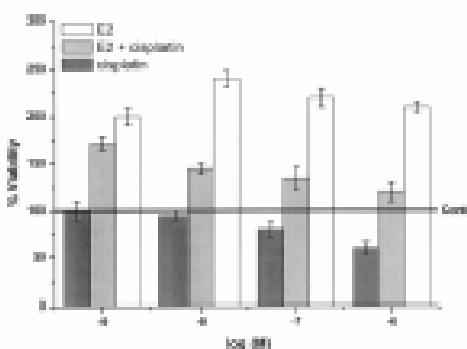


Fig. 7 Effect of the equimolar combination of E2 and cisplatin on MCF-7 cell viability (5 day continuous treatment).

Similar investigations on the action of both steroidal hormones and cisplatin on breast cancer cells have been made by Lippard *et al.*^{19,20} The aim of these investigations, as well as the concentrations and treatment times involved, were profoundly different from those of the present study.

Short exposure periods of MCF-7 cells to low concentrations of E2 (ca. 10⁻⁷ M for 4 h) were shown to induce high mobility group (HMG) protein overexpression and, hence, protection of the cisplatin-DNA adduct by the nucleotide excision repair (NER) system. In this short time span, it was impossible for E2 to induce significant growth stimulation, and the overall result was an increased sensitivity of the hormone-treated cells to cisplatin.

Experimental

General procedures

$K_2[PtCl_4]$ was purchased from Johnson Matthey and Co. 17 α -Ethinyltestradol was obtained from ICN Biomedicals. Deuterated solvents were bought from Burzio-top, France. All other chemicals were obtained from Aldrich and used without further purification. The NMR spectra were recorded at 25 °C on a JEOL Eclipse Plus spectrometer operating at 400 MHz (1H), 100.5 MHz (^{13}C) and 85.9 MHz (^{31}P) with a spectral window of 1200 ppm. 1H and ^{13}C NMR chemical shifts were reported in parts per million referenced to solvent resonances, for D_2O measurements, δ_0 methanol was added as a ^{13}C internal reference. ^{31}P NMR spectra were recorded using a solution of $K_2[PtCl_4]$ with KCl as an external reference. The shift for $K_2[PtCl_4]$ was adjusted to -1628 ppm from $Na_2[PtCl_4]$ ($\delta = 0$ ppm).

DCl-MS spectra of the ligands were recorded on a Finnigan-MAT95Q instrument with magnetic and electrostatic analysis. Isobutane was used as the reagent gas at 0.5 mbar pressure. The ion source temperature was kept at 30 °C, the electron multiplier current at 0.2 mA, and the electron energy at 200 eV. Positive ion spectra were collected. ESI mass spectrometry, due to the soft ionization, was chosen as an efficient method for the characterization of platinum complex in solution.¹⁹ These mass experiments were conducted by means of Finnigan Thermoquest LCQ DUO ion trap mass spectrometer equipped with an ESI ion source. High purity nitrogen was used as a nebulator (operating pressure at 80 of the arbitrary scale 0–100 of the instrument). The ESI probe tip and capillary potential were set at 4.50 kV and 1000 V, respectively. The heated capillary was set at 270 °C. The mass spectrometer was operated in positive ion full-scan mode. Molecular ion peaks were assigned from the *m/z* values and from the simulated isotope distribution patterns.

Ligand synthesis

Synthesis of *N*-(4-(17 α -ethynyltestradolyl)-benzyl)-ethylenediamine, 4.

a) Synthesis of *N*-(4-iodobenzyl)-ethylenediamine, 3. 4-Iodobenzyl bromide (2.86 g, 9 mmol) was dissolved in EtOH (20 ml). A great excess of ethylenediamine 99% (47 mmol, 3.2 ml) was dissolved in the same solvent (10 ml) and added to the first solution while being stirred under a nitrogen atmosphere in the dark. After 24 h the resulting pale yellow mixture was filtered and dried under vacuum, and the oily residue was partitioned between benzene and water. The organic phase was dried over Na_2SO_4 and concentrated to yield *N*-(4-iodobenzyl)-ethylenediamine as a light yellow oil which was used in a subsequent step without further purification. δ_0 (400 MHz; $CDCl_3$): $MnSO_4$ 7.49 (2H, d, $^1J_{NH}$, 8.2, 2 \times PhAr), 6.95 (2H, d, $^1J_{NH}$, 8.2, 2 \times PhAr), 3.59 (2H, s, Ph-C CH_2 -N), 2.63 (2H, s, $^1J_{NH}$, 5.8, N-C CH_2 -CH $_2$ -N), 2.52 (2H, s, $^1J_{NH}$, 5.8, N-CH $_2$ -C CH_2 -N), 1.42 (3H, s, NAr and NAr); δ_C (100.5 MHz; $CDCl_3$): $MnSO_4$ 140.25 (PhAr), 137.34 (2 \times PhAr), 130.12 (2 \times PhAr), 92.23 (PhAr), 53.20 (Ph-CH $_2$ -N), 51.82 (N-CH $_2$ -CH $_2$ -N), 41.71 (N-CH $_2$ -CH $_2$ -N). DCl-MS: *m/z*: 277.0207 ($[M + H]^+$, 100%), 278.0200 (10.70); calcd for $C_8H_{10}IN_2$: 277.0202 ($[M + H]^+$, 100%), 278.0202 (10.68). Elemental analysis calcd for $C_8H_{10}IN_2$: C 39.15; H 4.75; N 10.15; found: C 39.2; H 4.8; N 10.2%.

b) Synthesis of *N*-(4-iodobenzyl)-*N,N'*-di-*tert*-butylethylenediamine, 2. A solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc $_2O$, 2.8 g, 12.8 mmol) in CH_2Cl_2 (20 ml) was added to a solution of the above compound in CH_2Cl_2 (3 ml). The reaction mixture was milky at first and then turned a clear yellow. After 24 h stirring at rt, the mixture was dried under vacuum to obtain an oil. Precipitation was induced by *n*-hexane, resulting in an abundant white precipitate 2 (2 g, 42%). δ_0 (400 MHz; $CDCl_3$): $MnSO_4$ 7.69 (2H, d, $^1J_{NH}$, 8.2, 2 \times PhAr), 7.10 (2H, d, $^1J_{NH}$, 8.2, 2 \times PhAr), 5.84 (1H, s, NAr), 4.44 (2H, s, Ph-C CH_2 -N), 3.30 (2H, m, N-

C CH_2 -N), 3.20 (2H, m, N-CH $_2$ -C CH_2 -N), 1.45 (9H, s, 3 \times BocC CH_3), 1.40 (9H, s, 3 \times BocC CH_3); δ_C (100.5 MHz; $CDCl_3$): CO 156.07 (BocC=O), 155.76 (BocC=O), 139.43 (PhAr), 137.80 (PhAr), 130.02 (2 \times PhAr), 91.97 (PhAr), 79.57 (BocC), 78.15 (BocC), 50.42 (Ph-C CH_2 -N), 46.69 (N-C CH_2 -CH $_2$ -N), 39.27 (N-CH $_2$ -CH $_2$ -N), 28.12 (3 \times BocC CH_3), 28.02 (3 \times BocC CH_3). DCl-MS: *m/z*: 477.1241 ($[M + H]^+$, 100%), 478.1238 (22.02), 479.1252 (3.15) ($[M + H]^+$); calcd for $C_{24}H_{34}IN_2O_6$: 477.1250 ($[M + H]^+$, 100%), 478.1250 (21.89), 479.1250 (3.11). Elemental analysis calcd for $C_{24}H_{34}IN_2O_6$: C 47.9; H 6.1; N 5.9; found: C 48.0; H 6.15; N 5.9%.

iii) Synthesis of *N*-(4-(17 α -ethynyltestradolyl)-benzyl)-*N,N'*-di-*tert*-butylethylenediamine, 3. In a 100 ml three-necked round-bottomed flask, 17 α -ethynyltestradol (1.25 g, 4.23 mmol) and 2 (2 g, 4.9 mmol) were dissolved in MeCN (28 ml) and H_2 NH (40 ml). CuI (3% mol/mol respect of the halide and the alkyne, 25 mg, 0.13 mmol) was added to this pale yellow mixture and the mixture turned orange-pink. When $(PPh_3)_2PtCl_2$ (2%, 39 mg, 0.084 mmol) was added, the mixture turned brown-orange. Nitrogen was blown through the solution for 30 min. After being stirred for 5 days at 40 °C, during which time the solution remained a dark brown-orange, the mixture was cooled at rt and dried under vacuum, resulting in an oil that was purified via water- CH_2Cl_2 extraction. The organic phase was dried under vacuum to produce a thick dark brown-orange oil which was purified by silica gel column chromatography with *n*-hexane-acetone 2 : 1 to get 3 (27 g, 63% from 2). δ_0 (400 MHz; $CDCl_3$): $MnSO_4$ 8.27 (1H, s, 3-H), 7.38 (2H, d, $^1J_{NH}$, 7.9, 23-H and 27-H), 7.23 (2H, d, $^1J_{NH}$, 7.9, 24-H and 26-H), 7.08 (1H, d, $^1J_{NH}$, 8.4, 1-H), 6.58 (1H, dd, $^1J_{NH}$, 8.4 and $^1J_{NH}$, 2.6, 2-H), 6.51 (1H, d, $^1J_{NH}$, 2.6, 4-H), 6.03 (1H, s, NH), 4.61 (1H, s, 17-H), 4.45 (2H, s, 24-H), 3.21 (4H, m, 29-H and 30-H), 2.74 (2H, m, 6-H and 6-H), 2.40–2.20 (2H, m, 11-H and 12-H), 2.20–1.90 (2H, m, 16-H, 12-H and 9-H), 1.90–1.50 (4H, m, 16-H, 15-H, 14-H, 7-H), 1.50–1.30 (4H, m, 15-H, 11-H, 4-H, 7-H), 1.46 (9H, s, 3 \times BocC CH_3), 1.31 (9H, s, 3 \times BocC CH_3); 0.92 (3H, s, 18-H); δ_C (100.5 MHz; $CDCl_3$): $MnSO_4$ 156.14 (BocC=O), 155.72 (BocC=O), 155.30 (C-3), 139.20 (C-25), 137.64 (C-5), 131.65 (C-23 and C-27), 131.11 (C-10), 127.91 (C-24 or C-26), 127.47 (C-26 or C-24), 126.32 (C-1), 122.55 (C-22), 115.30 (C-4), 112.98 (C-2), 94.34 (C-20), 84.81 (C-21), 79.91 (BocC), 79.55 (BocC), 78.11 (C-17), 50.87 (C-28), 49.96 (C-14), 47.75 (C-13), 46.38 (C-29 or C-30), 44.03 (C-9), 39.97 (C-8), 39.30 (C-12), 31.94 (C-30 or C-29), 31.31 (C-16), 29.67 (C-6), 27.99 (3 \times BocC CH_3), 27.11 (3 \times BocC CH_3), 27.45 (C-7), 26.67 (C-11), 22.60 (C-15), 12.71 (C-18). DCl-MS: *m/z*: 645.3895 ($[M + H]^+$, 100%), 646.3911 (48.16), 648.3907 (10.53), 649.3888 (1.15) ($[M + H]^+$); calcd for $C_{34}H_{46}N_2O_6$: 645.3903 ($[M + H]^+$, 100%), 646.3903 (48.94), 647.3903 (10.69), 649.3903 (1.86). Elemental analysis calcd for $C_{34}H_{46}N_2O_6$: C 72.6; H 8.1; N 4.3; found: C 72.8; H 8.15; N 4.3%.

iv) Synthesis of *N*-(4-(17 α -ethynyltestradolyl)-benzyl)-ethylenediamine dihydrochloride, 4. The above compound (1.5 g, 2.33 mmol) was treated at room temperature with 0.1 N HCl in diethyl ether (12 ml). After 5 days stirring we got a brown precipitate of *N*-(4-(17 α -ethynyltestradolyl)-benzyl)-ethylenediamine dihydrochloride (506 mg, 42%). δ_0 (400 MHz; D_2O): $MnSO_4$ 7.22 (2H, d, $^1J_{NH}$, 7.3, 23-H and 27-H), 7.17 (2H, d, $^1J_{NH}$, 7.3, 24-H and 26-H), 6.72 (1H, d, $^1J_{NH}$, 5.5, 1-H), 6.40 (1H, d, $^1J_{NH}$, 5.5, 2-H), 6.17 (1H, s, 4-H), 3.96 (2H, s, 28-H), 3.40–3.07 (4H, m, 29-H and 30-H), 2.22 (2H, m, 6-H), 2.10–0.60 (13H, m, 7-H, 8-H, 9-H, 11-H, 12-H, 14-H, 15-H and 16-H); 0.46 (3H, s, 18-H); δ_C (100.5 MHz; D_2O): $MnSO_4$ 153.36 (C-3), 137.96 (C-5), 133.62 (C-25), 132.38 (C-23 or C-27), 132.16 (C-27 or C-23), 131.25 (C-10), 130.39 (C-24 or C-26), 130.25 (C-26 or C-24), 126.50 (C-1), 124.11 (C-22), 115.45 (C-4), 112.89 (C-2), 94.09 (C-20), 85.22 (C-21), 80.15 (C-17), 51.40 (C-28), 49.82 (C-14), 47.47 (C-13), 44.07 (C-29 or C-30), 43.39 (C-9), 39.22 (C-8), 35.68 (C-30 or C-29), 33.04 (C-12), 29.23 (C-6), 27.89 (C-16), 27.32 (C-7), 26.22 (C-11), 22.84 (C-15), 12.86 (C-18). DCl-MS:

m/z: 223.6505 ($[M-2Cl]^-$, 100%), 224.1499 (32.63), 224.6507 (5.67) ($[M-2Cl]^-$); calcd for $C_{19}H_{19}N_3O_5$, 223.6503 ($[M-2Cl]^-$, 100%), 224.1509 (32.75), 224.6509 (5.60). Elemental analysis calcd for $C_{19}H_{19}Cl_2N_3O_5$: C 67.3; H 7.4; N 5.4; found: C 67.4; H 7.4; N 5.4%.

Synthesis of 2-[4-(17 α -ethylandrodiol)-hexaphenino]-malonic acid diethyl ester, 6.

i) **Synthesis of 2-[4-(17 α -ethylandrodiol)-hexaphenino]-malonic acid diethyl ester, 5.** To a stirred solution of CDMT (0.88 g, 5 mmol) and 4-iodobenzoic acid (1.26 g, 5 mmol) in CH_2Cl_2 (7 mL), we added *N*-methylmorpholine (0.52 g, 5 mmol) dropwise at $-5^\circ C$. After 2 h a TLC control indicated the consumption of CDMT. To the crude solution obtained as described above, a mixture of diethyl 2-aminomalonic hydrochloride (1.06 g, 5 mmol) and *N*-methylmorpholine (0.52 g, 5 mmol) in CH_2Cl_2 (7 mL) was added at $-5^\circ C$. After 2 h at $0^\circ C$ (the temperature was brought to rt and the reaction stirred for 14 h. Evaporation of the solvent resulted in a residue that was suspended in ethyl acetate (30 mL). The organic layer was successively washed with H_2O (10 mL), a 10% citric acid solution (10 mL), H_2O (10 mL), saturated $NaHCO_3$ solution (10 mL) and H_2O (10 mL). Anhydrousification of the organic phase with $MgSO_4$ and evaporation of the solvent produced a residue that was recrystallized from ethyl acetate, resulting in 1.45 g (71.5% yield) of pure 5. δ_c (400 MHz; $(CD_3)_2CO$; Me_4Si) 8.24 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 7.89 (2H, d, $^1J_{H,N}$, 8.6, 2 \times $^2J_{H,H}$), 7.74 (2H, d, $^1J_{H,N}$, 8.6, 2 \times $^2J_{H,H}$), 5.36 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 7.2, $N-C=O$), 4.23 (4H, m, 2 \times OCH_2CH_3), 1.26 (6H, t, $^1J_{H,H}$, 2 \times OCH_2CH_3); δ_c (100.5 MHz; $(CD_3)_2CO$; Me_4Si) 166.35 (2 \times $C=O$), 166.06 ($N-C=O$), 137.95 (2 \times Ph), 133.35 (Ph), 129.62 (2 \times Ph), 98.65 (Ph), 62.13 (2 \times OCH_2CH_3), 57.08 ($N-CH_2$), 13.67 (2 \times OCH_2CH_3). DCI-MS: *m/z*: 406.0149 ($[M+H]^+$, 100%), 407.0146 (15.84), 408.0156 (2.16); calcd for $C_{29}H_{31}INO_5$, 406.0151 ($[M+H]^+$, 100%), 407.0151 (15.96), 408.0151 (2.22). Elemental analysis calcd for $C_{29}H_{31}INO_5$: C 41.5; H 4.0; N 3.5; found: C 41.6; H 4.0; N 3.5%.

ii) **Synthesis of 2-[4-(17 α -ethylandrodiol)-hexaphenino]-malonic acid diethyl ester, 6.** In a 50 ml three-necked round-bottomed flask, anhydrous THF (10 mL) was degassed with N_2 for 10 min. Then, Ag_2O (0.35 g, 1.5 mmol), 17 α -ethylandrodiol (0.44 g, 1.5 mmol), 5 (0.61 g, 1.5 mmol) and $(Ph)_4PtCl_2$ (52.6 mg, 0.075 mmol) were subsequently added. The reaction mixture was heated to $60^\circ C$ and stirred under nitrogen overnight. The reaction was then cooled to rt, filtered through a filter agent, and the solid washed with diethyl ether. The organic phase was washed with $NaHCO_3$ 3% (10 mL) and brine (10 mL), dried over $MgSO_4$ and the solvent was evaporated. The residue was purified by column chromatography using petroleum ether-diethyl ether 50 : 50 as eluent. Appropriate fractions were combined giving 0.53 g (61.1% yield) of pure 6. δ_c (400 MHz; $(CD_3)_2CO$; Me_4Si) 8.24 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 7.3, $N=H$), 7.94 (2H, d, $^1J_{H,N}$, 8.4, 24-H and 26-H), 7.54 (2H, d, $^1J_{H,N}$, 8.4, 23-H and 27-H), 7.10 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 8.4, 1-H), 6.60 (1H, dd, $^1J_{H,N}$, 8.4 and $^1J_{H,H}$, 2.6, 2-H), 6.53 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 2.6, 4-H), 5.38 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 7.3, 29-H), 4.61 (1H, s, 17-H), 4.24 (4H, m, 2 \times OCH_2CH_3), 2.75 (2H, m, 6-H and 8-H), 2.38–2.31 (2H, m, 11-H and 13-H), 2.24–1.92 (3H, m, 16-H, 12-H and 9-H), 1.92–1.72 (4H, m, 16-H, 15-H, 14-H, 7-H), 1.52–1.30 (4H, m, 15-H, 11-H, 8-H, 7-H), 1.26 (6H, t, $^1J_{H,H}$, 2 \times OCH_2CH_3), 0.94 (2H, s, 18-H); δ_c (100.5 MHz; $(CD_3)_2CO$; Me_4Si) 166.46 ($C=O$), C-30 and C-31), 163.98 ($C=O$), C-28), 135.13 (C-3), 137.65 (C-5), 132.67 (C-25), 131.48 (C-23 and C-27), 131.12 (C-10), 127.78 (C-24 and C-26), 127.24 (C-22), 126.34 (C-1), 115.21 (C-4), 112.87 (C-2), 97.09 (C-20), 84.19 (C-21), 79.54 (C-17), 62.03 (2 \times OCH_2CH_3), 56.95 (C-29), 50.00 (C-14), 47.76 (C-13), 43.90 (C-9), 39.16 (C-1), 39.21 (C-12), 33.32 (C-16), 29.38 (C-6), 27.43 (C-7), 26.64 (C-11), 22.87 (C-15), 13.57 (2 \times OCH_2CH_3), 12.67 (C-18). DCI-MS: *m/z* (relative intensity): 574.2808 ($[M+H]^+$, 100%), 575.2797 (38.00), 576.2796 (8.47), 577.2812 (1.38); calcd for $C_{29}H_{31}NO_5$, 574.2804 ($[M+H]^+$, 100%), 575.2804 (38.01), 576.2804 (8.46),

577.2804 (1.39). Elemental analysis calcd for $C_{29}H_{31}NO_5$: C 71.2; H 6.85; N 2.4; found: C 71.3; H 6.9; N 2.4%.

Platinum coordination

Synthesis of *cis*-dichloro-*N*-(4-(17 α -ethylandrodiol)-hexaphenino)-ethylenediamine(platinum)(II), 7. The ligand-dihydrochloride 4 (132 mg, 0.255 mmol) was dissolved in water (5 ml) at $65^\circ C$. A solution of $K_2[PtCl_4]$ (127 mg, 0.306 mmol) in water (5 ml) was added and the pH value was adjusted to 5–6 with 0.1 N aqueous NaOH. Initially, the pH of the mixture was 4–5 decreasing towards 1 because of the progressing reaction; the pH had to be kept from the region of hydroxo-complexes (basic pH). The mixture was stirred while protected from light for 2 days at rt. The resulting light brown precipitate of 7 was washed with cold water, ethanol and ether and dried, resulting in pure 7 (60 mg, 88% from 4). δ_c (400 MHz; $(CD_3)_2SO$; Me_4Si) 8.99 (1H, s, 3-H), 7.58 (2H, d, $^1J_{H,N}$, 7.9, 24-H and 26-H), 7.45 (2H, d, $^1J_{H,N}$, 7.9, 23-H and 27-H), 7.06 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 8.4, 1-H), 6.70 (1H, br, $N=H$), 6.51 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 8.4, 2-H), 6.44 (1H, s, 4-H), 5.45 (1H, s, 17-H), 5.43–5.23 (2H, m, $N=H$), 4.60–3.60 (6H, m, 24-H, 29-H and 30-H), 2.71 (2H, m, 6-H), 2.45–1.13 (13H, m, 7-H, 8-H, 9-H, 11-H, 12-H, 14-H, 15-H and 16-H), 0.82 (3H, s, 18-H); δ_c (100.5 MHz; $(CD_3)_2SO$; Me_4Si) 155.01 (C-3), 137.91 (C-5), 134.32 (C-10), 131.49 (C-23 or C-27), 100.52 (C-27 or C-23), 100.35 (C-24 or C-26), 100.26 (C-26 or C-24), 128.39 (C-25), 126.18 (C-1), 123.09 (C-22), 115.09 (C-4), 112.82 (C-2), 95.90 (C-20), 83.74 (C-21), 78.72 (C-17), 53.95, 53.16, 45.32 ($N-CH_2$), C-21, C-29, C-30, 40.50 (C-14), 47.33 (C-13), 43.49 (C-9), 39.02 (C-16), 29.27 (C-6), 27.08 (C-7), 26.30 (C-11), 22.66 (C-15), 12.97 (C-18); δ_c (85.9 MHz; $(CD_3)_2SO$; $K_2[PtCl_4]$) –3307 ppm (where a chloride is replaced by DMSO). ESI-MS (water-DMSO (3 : 1)): *m/z*: 749.221 (1.52%), 751.221 (64.40), 752.220 (81.58), 753.220 ($[M-Cl+DMSO]^+$, 100), 754.220 (54.73), 755.221 (46.76), 756.221 (14.95), 757.220 (8.66), 758.221 (2.44); calcd for $C_{29}H_{31}Cl_2N_3O_5Pt$ (8749.220 (1.53), 751.220 (64.46%), 752.220 (88.53), 753.220 ($[M-Cl+DMSO]^+$, 100), 754.220 (54.77), 755.220 (46.74), 756.220 (14.97), 757.220 (8.63), 758.220 (2.45). Elemental analysis calcd for $C_{29}H_{31}Cl_2N_3O_5Pt$: C 49.0; H 5.1; N 3.9; Pt 27.45; found: C 49.1; H 5.1; N 3.9; Pt 27.4%.

Synthesis of *cis*-diamine-2-[4-(17 α -ethylandrodiol)-hexaphenino]-malonato(platinum)(II), 8. $K_2[PtCl_4]$ (500 mg, 1.21 mmol) was dissolved in water (2 ml) and an aqueous solution of KI (1.20 mg, 7.23 mmol) in 2 ml of water was added to the mixture. After about 30 min it was filtered to remove some solid impurities. An aqueous solution (2 ml) containing 4 mmol of NH₃ was added to the filtrate. Fine yellow-brown crystals of *cis*- $[(NH_3)_2Pt]$ immediately precipitated. After 15 min the compound was separated by centrifugation and washed with cold water, ethanol and diethyl ether (567 mg, 97.5% yield). *cis*- $[(NH_3)_2Pt]$ (300 mg, 0.62 mmol) was then suspended in an aqueous solution (30 mL) of Ag_2SO_4 (190 mg, 0.61 mmol) and the mixture was stirred for 30 h in the dark; after that the silver iodide precipitate was removed by filtration. The barium salt 6a [prepared by adding 0.11 M aqueous $Ba(OH)_2$ (5.65 ml) to a solution of 6 (400 mg, 0.70 mmol) in methanol (10 ml)] was added to the filtrate. The mixture was stirred for 24 h and then centrifuged to separate the $BaSO_4$ and 8 that coprecipitated. The solid obtained was washed several times with methanol to dissolve 8. Methanol was evaporated to dryness, yielding 8 (250 mg, 54% yield from *cis*- $[(NH_3)_2Pt]$). δ_c (400 MHz; $(CD_3)_2SO$; Me_4Si) 9.01 (1H, s, 3-H), 7.89 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 7.86 (2H, d, $^1J_{H,N}$, 8.4, 24-H and 26-H), 7.49 (2H, d, $^1J_{H,N}$, 8.4, 23-H and 27-H), 7.06 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 8.4, 1-H), 6.49 (1H, dd, $^1J_{H,N}$, 8.4 and $^1J_{H,H}$, 2.6, 2-H), 6.42 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 2.6, 4-H), 5.72 (1H, d, $^1J_{H,N}$, 7.7, 29-H), 5.55 (1H, s, 17-H), 4.31 (6H, s, 2 \times $N=H$), 2.70 (2H, m, 6-H and 8-H), 2.40–1.20 (13H, m, 7-H, 8-H, 9-H, 11-H, 12-H, 14-H, 15-H and 16-H), 0.80 (3H, s, 18-H); δ_c (100.5 MHz; $(CD_3)_2SO$; Me_4Si) 171.73, 170.48 ($C=O$, C-30 and C-31), 164.39 ($C=O$,

C-28), 155.00 (C-3), 137.28 (C-5), 133.51 (C-10), 131.31 (C-23 and C-27), 130.39 (C-25), 127.78 (C-22), 127.64 (C-24 and C-26), 126.24 (C-1), 115.03 (C-4), 112.16 (C-2), 97.17 (C-20), 83.78 (C-21), 71.80 (C-17), 59.47 (C-29), 49.56 (C-14), 47.31 (C-13), 43.47 (C-9), 33.08 (C-16), 29.32 (C-8), 27.09 (C-7), 26.34 (C-11), 22.72 (C-15), 13.01 (C-18); δ_{h} (85.9 MHz, $(\text{CDCl}_3)_2\text{SO}$, $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$) = 17.18 ppm. ESI-MS (water-methanol = 50 : 50; m/z : 742.214 (1.78%), 744.215 (73.08), 745.215 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100), 746.214 (16.85), 747.215 (25.31), 748.216 (20.76), 749.215 (6.19), 750.216 (1.22); calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{Pt}$: 742.215 (1.78%), 744.215 (73.11), 745.215 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100), 746.215 (16.85), 747.215 (25.38), 748.215 (20.90), 749.215 (6.18), 750.215 (1.23). Elemental analysis calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{Pt}$: C 48.4; H 4.7; N 5.6; Pt 26.2; found: C 48.5; H 4.7; N 5.6; Pt 26.13%.

Log P_{ov} determination

Log P_{ov} values were estimated from values of log k' , ϕ , ϕ_0 = capacity into (in absence of methanol), determined by HPLC chromatography according to Mirick *et al.*²⁴ and Pomper *et al.*²⁵ using a Machery-Nagel EC250/3 Nucleosil 100-5C18HD column. The UV detector was set to 277 nm. The organic portion of the mobile phase was composed of methanol containing 0.25% (v/v) 1-octanol. The aqueous portion was an octanol-saturated buffer prepared from 0.02 M 3-morpholino propanesulfonic acid (MOPS) and 0.15% (v/v) *n*-decylamine; the pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The flow rate was 0.5 ml min⁻¹. The steroids were dissolved at 1 mM concentration in ethanol and 20 μ l were injected. Column void volume was estimated from the retention time of unretained (t_0), which was included as an unretained internal reference with each run. k' values were obtained from the retention time of unretained (t_0) according to $k' = (t_R - t_0)/t_0$. The log k' was determined by linear extrapolation of log k' vs. ϕ methanol (ϕ = volume fraction of methanol); data acquired with 0.55 $\leq \phi \leq$ 0.85. Applying Pomper's relationship, log k' returned the log P_{ov} value.

Determination of the relative binding affinity (RBA) for the form of the estrogen receptor (ER α)

Lamb uterine cytosol prepared in buffer A (0.05 M Tris-HCl, 0.25 M sucrose, 0.1% β -mercaptoethanol, pH 7.4 at 25 °C) as described in the literature²⁶ was used as a source of ER α .

Aliquots (200 μ l) of diluted ER α (in glass tubes) were incubated for 3.5 h at 0 °C with 2×10^{-6} M of [^3H]-estradiol (specific activity 1.96 TBq mmol⁻¹) in the presence of nine different concentrations of the hormone derivatives to be tested. At the end of the incubation period, the free and bound fractions of the tracer were separated by proteinase K lysis precipitation.²⁷ The percentage reduction of [^3H]-estradiol binding (F) was calculated using the logit transformation of F (logit $F = \ln[F/(1 - F)]$ where the logarithm of the ratio of the competing steroid. The unlabelled steroid concentration, requiring displacement of 50% of the bound [^3H]-estradiol, was calculated for each steroid tested, and the results are expressed as RBA. The RBA value of estradiol is by definition equal to 100%.

Viability assay

Exponentially growing cell lines, the MCF-7 hormone-responsive mammary adenocarcinoma cell line and MDA-MB-231 hormone-independent breast cancer line (ATCC, USA), were trypsinized and resuspended in complete RPMI (Sigma, USA) culture medium phenol red-free, containing 10% charcoal-dextran stripped FBS (2.5 g of washed, activated charcoal, plus 0.25 g dextran T-70 dissolved in 1 L of 0.01 M Tris, pH 8.0, added to an equal volume of fetal bovine serum) (Sigma, USA), supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 μ g ml⁻¹ streptomycin and 0.25 μ g ml⁻¹ amphotericin B. Cells were seeded with complete medium conditioned with an appropriate concentration

of the compound under analysis (final concentration 1 μ M). The organic compounds Tam, OH-Tam, E2, EE, 4 and 6, were dissolved in EtOH, whereas Pt(II)-complexes 7, 8, *cis*-[Pt(en)Cl₂] and *cis*-[Pt(NH₂)₂mal] were dissolved in DMSO. The final concentration of the cosolvent in culture media never exceeded 0.5%. Cisplatin was dissolved in culture media. Cell monolayers grown in culture media containing the cosolvent at the maximum concentration employed were assumed as reference controls (100% of the growth).

Cell monolayers were treated continuously for 120 h. Viability was measured using an MTT test. Cells were incubated with 0.5 mg ml⁻¹ MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) under standard culture conditions for 1 h. Wells were dried, and formazan crystals were solubilized with 750 μ l of acidic isopropanol (0.1 N HCl in absolute isopropanol). Absorbance was measured by spectrophotometry at 570 nm with background subtraction at 630 and 690 nm.

Bio-stoichiometry

Rough calculations allowed us to assess the order of magnitude of platinum atoms potentially bound to the receptor or necessary to exert cytotoxic effects. The number of estrogen-receptor (ER) adducts in hormone dependent (ER+) breast cancer cells is in the range of 10000-30000 (20000 on average).²⁸ The level of cellular uptake in the human mammary adenocarcinoma MCF-7 cell line with cisplatin, evaluated by means of ICP-MS and extrapolated at IC₅₀ level (24 h continuous treatment), is about 47 ng Pt/10⁶ cells.²⁹ The corresponding DNA platination is about 1% of the uptake, i.e. 470 pg Pt/10⁶ cells.^{29,30} Provided that the 20000 ER adducts transport 20000 Pt atoms directly to the DNA (chelation perfectly efficient), the DNA platination would correspond to 6.4 pg Pt/10⁶ cells. Thus, the platination produced by the receptorial system proves to be a very inadequate for cytotoxicity, with a deficit of at least 73-fold.

Acknowledgements

This work received financial support from MIUR (Rome) as part of the COFIN2004 project, and from C. I. R. C. M. S. B. (Bari). We are indebted to Johnson Matthey (Reading, UK) for a generous loan of K₂[PtCl₄]. Research was carried out within the framework of the European Cooperation COST D20 action (Metal compounds in the treatment of cancer and viral diseases) and COST B18 action (Multidrug resistance reversal). Thanks are due to Dra. Verónica-Joson and to Ma A. Cordafile (EN-SCP) for RBA and log P_{ov} measurements, and to Dr L. McLean for her assistance in writing the manuscript.

References

1. *Book for Cancer Management (Annals of The New York Academy of Sciences)*, ed. L. Castagnetta, I. Haid and H. L. Bradlow, New York Academy of Sciences, New York, 1996, vol. 784.
2. *Receptor Activation by Antigens, Cytokines, Hormones, and Growth Factors (Annals of The New York Academy of Sciences)*, ed. D. Naor, E. De Maya, M. Fridman and J. Schindler, New York Academy of Sciences, New York, 1993, vol. 766.
3. *Formones, a Practical Approach*, ed. B. Green and R. E. Leake, IRL Press, Oxford, 1997.
4. *Cytotoxic Interplay in Hormone Receptive Tumors*, ed. J. Baas, H. Martens and G. Leclercq, Academic Press, London, 1990.
5. *Steroid receptors and antiestrogens (Annals of The New York Academy of Sciences)*, ed. D. Henderson, D. Plubert, A. K. Roy and G. Tenich, New York Academy of Sciences, New York, 1998, vol. 781.
6. E. Monti, M. Gariboldi, A. Maleschi, E. Marzago, C. Cambio, E. Gabano and D. Corle, *J Med Chem*, 2003, 46, 857-866.
7. J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 1992, 199-200, 873-881.
8. D. Gibson, I. Binyamin, M. Haj, I. Ringel, A. Raza and J. Knibbschler, *Int. J Med Chem*, 1997, 32, 823-831.
9. F. D. Beckon and L. M. Grata, *Inorg. Chim. Acta*, 2000, 306, 193-204.
10. M. J. Chasany and J. D. Hoardale, *Platiny. Chem.*, 1973, 2, 177-210.

- 11 M. J. Cline, *Coord. Chem. Rev.*, 1974, 12, 349–405.
- 12 A. Fasini and F. Zanini, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1987, 26, 615–624.
- 13 F. Campbell, in *Organometallic Reagents—A Practical Approach*, ed. R. J. K. Taylor, Oxford University Press, New York, 1994, pp. 217–233.
- 14 A. Mori, J. Kawahara, T. Shirouchi, M. Soguro, K. Hirabayashi and Y. Nishikura, *Org. Lett.*, 2000, 2, 2925–2927.
- 15 H. H. Inhoffen and W. Hohlberg, *Naturwissenschaften*, 1938, 24, 96.
- 16 K. Sonogashira, Y. Echida and N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.*, 1975, 16, 4467–4470.
- 17 L. Casari, *J. Organomet. Chem.*, 1975, 83, 253–257.
- 18 H.-A. Dieck and R. F. Heck, *J. Organomet. Chem.*, 1975, 83, 299–363.
- 19 M. de Almeida, E. T. Court, E. de C. A. Falcão, A. P. S. Rosta and M. Robert-Gero, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2008, 11, 154–158.
- 20 J. B. A. Norberta, K. Y. Rao and M. C. Perry, *Tetrahedron Lett.*, 2000, 41, 829–842.
- 21 Z. J. Kazanicki, *Synthesis*, 1987, 917–928.
- 22 P. Serrano, R. C. Livingston and F. Döcklich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, 39, 2620–2627.
- 23 C. Ghaur, *Bev. Dutch Chem. Ge.*, 1899, 2, 422–424.
- 24 A. Lei, M. Srinivasan and X. Zhang, *J. Org. Chem.*, 2002, 67, 1969–1971.
- 25 M. Ajami, F. Peri and G. Lisandrullo, *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 6403–6406.
- 26 F. Müller, S. Wild, H. Zorbas and W. Beck, *Inorg. Chim. Acta*, 1999, 288, 237–246.
- 27 S. C. Dhara, *Indian J. Chem.*, 1970, 8, 192–194.
- 28 R. C. Harrison and C. A. McAuliffe, *Inorg. Chim. Acta*, 1980, 46, L15–L16.
- 29 O. Casadoñi, H. C. Agrifolano, Y. Nijssen and J. Ham, *Inorg. Chim. Acta*, 1989, 141, 113–123.
- 30 R. Bertani, E. Scaglia, D. Ferrotto, R. A. Michelin, M. Mezzoni, S. Mazzega Sloviani and A. Sani, *Inorg. Chim. Acta*, 2000, 284, 257–264.
- 31 S. Top, G. Jacson, A. Venturo, J. F. Abjani, D. Davoni, C. A. Rodger, B. G. Sayer and M. J. McCluskey, *Organometallics*, 1985, 4, 2143–2151.
- 32 P. Dierckx and D. Patrier, *Synthese*, 1995, 40, 834–836.
- 33 D. Gibson, A. Bonfield, H. A. Phillips and J. Ham, *Inorg. Chem.*, 1990, 29, 5125–5128.
- 34 Access Pharmaceuticals Inc., *Non-competitive bromine fluoride polymer program*, 2001.
- 35 A. Ferrin, A. Gualco, F. Bassichetti, G. Prati, C. Denaldi, R. Fattani and F. M. Vaccaro, *Eur. J. Med. Chem.*, 2003, 38, 739–749.
- 36 Y. A. Lee, Y. K. Chung and Y. S. Sohn, *Inorg. Chem.*, 1999, 38, 531–537.
- 37 L. S. Hollis, A. R. Anderson and E. W. Stern, *J. Med. Chem.*, 1989, 32, 124–136.
- 38 P. B. Dumas and M. Hospital, *Acta Crystallogr., Sect. B*, 1972, B28, 568–567.
- 39 L. T. Ellis and T. W. Harbley, *Acta Crystallogr.*, 1994, C50, 1880–1889.
- 40 F. D. Beckon, R. Melanson, J. P. Macquet, F. Belanger-Garipuy and A. L. Bunshurp, *Inorg. Chim. Acta*, 1983, 106, 1–6.
- 41 D. Oculi, M. Ravera, C. Nervi, G. Castiglione, M. Vignani, A. Venturo and G. Jacson, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, 491–497.
- 42 M. Roy, E. Stephan, A. Venturo, E. Salomon, J. M. Haldi, M. Fuchs and G. Jacson, *ChemSusChem*, 2003, 4, 494–503.
- 43 C. Camino, E. Gubano, M. Ravera, G. Carotto, G. Palmisano, A. Venturo, G. Jacson, S. Muraletto, R. A. Berto and D. Oculi, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, 357, 2157–2166.
- 44 D. W. Robertson, J. A. Katzenellenbogen, D. J. Long, E. A. Borbo and B. S. Katzenellenbogen, *J. Steroid Biochem.*, 1982, 16, 1–13.
- 45 G. Berrich, F. Wiedler, C. H. J. Ford, M. Calant and Z. Tardos, *Can. J. Chem.*, 1993, 71, 1327–1333.
- 46 C. Danoldtman, J. Proszka, J. M. Haldi, I. Nafizaj, V. Perro, S. K. Mandal, E. Amadio and G. Berrich, *Inorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 3927–3931.
- 47 Y. Gagnon, M.-E. St-Germain, C. Danoldtman, J. Proszka, J. M. Haldi, S. Perro, S. K. Mandal, E. Amadio and G. Berrich, *Inorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 5919–5924.
- 48 E. Ferrin, C. Chaboussat, J. C. Dumon, G. Leclercq, G. Laurent and J. J. Body, *Br. J. Cancer*, 2004, 91, 1707–1710.
- 49 G. Berrich, K. Beckenkötter, T. Spruy, R. Schimmer, H. Reikow and H. Schönberger, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)*, 2002, 335(2–3), 55–68.
- 50 C. Lippert, H. Seger, D. Wollbrunn and A. O. Mueck, *Chim. Exp. Obiett. General.*, 2002, 29(2), 87–90.
- 51 K. Y. Chan, H. Y. F. Lam and K. L. D. Lee, *Exp. Cell Res.*, 1991, 241, 269–272.
- 52 Q. He, C. H. Liang and S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97(11), 5768–5772.
- 53 K. R. James, A. Katkov and S. J. Lippard, *Chem. Biol.*, 2004, 11, 557–564.
- 54 D. J. Minick, J. H. Foss, M. A. Priddy and D. A. Brant, *J. Med. Chem.*, 1988, 31, 1923–1925.
- 55 M. G. Fonges, H. VanRooyen, A. M. Thieme, R. D. Thomas, D. O. Kinswetter, K. E. Carlson, C. J. Mathias, M. J. Welch and J. A. Katzenellenbogen, *J. Med. Chem.*, 1998, 33, 3143–3153.
- 56 A. Venturo, S. Top, A. A. Inzari, I. S. Butler, M. Loser and G. Jacson, *Synthetic*, 1988, 27, 6639–6646.
- 57 E. R. de Sombra, B. Shafi, R. M. Hanson, P. C. Kuvanas and A. Hughes, *Cancer Res.*, 1992, 52, 5752–5758.
- 58 A. E. Ghazzi, M. Aorio, C. Camino, E. Gubano and D. Oculi, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, 96, 73–78.
- 59 A. E. Ghazzi and D. Oculi, unpublished results.
- 60 R. F. Foss, *Eur. J. Cancer*, 1991, 24(10), 1525–1542.



Water-soluble benzoheterocycle triosmium clusters as potential inhibitors of telomerase enzyme [☆]

Donato Colangelo ^a, AnnaLisa Ghiglia ^a, AnnaRita Ghezzi ^b, Mauro Ravera ^b,
Edward Rosenberg ^c, Fabrizio Spada ^c, Domenico Osella ^{b,*}

^a Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Via Solarà, 17, 28100 Novara, Italy

^b Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Vita, Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", SpAto Marengo 33,
15100 Alessandria, Italy

^c Department of Chemistry, University of Montana, Missoula, MT 59812, USA

Received 16 June 2004; received in revised form 17 September 2004; accepted 25 October 2004

Available online 8 December 2004

Abstract

We have studied the ability of several bioorganometallic clusters $[(\mu\text{-H})\text{Os}_3(\text{CO})_9(\text{L})]_{\mu_3-\eta^3}(\text{Q-H})$, where $\text{L} = [\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na})_2]$ or $[\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)_3]$, and $\text{Q} =$ quinoline, 3-aminoquinoline, quinoxaline or phenanthridine, of inhibiting telomerase, a crucial enzyme for cancer progression. In general, quinolines have shown interesting biological properties, especially in inhibiting enzymes. For example, the 2,3,7-trichloro-5-nitroquinoxaline (TNQX) exhibited strong anti-telomerase activity *in vitro*. Among the quinoline-clusters under study, only the negatively charged ones (by virtue of the sulfonated phosphines) exhibited good anti-telomerase activity on semi-purified enzyme in a cell-free assay, while they were ineffective *in vitro* on Tag, a different DNA-polymerase. On the contrary, the treatment of breast cancer MCF-7 cell line did not evidence any activity of these clusters, suggesting a low aptitude for crossing cell membrane. Furthermore, all clusters exhibited non-specific, acute cytotoxicity, probably due to accumulation on cell membranes by virtue of their amphiphilic character. A detailed study of Os uptake and accumulation in MCF-7 cells supported this hypothesis.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Telomerase; Quinoline; Osmium clusters; Anti-proliferative agent; Antitumor chemotherapy

1. Introduction

Telomerase is a ribonucleoprotein with DNA polymerase activity that maintains the length of telomeric DNA by adding hexameric units (5'-TTAGGG) to the 3' single strand terminus. The telomeric stabilisation contributes to the preservation of unlimited cell proliferation potential. Telomerase is a multimeric enzyme and

consists of different components: the RNA subunit human telomerase RNA component (hTERC, also known as hTR or hTER), the catalytic subunit human telomerase reverse transcriptase (hTERT), and associated proteins [1]. Low activity of telomerase is present in germinal as well as in stem cells. In most human tumours a strong telomerase up-regulation has been demonstrated, while somatic cells do not express this enzyme. Thus, telomerase inhibition may be considered a highly specific approach directed toward tumour cells and metastases [2].

Nowadays, different authors have proposed promising molecules for the inhibition of telomerase. Among these, peptide nucleic acid (PNA) [3], didoxyguanine

[☆] This article includes materials of a talk given by the corresponding author at the SCI 2003 (G. Natta centenary celebration) Turin, Italy, 22–27 July 2003.

* Corresponding author. Tel.: +39 131 287420; fax: +39 131 287416.
E-mail address: domenico.osella@mf.it.unipr.it (D. Osella).

(ddG), antisense oligonucleotides [4,5], retrotranscriptase inhibitors as 3'-azidothymidine (AZT) and carbocir [6–9], agents able to promote or stabilize quadruplex formation of guanine bases (G4) in telomeric DNA as the derivatives of porphyrins [10,11] and anthraquinones [12], high-affinity small peptide [13] and hammerhead ribozyme against RNA components of telomerase [14,15].

Quinoline based compounds have shown interesting biological properties, especially in inhibiting enzymes. For example, the 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H7) is a potent inhibitor of the protein kinases A and C [16]. Kim et al. [17] reported the 2,3,7-trichloro-5-nitroquinoxaline (TNQX) as a mixed-type non-competitive inhibitor of telomerase (Fig. 1).

Our group has proposed a different approach based on Pt(II)-complexes [18–20]. Similarly Yoshida and co-workers [21] reported that the long-term treatment of a cultured hepatoma cell line with $[Pt(2,3\text{-dibromosuccinato})(2\text{-methylaminomethylpyridine})]$ produced a significant reduction of telomerase activity. The most likely targets of these molecules are the nucleobases of hTERC. In particular, we found that the water-soluble *cis*- $[Pt(Cl)_2(pyridine)(5\text{-SO}_3Na\text{-isoquinoline})]$ compound, named Ptquin8 (Fig. 1) achieved the best compromise between telomerase inhibition and non-specific cytotoxicity. This is an important requirement, since any anti-telomerase therapy has to be prolonged, to permit the telomeres to shorten to a critical length, as a consequence of the multiple replication of cancer cells, and induce senescence and apoptosis [22].

We have recently developed synthetic procedures for a class of benzoheterocycle trisodium clusters of general formula $[(\mu\text{-H})Os_3(CO)_6(L)(\mu_3\text{-}\eta^2\text{-}(Q\text{-H}))]$, where $L = [P(C_6H_4SO_3Na)_2]$ or $[P(OCH_2CH_2NMe_3)_3]$ and $Q =$ quinoline, 3-aminoquinoline, quinoxaline, phenanthridine [23–30] (Fig. 2). The general scheme of synthesis is reported in Fig. 3. These organometallic clusters are characterised by a quinoline-like ligand, and an ionisable phosphine or phosphite ligand, both coordinated

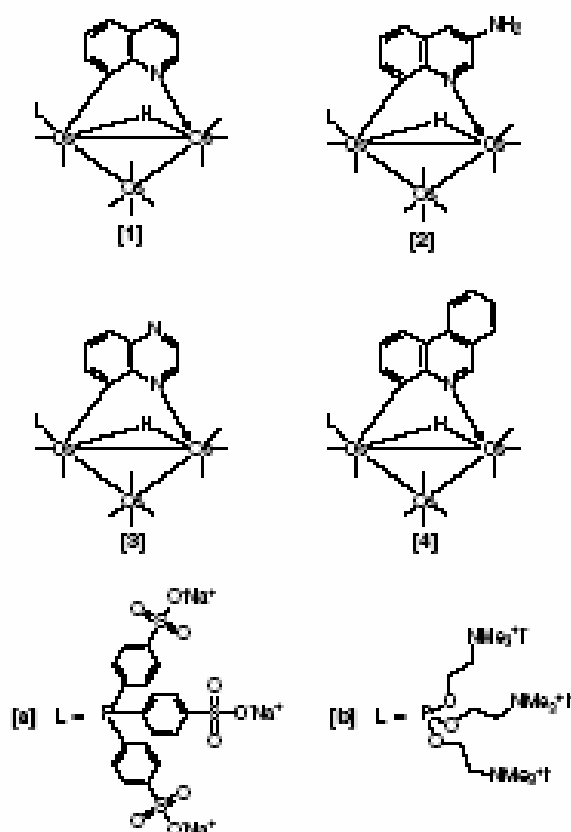


Fig. 2. Sketch of the structures of $[(\mu\text{-H})Os_3(CO)_6(L)(\mu_3\text{-}\eta^2\text{-}(Q\text{-H}))]$ clusters 1a–4b, where $L = [P(C_6H_4SO_3Na)_2]$ or $[P(OCH_2CH_2NMe_3)_3]$, and $Q =$ quinoline, 3-aminoquinoline, quinoxaline or phenanthridine. The symbol (–) stands for CO.

to a chemically inert trisodium-nonacarbonyl-hydrido core (823 Da). The sulfonate phosphine or the trimethylammonium phosphite ligands are able to impart water solubility to the large organometallic cluster, by virtue of their triple negative or triple positive charges, respectively. Clusters 1a–4b (Fig. 2) are stable in water for

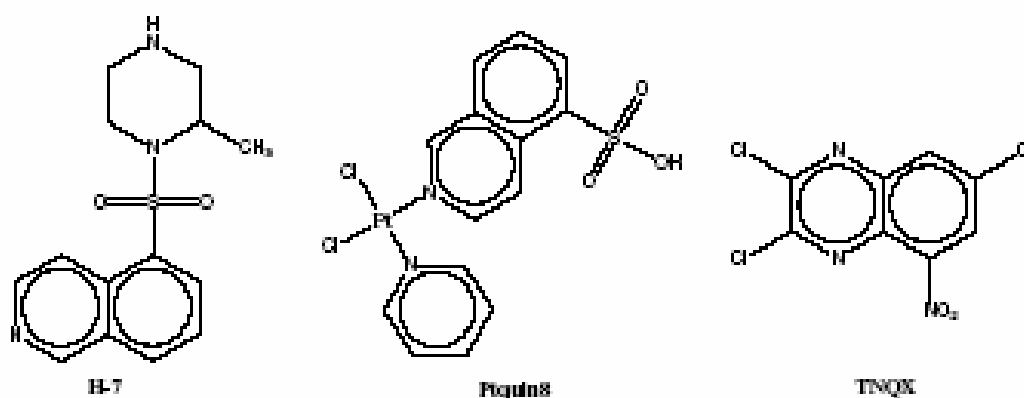


Fig. 1. Sketch of quinoline-based enzyme inhibitors.

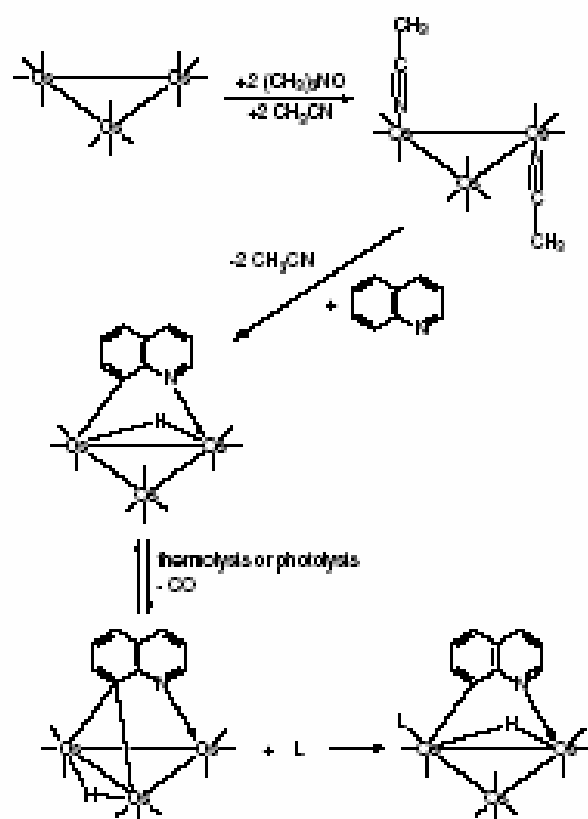


Fig. 3. Synthesis of $[(\mu\text{-H})\text{Os}_3(\text{CO})_9(\text{L})(\mu\text{-}\eta^2\text{-Q-H})]$ clusters, where $\text{L} = [\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3\text{Na})_3]$ or $[\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3)_3]$ and $\text{Q} =$ quinoline, 3-aminoquinoline, quinoxaline or phenanthridine. The symbol (-) stands for CO.

weeks. They aggregate to form micelles at relatively high concentration, and are able to interact electrostatically with biomolecules, as testified by relaxation tests on plasmid super-coiled DNA [30].

The quinoline osmium clusters differ from quinoline-Pt(II) compounds, like Ptquin3, since they lack of any leaving group and, therefore, of any electrophilic/coordinating (traditionally named *alkylating*) properties. Only their steric hindrance could be responsible for the inhibition of the telomerase.

We have studied the telomerase-inhibiting ability of such clusters both in a cell-free biochemical system and in human breast cancer MCF-7 cell line.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The triosmium clusters $[(\mu\text{-H})\text{Os}_3(\text{CO})_9(\text{L})(\mu\text{-}\eta^2\text{-Q-H})]$, where $\text{L} = [\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3\text{Na})_3]$ or $[\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3)_3]$ and $\text{Q} =$ quinoline, 3-aminoquinoline, quinoxaline, phenanthridine, 1a–4b, were synthesized

according to published procedures [30]. Their purity was verified by FT-IR, multinuclear NMR spectroscopy, and elemental analysis.

All reagents were purchased from Sigma Aldrich. OsO_4 and K_2PtCl_6 were gifted from Johnson Matthey (Reading, UK) and were employed for the synthesis of the starting materials $\text{Os}_3(\text{CO})_{12}$ and cisplatin, respectively.

2.2. Cell culture

MCF-7 cells (human mammary adenocarcinoma, ATCC HTB-22, American Type Culture Collection, Rockville, USA) were used for *in vitro* experiments. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) culture medium supplemented with 10% foetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B. Cells were cultured at 37 °C in humidified 5% CO_2 atmosphere and cell monolayers were periodically screened for mycoplasma contamination.

2.3. Cell-free telomerase biochemical test

Exponentially growing MCF7 cells were lysed and telomerase extracted as described in the literature [31]. Briefly, cells were trypsinized and washed with cold buffer containing 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid, sodium salt, pH 7.4), 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, and 1 mM DTT (dithiothreitol). The pellets were resuspended in a lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, buffered at pH 7.5), 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA (ethylenbis(oxyethylenetri)tetraacetic acid), 0.5% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propane-sulfonate), 10% glycerol, 0.1 mM PMSF (phenylmethanesulphonyl fluoride), and 5 mM 2-mercaptoethanol. Lysis was carried out for 30 min on ice and samples were separated at 20,000g for 30 min at 4 °C. Protein content was determined using BCA Protein Assay (Pierce) [32] and aliquots, containing the active telomerase, were diluted in order to obtain a low chloride concentration (about 1 mM), compatible with intracellular concentration. The enzyme present in this solution was challenged with the clusters under investigation at final concentration ranging from 10^{-7} to 10^{-4} M. Incubations were carried out for 15 min at 23 °C, to ensure the preservation of enzyme efficiency. After the treatment, the mixture was adjusted to obtain a final salt composition: 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl_2 , 63 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.1 mg/ml BSA (bovine serum albumin), and 0.005% Tween-20. We included a true positive control (the untreated cell lysate) and an interference control (the cluster under study added only after this step, named elongation step). The residual telomerase activity

was determined following the standard procedures for telomeric repeat amplification protocol (TRAP assay), named amplification step [31].

2.4. Determination of the residual telomerase activity in cells

Sub-confluent cell monolayers were treated with the series of clusters at different concentration (10^{-9} – 10^{-5} M) for 24 h. Telomerase-containing extracts were prepared as described in Section 2.3. A range of 0.5–1 μ g total cellular protein was analysed for the TRAP reaction.

2.5. Telomeric repeats amplification protocols

The residual telomerase activity was determined with two methods: the semi-quantitative TRAP assay and real-time quantitative TRAP [31]. In the traditional TRAP assay the elongation substrate for telomerase, the synthetic oligonucleotide TS ($5'$ -AATCCGTCGAGCAGAGTT), was added to a mixture containing 1 μ g of enzyme lysate (derived from cell-free biochemical assay or from lysate of the treated cells), 2 U *Taq* polymerase (Roche, Germany), 50 μ M dNTPmix, 2 μ Ci (α - 32)dCTP (Amersham, UK) and TRAP buffer. The elongation step was conducted at 23 °C for 30 min. At the end of this step, the downstream primer CX ($5'$ -GCGCGGCCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC) was added to the reaction buffer and the amplification of the hexameric elongation products was made by PCR (polymerase chain reaction, 30 cycles; 50 °C annealing temperature). We included a true positive control (the untreated cell lysate), and an interference control (i.e., the cluster under study added only after the elongation step). However, the inhibition of clusters 1a–4a on *Taq* (*Thermus aquaticus* derived DNA-polymerase) resulted to be negligible. The amplification reaction products were resolved by non-denaturing 8% polyacrylamide electrophoresis. Densitometry was performed using a GS-250 Molecular Imager (Bio-Rad) with BI screen type and Phosphor Analyst 1.1 program for densitometric analysis. Internal amplification control was included (ITAS, forward $5'$ -AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAGGCCGAGAAAGCGAT, backwards $5'$ -ATCGCTTCTCGGCCTTTT) in the reaction and used for densitometric calculations.

The second method that we adopted employed a real-time PCR amplification protocol for telomerase products. The reaction mixture included 1 \times SYBR green buffer (Applera PE, Italy), 5 mM $MgCl_2$, 25 mM each dNTP, 2 U AmpliTaq Gold DNA-polymerase, 10 mM EGTA, 0.1 μ g of each primers (TS $5'$ -AATCCGTCGAGCAGAGTT and ACX $5'$ -GCGCGGCCTTACCCTAACC). The reaction was performed using an ABI Prism 7000 instrument (Applied Biosys-

tems, USA). The experimental conditions were 25 °C for 20 min for the elongation step, 95 °C for 10 min for the activation of *Taq*, 95 °C for 20 s, 50 °C for 30 s and 72 °C for 90 s for denaturing, annealing and amplification, respectively. The real-time fluorescence detection threshold was calculated as 10 standard deviations (SD) of the baseline measured between 3 and 15 cycles (ABI Prism 7000 SDS software). For amplification specificity at the end of 40 cycles, a 20 min 60–94 °C dissociation cycle was performed (specific dissociation temperature 76 °C). The untreated control gave a typical Ct (threshold cycle value) of 21 that corresponded to 100% telomerase activity, as measured at a relative fluorescence variation threshold of 0.03. A serial dilution of the untreated control (1.0, 0.5, 0.25, 0.10, 0.03, 0.012 μ g of cell lysate) was adopted for standard curve determination (slope of typical experiment -2.069). The untreated control indicated the best performance of telomerase present in the lysate. An increase of Ct indicated a progressive reduction of telomerase activity, due to the action of the complexes directly on the semi-purified fraction or on the cells. Each sample was assayed in duplicate.

2.6. Cell viability assay

Viability was measured by using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [33], which evaluates the reduction of the tetrazolium salt by mitochondrial succinate dehydrogenase in metabolically active cells. Converted dye was dissolved in HCl-acidified isopropanol (0.1 M) and measured spectrophotometrically at 570 nm (background subtraction at 630 and 690 nm). All experiments were conducted at least in triplicate. The results are presented as means \pm standard deviation (SD). The percentage of growth inhibition was plotted against the concentration of the cluster in medium, and IC_{50} value (defined as the concentration of drug required to reduce 50% cell viability respect to untreated control) was calculated. As a control, a clonogenic or colony-counting assay was employed [34].

2.7. Platinum and osmium uptake and efflux

Exponentially growing cells were treated with 10^{-7} M cisplatin or osmium clusters (10^{-6} or 10^{-7} M). After 24, 48 and 72 h of continuous incubation, cell monolayers were washed 3 times with ice-cold saline solution (0.9% NaCl) and harvested with trypsin for metal and protein determinations. The experiments were repeated at least in triplicate.

In other experiments, in order to measure the drug efflux after 24 h of treatment at the same experimental conditions as above, the cells were rinsed twice with

fresh complete medium at room temperature, and finally re-incubated for 24 or 48 h.

Mineralization was carried out with 65% HNO_3 at 120 °C; the dry material was dissolved in 2% HNO_3 solution. The Pt or Os content was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The major isotopes of platinum and osmium were monitored at 195 and 190 *m/z*, respectively. The major isotope of indium (the internal standard) was monitored at 115 *m/z*. Cellular platinum or osmium levels are expressed as pmol complex/mg protein, where 1 mg of extracted total protein is roughly equivalent to 10^6 cells. We defined the accumulation ratio as the ratio between the intracellular osmium concentration and the osmium concentration in the culture medium; the former value was estimated approximately considering the average volume of a single cell to be about 2 pL [35].

3. Results and discussion

3.1. Effect of clusters on telomerase in a cell-free system

In the cell-free biochemical assay, all the negatively charged clusters 1a–4a were able to inhibit telomerase activity (Fig. 4). The results were calculated with respect to the untreated control. The interference of clusters on the amplification step, where *Taq* represented another DNA polymerase target, was checked (see Section 2). These tests demonstrated that 1a–4a clusters are selective for telomerase, at least as compared with *Taq* polymerase.

In particular, the 3-aminoquinoline derivative 2a was able to elicit a significant dose-dependent inhibition of the enzyme in a 10^{-7} – 10^{-5} M concentration range (58% inhibition of telomerase at 10^{-5} M, $p < 0.001$)

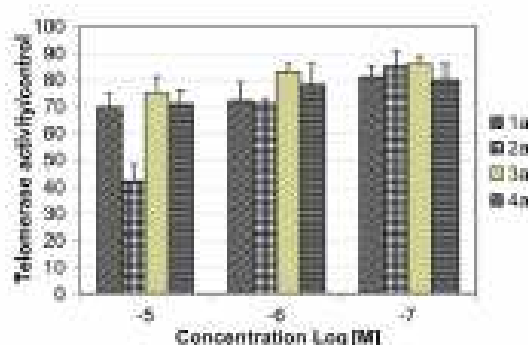


Fig. 4. Changes in telomerase activity of semi-purified enzyme in response to incubation with clusters 1a–4a at three concentrations. Telomerase activity was measured by the TRAP assay as described in Section 2. The effects of clusters under investigation on *Taq* polymerase, were also evaluated and the activity values were corrected for these interferences. The data are expressed as the mean of three independent experiments \pm SD.

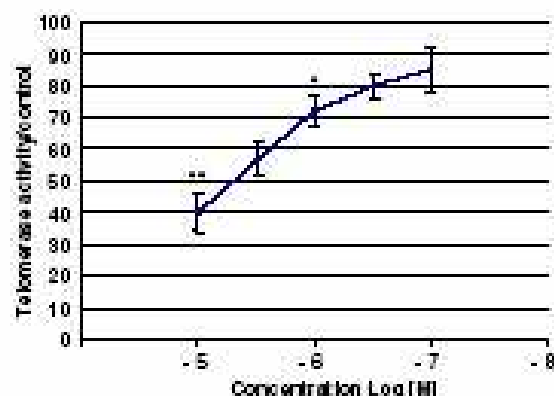


Fig. 5. Dose-dependency of the effect of cluster 2a on telomerase activity. The data are expressed as the mean of five independent experiments \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ respect to untreated controls (100%).

(Fig. 5). The amino-group in 2a probably enhances the hydrogen bond donor-acceptor interaction with the target macromolecules. On the contrary, 4a, that contains the potentially intercalating phenanthridine group, did not exhibit remarkable activity.

Interestingly, the positively charged homologues 1b–4b were found to be totally inactive in the same experimental conditions, and these compounds were not further investigated.

These data clearly suggest an electrostatic nature of the interaction of clusters 1a–4a with telomerase, and concerns the positively charged portion of the multimeric enzyme. The polymerase hTERT moiety (which is rich in basic amino acids) is the component of the enzyme where inhibition is likely operative. In fact, in hTERT telomerase reverse transcriptase there is an excess of 86 positively charged residues (mainly arginine and lysine groups) [36]. As 1a–4a clusters show a certain degree of selectivity toward telomerase as compared with *Taq* polymerase, we feel that the quinoline ligands could supply some kind of affinity for telomerase. After electrostatic attraction, the bulkiness of clusters may interfere with the enzyme activity.

3.2. Effect of clusters on telomerase activity in MCF-7 tumour cells

Log-phase growing MCF-7 cell monolayers were treated for 24 h with 10^{-7} – 10^{-5} M 1a–4a clusters, and the residual telomerase activity was evaluated after extraction and semi-purification of the enzyme. The inhibition was not significant (Fig. 6). This striking difference between the results of the two sets of experiments (i.e., on isolated or intracellular enzyme) indicates difficulty in crossing the cell membrane, entering the cell, and, finally, reaching the nucleus, where the

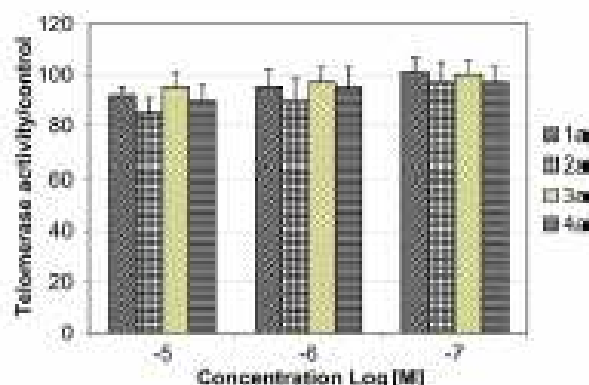


Fig. 6. Decrease in telomerase activity after 24 h treatment of the MCF-7 cells with different concentrations of clusters 1a–4a. Telomerase activity was detected by TRAP assay as described in Section 2. The data are expressed as the mean of three independent experiments \pm SD.

telomerase enzyme is active. Difficulty in crossing cell membrane is understandable for such heavy and triply charged clusters. This problem has been already documented for polyoxometalate (POM) clusters that were able to inhibit human immunodeficiency virus (HIV) protease [37]. Interestingly, these large clusters with a minus-seven charge establish electrostatic interactions with the positively charged ammonium groups of HIV protease lysine residues. Biologists are currently concerned about whether and how these POMs can be internalised into the cells [38].

3.3. Effect of clusters 1a–4a on MCF-7 viability

The effects of clusters 1a–4a on viability of MCF-7 cells were determined by MTT assay after 24 h treatment, in a concentration range of 10^{-9} – 10^{-6} M, and 48 h drug-free recovery. The percentage of growth inhibition was plotted against the concentration of the clusters in complete medium, and IC_{50} values (defined as the concentration of drug required to reduce 50% cell viability respect to the untreated control) were calculated for 1a–4a clusters as well as for cisplatin adopted as reference (Table 1). Parallel experiments based on clonogenic assay following drug exposure were also performed and

Table 1
 IC_{50} values were obtained after 24 h treatment, followed by 48 h recovery

Compound	IC_{50} (μ M)
1a	21 ± 2
2a	9 ± 1
3a	48 ± 3
4a	4 ± 0.5
Cisplatin	28 ± 1

The experimental values are means \pm SD of three independent experiments.

results confirmed those obtained from MTT assay (data not shown). The cytotoxicity of 1a–4a clusters is fairly high and similar to that of cisplatin.

3.4. Uptake of clusters 1a–4a in MCF-7 cells

We measured the whole cellular content of osmium (intact cell with membrane, cytosol and nucleus) by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), after the treatment with 2a (used as the prototype of negatively charged clusters). Since the ICP-MS technique is at least one order of magnitude more sensitive than conventional atomic absorption spectroscopy (AAS), the cells could be challenged with 2a at a concentration lower than its IC_{50} , and this allowed to follow the afflux/efflux process in long-term experiments (treatment time-points 1–72 h, concentrations 10^{-7} – 10^{-6} M). The cellular uptake of cisplatin (10^{-7} M) is reported for the sake of comparison. Figs. 7 and 8 show the cluster uptake (μ mol cluster/mg protein) and the cluster accumulation ratio (intracellular concentration/medium concentration) in MCF-7 cell line challenged with 2a at 10^{-7} and 10^{-6} M, respectively. For continuous treatment, the uptake and accumulation increased linearly, reaching an accumulation ratio of about 50 at 10^{-7} M and 28 at 10^{-6} M, after 72 h. The anti-proliferative drug cisplatin, which certainly diffuses into the cells, exhibited, after 24 h of continuous incubation, a moderate accumula-

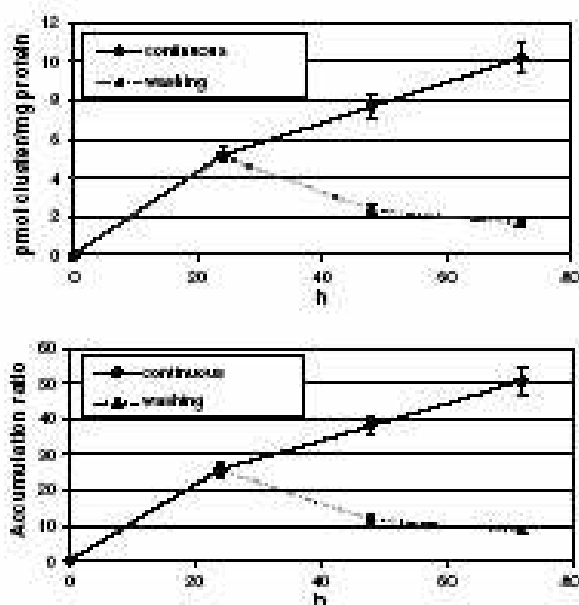


Fig. 7. Uptake-time (upper) and accumulation-time (down) curves with exposure of 0.1μ M of cluster 2a to MCF-7 cells, after 24 h the treatment with cluster is maintained or replaced with fresh medium. Means \pm SD. The absence of error bar on any particular point indicates that the size of the calculated SD is smaller than the symbol used for that point.

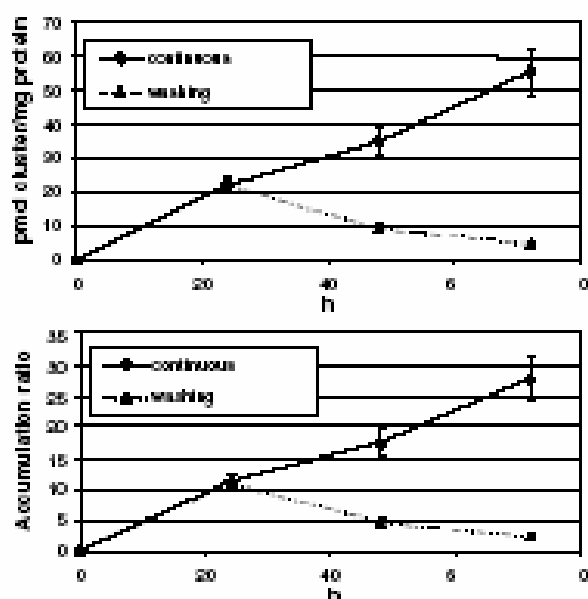


Fig. 8. Uptake-time (upper) and accumulation-time (down) curves with exposure of 1 μM of cluster 2a to MCF-7 cells, after 24 h the treatment with cluster is maintained or replaced with fresh medium. Mean \pm SD. The absence of error bar on any particular point indicates that the size of the calculated SD is smaller than the symbol used for that point.

tion ratio (4–5), that reached a sort of plateau at 48 h, and finally decreased after 72 h (Fig. 9). Moreover, cisplatin showed an accumulation ratio substantially inde-

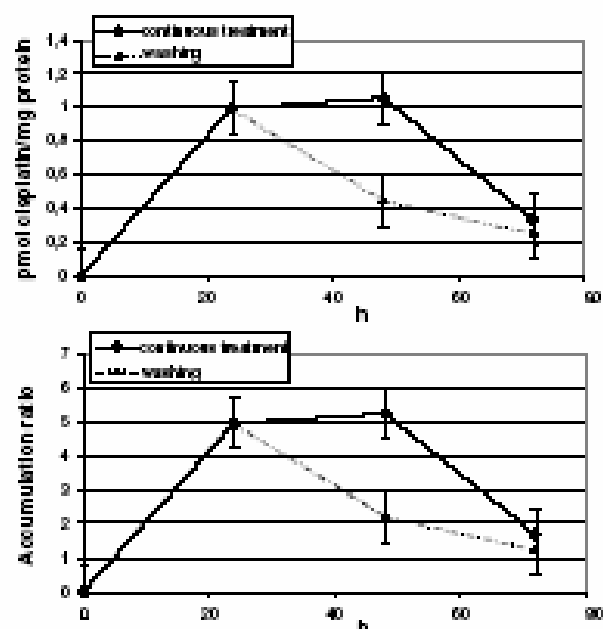


Fig. 9. Uptake-time (upper) and accumulation-time (down) curves with exposure of 0.1 μM of cisplatin to MCF-7 cells, after 24 h the treatment with cisplatin is maintained or replaced with fresh medium. Mean \pm SD.

pendent from its concentration in extracellular medium, indicating an ideal diffusion through the cell membranes [39]. This was not the case for the osmium clusters, where a roughly linear relationship between uptake/efflux and time of incubation/washing was observed. Furthermore, the increase of the accumulation ratio with the concentration of cluster in the medium suggested a possible adhesion to membrane more than an internalization [39]. This hypothesis may explain the cytotoxicity of 2a (and may be broadened to the companion clusters) as the consequence of its interference with the normal trafficking and functions of the membrane.

Acknowledgements

This work was financially supported by MIUR (Roma) within COFIN2001 project. We are indebted to Johnson Matthey (Reading, UK) for a generous loan of OsO_4 and K_2PtCl_6 . A.R.G. thanks Consorzio CIR-CMSB (Bari) for research fellowship. This research was carried out in the frame of the European Cooperation COST D20 action (metal compounds in the treatment of cancer and viral diseases) and COST B16 action (multidrug resistance reversal). Finally, we are indebted to a Referee for the useful and detailed suggestions.

References

- [1] T.R. Coch, *Angew. Chem., Int. Ed.* 39 (2000) 34–43.
- [2] E.K. Parkinson, R.F. Newbold, W.M. Keith, *Eur. J. Cancer* 33 (1997) 727–734.
- [3] J.C. Norton, M.A. Ptaszyk, W.E. Wright, J.W. Shay, D.R. Corey, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 615–619.
- [4] Y. Kondo, S. Kondo, Y. Tamaki, T. Hojji, B.P. Bama, J.K. Cowell, *Oncogene* 16 (1998) 2243–2248.
- [5] A.I. Glukhov, O.V. Zinick, S.A. Gordon, S.E. Sevin, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 248 (1998) 368–371.
- [6] C. Strahl, E.H. Blackburn, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 893–900.
- [7] Y.E. Yegorov, D.N. Chernov, S.S. Akimov, N.L. Bolikova, A.A. Kopyevsky, A.V. Zolotarev, *FEBS Lett.* 389 (1996) 115–118.
- [8] S.M. Medina, J.F. Holland, B.G. Pogo, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 693–696.
- [9] O.A. Oliveira, D.E. Gomez, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 2569–2570.
- [10] R. Wheelhouse, D. Sun, H. Han, F.X. Han, L.H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3261–3262.
- [11] E. Izidica, R.T. Wheelhouse, E. Raymond, K.K. Davidson, R.A. Lawrence, D. Sun, B.E. Windle, L.H. Hurley, D.D. Von Hoff, *Cancer Res.* 59 (1999) 639–644.
- [12] P.J. Perry, A.P. Reszka, A.A. Wood, M.A. Read, S.M. Gowan, H.S. Dossanj, J.O. Trent, T.C. Jenkins, L.R. Kelland, S. Neidle, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 4873–4884.
- [13] S.E. Hamilton, A.E. Pina, R.R. Kapilally, X. Jia, J.P. Rutter, B.A. Davins, J.W. Shay, W.E. Wright, D.R. Corey, *Biochemistry* 36 (1997) 11873–11880.
- [14] M. Foini, C. De Marco, L. Orlandi, M.G. Davidson, N. Zaffaroni, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 2137–2145.

- [15] M. Feini, G. Colella, R. Villa, S. Luschi, M.G. Dall'ora, N. Zaffaroni, *J. Invest. Dermatol.* 114 (2000) 259–267.
- [16] H. Hidaka, M. Inagaki, S. Kawamoto, Y. Suzuki, *Biochemistry* 23 (1984) 5036–5041.
- [17] J.H. Kim, G.E. Lee, S.W. Kim, I.K. Chung, *Biochem. J.* 373 (2003) 523–529.
- [18] G. Cavignolo, L. Benedetto, E. Baccalari, D. Colangelo, I. Viano, D. Osella, *Inorg. Chim. Acta* 305 (2000) 61–68.
- [19] D. Colangelo, A.L. Ghiglia, I. Viano, G. Cavignolo, D. Osella, *BioMetals* 16 (2003) 553–560.
- [20] D. Colangelo, A.L. Ghiglia, I. Viano, H. Mahboobi, A.R. Ghazi, C. Casino, D. Osella, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 61–67.
- [21] M. Furuta, K. Nomura, M. Takemura, S. Izuta, T. Murata, M. Tsuchiya, K. Yoshida, N. Taka, Y. Nimura, S. Yoshida, *Int. J. Cancer* 104 (2003) 709–715.
- [22] S. Kyo, M. Inoue, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2 (2002) 613–626.
- [23] E. Azzia, D.S. Kowale, E. Rosenberg, K. Hurdcastle, J. Ciurash, R. Dajus, R. Gobetto, L. Milone, D. Osella, M. Botta, W. Dastri, A. Viale, J. Fiedler, *Organometallics* 17 (1998) 415–426.
- [24] M.J. Abedin, B. Bergman, R. Holmquist, R. Smith, E. Rosenberg, J. Ciurash, K.I. Hurdcastle, J. Roe, V. Vazquez, C. Roe, S.E. Kabir, B. Roy, S. Alam, K.A. Azam, *Coord. Chem. Rev.* 190–192 (1999) 975–1002.
- [25] B. Bergman, R.H. Holmquist, R. Smith, E. Rosenberg, K.I. Hurdcastle, M. Vici, J. Ciurash, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 12818–12828.
- [26] R. Smith, E. Rosenberg, K.I. Hurdcastle, V. Vazquez, J. Roh, *Organometallics* 18 (1999) 3519–3527.
- [27] A.B. Din, B. Bergman, E. Rosenberg, R. Smith, W. Dastri, R. Gobetto, L. Milone, A. Viale, *Polyhedron* 17 (1998) 2035–2038.
- [28] E. Rosenberg, M.J. Abedin, D. Rokhsara, A. Viale, W. Dastri, R. Gobetto, L. Milone, K.I. Hurdcastle, *Inorg. Chim. Acta* 334 (2002) 343–354.
- [29] E. Rosenberg, M.J. Abedin, D. Rokhsara, D. Osella, L. Milone, C. Neri, J. Fiedler, *Inorg. Chim. Acta* 300–302 (2000) 769–777.
- [30] E. Rosenberg, F. Spada, K. Sugden, B. Martin, L. Milone, R. Gobetto, A. Viale, *J. Organomet. Chem.* 668 (2003) 51–58.
- [31] N.W. Kim, M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, J.W. Shay, *Science* 266 (1994) 2011–2015.
- [32] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, B.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klapper, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [33] T. Mourant, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63.
- [34] J.M. Brown, *Oncol. Rep.* 9 (1997) 213–215.
- [35] H. Reile, G. Bernhardt, M. Koch, H. Schoenberger, M. Hollstein, F. Lux, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 30 (1992) 113–122.
- [36] T.M. Nakamura, G.B. Morin, K.B. Chapman, S.L. Wernick, W.H. Andrews, J. Lingner, C.B. Harley, T.R. Coch, *Science* 277 (1997) 935–939.
- [37] D.A. Judd, J.H. Nentjes, N. Nevins, J.P. Snyder, D.C. Lima, J. Tang, J. Emrleiff, R.F. Shinazi, C.L. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 886–897.
- [38] S. Berman, *Chem. Eng. News* 79 (2001) 55–56.
- [39] A.R. Ghazi, M. Azzia, C. Casino, E. Gobetto, D. Osella, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 73–78.

PARTE 2

Correlazione tra chemioterapia ed attività della telomerasi
in campioni biologici di neoplasie polmonari

INTRODUZIONE 2

2.1. Telomerasi ed approccio terapeutico alle neoplasie polmonari

2.1.1. Le neoplasie polmonari

Il carcinoma polmonare è la tipologia neoplastica più frequente nella popolazione mondiale. Nei paesi industrializzati è attualmente la prima causa di morte per cancro.

In Europa si registrano mediamente circa 350.000 nuovi casi all'anno ed il tasso di mortalità annuale medio supera il 90% (Tyczynski J.E. et al, 2003). La situazione italiana registra un andamento coerente con gli altri paesi del nord Europa, con circa 35.000 nuovi casi all'anno, un tasso di mortalità molto elevato ed una distribuzione che dimostra un prevalenza nel maschio di circa 5 volte.

All'interno del territorio italiano, vi sono delle differenze significative tra varie le regioni, oltre ad una distribuzione differenziata all'interno delle regioni stesse. La situazione piemontese indica una preoccupante incidenza soprattutto nelle aree lungo l'asse verbanese-novarese-alessandrino che è superiore al 30% rispetto alle altre province (Figura 2.1.1.a.).

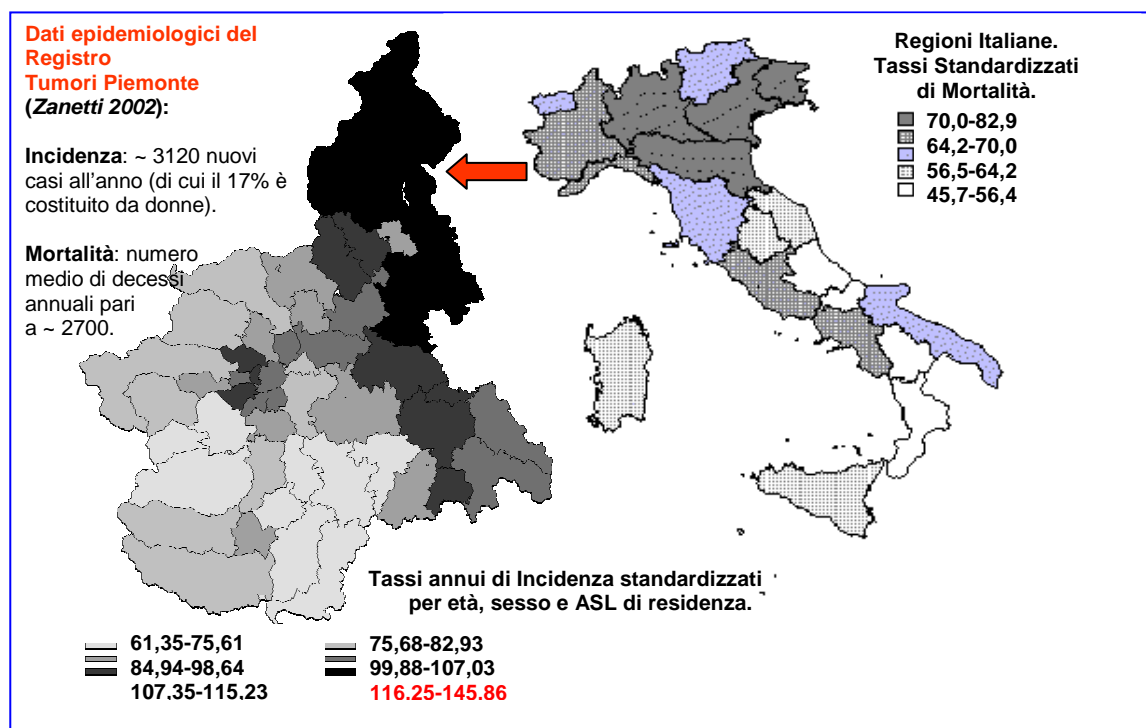


Figura 2.1.1.a. Epidemiologia delle neoplasie polmonari in Italia. I tassi di mortalità sono elevati nelle zone a Nord del Paese (Lombardia, Emilia, Veneto e Friuli) quindi nelle regioni più industrializzate e valori più bassi si registrano al Sud. Specificamente in Piemonte, i tassi di mortalità risultano superiori a Nord nelle zone del novarese, vercellese, biellese. (M. Nosenzo, G. Tassi "Percorsi Diagnostico-Terapeutici in Pneumologia"-EdiAipo 2000).

Nonostante gli sforzi per migliorare la sopravvivenza in pazienti con neoplasie polmonari, la sopravvivenza media negli ultimi 30 anni non è variata in modo significativo e rimane di circa il 15% a 5 anni dalla diagnosi. Il carcinoma polmonare ha massima incidenza tra la quinta e la settima decade di vita. Alla diagnosi, l'età media dei pazienti è di 60 anni; oltre un terzo dei nuovi casi è diagnosticato in soggetti di età superiore ai 70 anni.

L'eziopatogenesi delle neoplasie polmonari è molto complessa e, pur non essendo ancora stati riconosciuti dei meccanismi specifici, sono stati individuati alcuni fattori predisponenti probabilmente implicati nella cancerogenesi (Figura 2.1.1.b.). Tra questi i più significativi sembrano essere il tabagismo, sia attivo che passivo, una componente genetica e l'esposizione a noti cancerogeni ambientali. Grande rilevanza è stata data al fumo di sigaretta, dato che circa il 90% dei tumori polmonari è correlata al tabagismo. Attualmente si stima che il 20% della popolazione degli attuali fumatori svilupperà neoplasia polmonare.

In linea generale, coloro che hanno fumato per molti anni, hanno un rischio di sviluppare una neoplasia polmonare, che è circa 20-30 volte maggiore rispetto a chi non ha mai fumato ed anche l'esposizione al fumo passivo che contiene un'alta concentrazione di composti cancerogeni, come ad esempio idrocarburi aromatici policiclici, nitrosamine e amine aromatiche, aumenta notevolmente il rischio.

Un dato interessante è che il fumo di sigaretta aumenta in generale la probabilità di sviluppo di tutti i tipi istologici di neoplasia polmonare ma in particolare la sua azione è legata alla comparsa di tumori a cellule squamose e di tumori a piccole cellule (Papi et al., 2004), mentre anche il fumo passivo sembrerebbe aumentare il rischio soprattutto per il carcinoma squamocellulare (Rachtan et al., 2002).

Sebbene si cerchi di associare determinate lesioni polmonari con familiarità o mutazioni genetiche, la questione rimane ancora controversa (Matakidou et al., 2005, Wood et al., 2000).

L'esposizione prolungata all'asbesto, a metalli come il nickel, l'arsenico, il cadmio, il cromo, il radon, a minerali radioattivi (uranio, radio, torio, plutonio), è sicuramente associata all'alta probabilità di sviluppare una neoplasia polmonare. Questi fattori seppur rilevanti, specie se associati al fumo di sigaretta (Kiyohara et al., 2004), hanno rispetto a quest'ultimo, un'incidenza epidemiologica decisamente meno significativa.

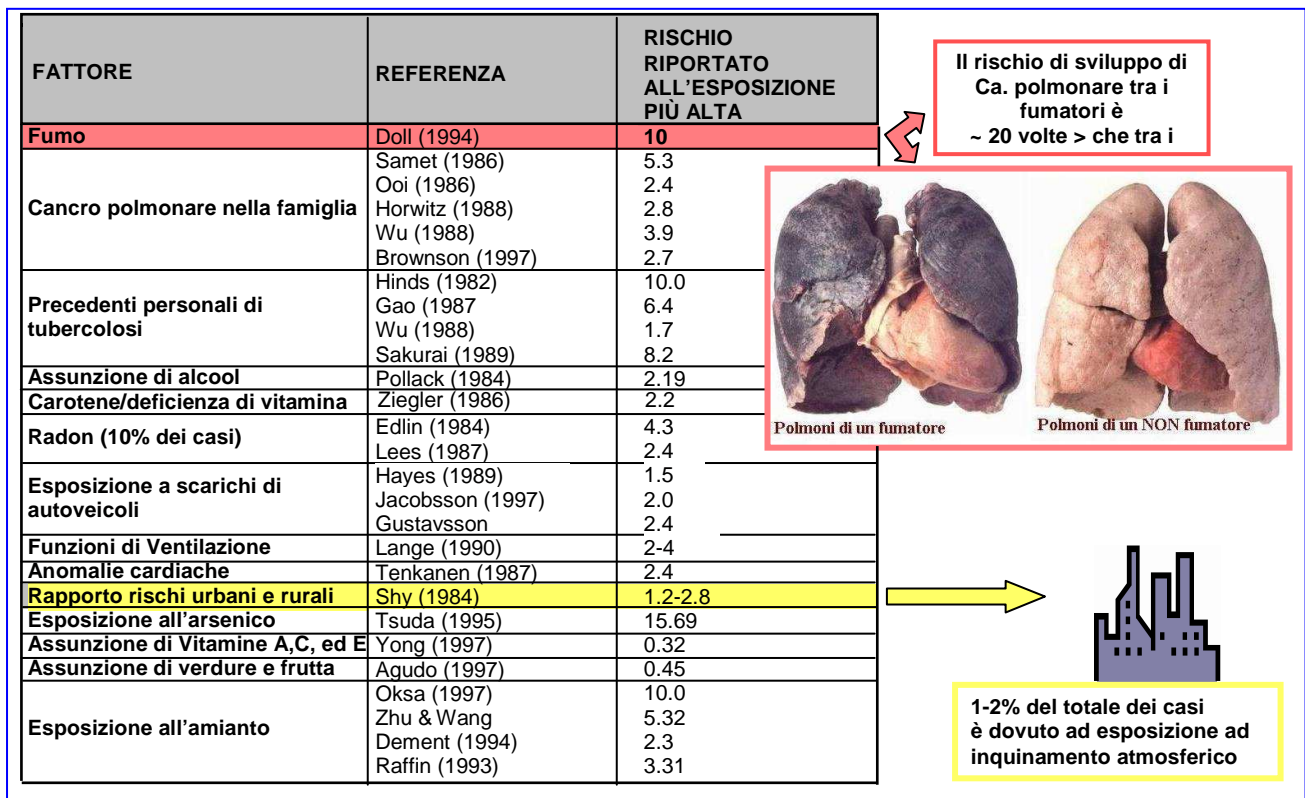


Figura 2.1.1.b. Fattori di rischio per neoplasie polmonari. L'eziopatogenesi è multifattoriale. Molti sono gli studi sui fattori di rischio per neoplasie polmonari da cui è emerso il ruolo indiscusso del fumo. In generale, il contributo dei fattori ambientali allo sviluppo di neoplasie polmonari è ridotto. (M. Nosenzo, G. Tassi "Percorsi Diagnostico- Terapeutici in Pneumologia"-EdiAipo 2000).

L'evoluzione delle patologie polmonari è strettamente correlata sia con lo stadio di sviluppo della neoplasia stessa che con la tipologia tissutale.

La precocità della diagnosi, infatti, condiziona pesantemente le aspettative di vita del paziente, in quanto molte volte la sintomatologia è presente soprattutto nello stadio avanzato.

Per questo motivo è molto importante il ruolo della prevenzione. Al di là delle raccomandazioni generiche per ridurre i rischi connessi all'esposizione cronica al fumo di sigaretta e ai contaminanti ambientali, molto può essere fatto per migliorare le capacità diagnostiche e prognostiche. Sebbene in altre patologie siano stati proposti screening al fine di aumentare la precocità della diagnosi nella popolazione asintomatica, come ad esempio nel caso delle patologie mammarie, ginecologiche e prostatiche, per quanto riguarda le neoplasie polmonari vi sono indicazioni contrastanti. L'interesse dell'ambiente scientifico in questo campo è molto alto visto il grande impatto della malattia nel mondo (American Cancer Society, 2002; Eijkemans et al, 2005). Il trattamento più efficace di una neoplasia polmonare rimane la resezione chirurgica ad uno stadio iniziale di malattia (Bach et al, 2003). Tuttavia ad oggi, solo sporadicamente e spesso casualmente si ottengono diagnosi precoci di tumore polmonare. Un test di screening è fortemente voluto per riuscire a trattare in fase

preclinica la malattia e modificarne la storia naturale, finora estremamente infausta. Si stima che la sopravvivenza a 5 anni sia superiore all'80 % quando la neoplasia polmonare viene asportata chirurgicamente prima che raggiunga un diametro di 20 mm (Patz et al, 2000)

Gli studi condotti sino ad oggi prevedono l'applicazione delle tre principali tecniche di screening:

1. citologia dell'escreato
2. esame radiografico del torace tradizionale (RX)
3. TC spirale, a bassa emissione

Solo recentemente, a tale riguardo, da alcuni studi eseguiti su soggetti ad alto rischio è emersa l'efficacia dell'applicazione di TC Spirale e PET come screening, ma la soluzione del problema diagnostico rimane ancora lontana (Pastorino et al., 2003).

La ricerca di tecniche d'indagine non invasive e l'ottimizzazione del rapporto costo-beneficio, inoltre sono i principali criteri da rispettare nello sviluppo di nuove metodiche diagnostiche.

Il successo terapeutico dipende dalla precocità della diagnosi e dalla scelta della corretta terapia.

2.1.2. Anatomia Patologica delle Neoplasie Polmonari

2.1.2.1. Aspetti generali

Dal punto di vista macroscopico, è possibile descrivere alcune forme principali di carcinomi broncopolmonari ed in particolare:

1. Tumori Centrali o dei grandi bronchi.
2. Tumori periferici (originano dai segmenti distali delle vie aeree ossia da piccoli bronchi, bronchioli e alveoli).
3. Tumori diffusi (talora quadri evolutivi avanzati di tumori primitivamente centrali o periferici).

Osservazioni epidemiologiche indicano che i tumori centrali rappresentano circa i 2/3 dei casi, con solo 1/3 di neoplasie periferiche. La casistica autoptica sta però segnalando un graduale aumento di neoplasie periferiche.

2.1.2.2. Istotipi tumorali: aspetti macroscopici e microscopici

La classificazione anatomo-patologica proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, World Health Organization) suddivide i tumori del polmone sostanzialmente in:

- √ **Carcinoma Squamocellulare:** papillare; a cellule chiare; a piccole cellule; basalioidi
- √ **Carcinoma a Piccole cellule:** a cellule a chicco d'avena; a cellule intermedie (più voluminose); forma combinata
- √ **Adenocarcinoma:** acinare; papillare; carcinoma bronchiolo-alveolare (non-mucinoso, mucinoso, combinato); solido; adenocarcinoma comprendente sottotipi misti (mucinoso, cistoadenocarcinoma; mucinoso, a cellule chiare,..)
- √ **Carcinoma a Grandi cellule:** neuroendocrino a grandi cellule; basalioidi; tipo linfoepitelioma; a cellule chiare
- √ **Carcinoma Adenosquamoso**
- √ **Carcinoma con elementi pleomorfici, sarcomatosi o sarcomatoidi**
- √ **Tumore Carcinoide:** tipico (90%); atipico (10%)

La suddivisione in istotipi tumorali deriva da una più importante derivazione istologica. A causa della diversità istologica anche i geni alla base della progressione tumorale sono differenti e svolgono un importante ruolo nella manifestazione nelle patologie stesse. La Figura 2.1.2.2. schematizza sinteticamente il tessuto di derivazione e alcuni dei geni che appaiono più coinvolti nelle varie fasi di progressione di istotipo tumorale.

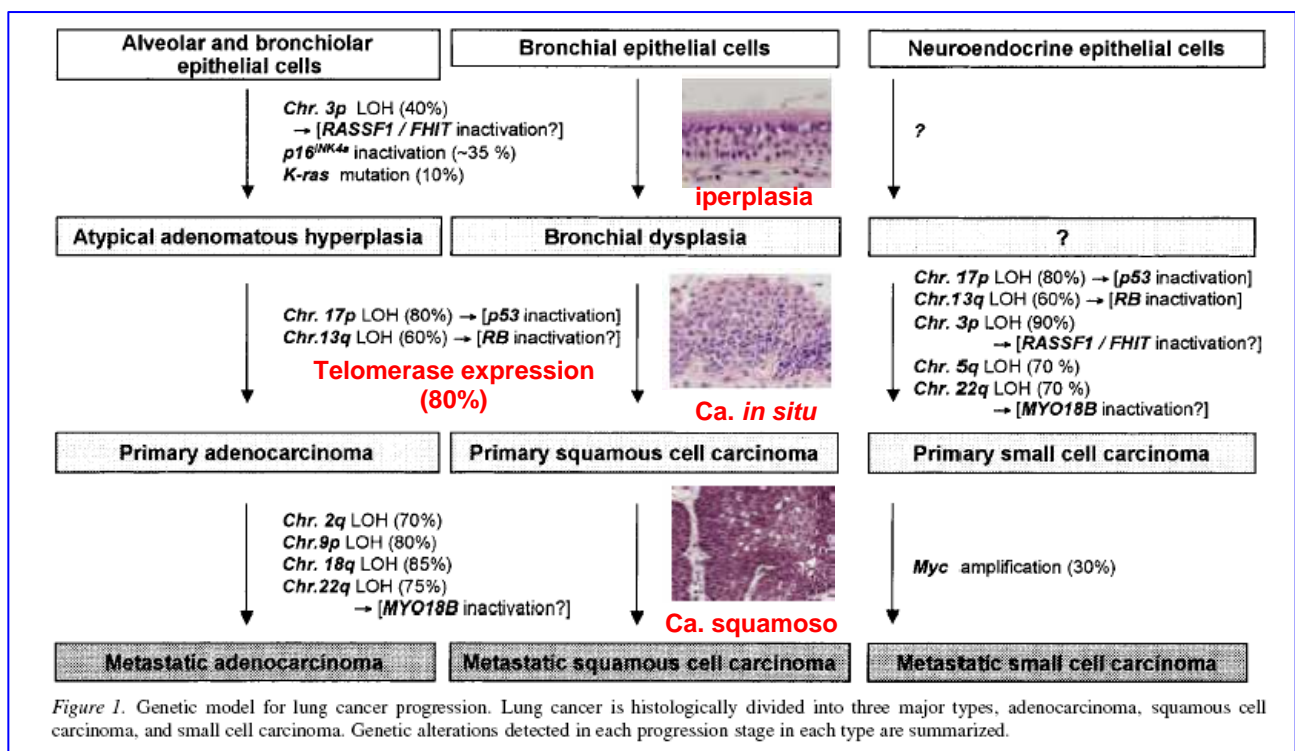


Figura.2.1.2.2. Stadi di progressione del tumore polmonare. La progressione della neoplasia polmonare avviene secondo un processo multistadio che prevede la trasformazione del tessuto sano a iperplastico, metaplastico, displastico fino a tumorale *in situ* e in ultimo metastatico. Ogni step è associato a specifiche mutazioni geniche e di regolazione cellulare. Fondamentale nel fenomeno di progressione tumorale risulta essere l'espressione dell'enzima telomerasi, evidenziabile nell'80% dei tumori polmonari. L'analisi dei campioni di tumore polmonare ha dimostrato infatti un'attivazione della telomerasi nel 100% dei casi di SCLC e l'85% di NSCLC e tale fenomeno risulta essere un evento precoce nella patogenesi a più stadi di carcinomi polmonari. (Yokota J. et al., 2004).

Molti degli studi finora condotti sulla neoplasia polmonare hanno permesso di dimostrare che esistono delle mutazioni a carico di geni soppressori ed oncogeni tipici. Sebbene non esista una chiara correlazione tra singoli geni e sviluppo della patologia, sembra essere importante il ruolo che si può attribuire a mutazioni e amplificazioni di alcuni geni, almeno *in vitro* in linee cellulari derivati dal carcinoma polmonare. In particolare le alterazioni di p53, p16, KRAS, myc sembrano ricorrere più frequentemente.

Carcinoma Squamocellulare. Il 30% circa delle neoplasie polmonari sono carcinomi squamocellulari. È un tumore che può presentarsi con diversi gradi di differenziazione (altamente, moderatamente o scarsamente differenziato). Le cellule che lo costituiscono sono disposte in lamine su più strati variamente irregolari. Le caratteristiche citologiche le fanno identificare come elementi di epitelio pavimentoso: la forma poligonale, fusata, la presenza di tonofibrille e/o segni di corneificazione con vere e proprie perle cornee nelle forme più differenziate. Questo tipo di tumore, più comunemente di altri, è responsabile di sindromi paraneoplastiche da produzione di peptide paratormone-simile. La sua presentazione macroscopica più frequente, è quella del tumore centrale, ilare.

Si ritiene che si accresca abbastanza lentamente e in alcuni casi è stato possibile valutare un tempo di raddoppiamento della massa tumorale di circa 200 giorni, un periodo piuttosto lungo. È un tumore che può dare metastasi: sono più frequenti nei linfonodi regionali (lobari, ilari, mediastinici), ma anche la diffusione ematica è possibile.

È l'istotipo maggiormente in rapporto con l'abitudine del fumo. Rappresenta il 30-40 % della casistica chirurgica.

Carcinoma a Piccole Cellule. Rappresenta circa il 25% delle neoplasie polmonari. L'aspetto microscopico caratteristico è quello di ammassi e lamine cellulari con limiti epitelio-stromali meno netti che nel Carcinoma squamoso. Le cellule neoplastiche sono tondeggianti o allungate e di dimensioni di poco superiori a quelle di un linfocita (6-15 μm), con nuclei ovoidali o fusiformi e scarso citoplasma. L'atteggiamento è infiltrante, con necrosi e mitosi. Esistono granuli citoplasmatici di tipo neuroendocrino: infatti le cellule originerebbero dalla cresta neurale e farebbero parte del sistema APUD, con possibilità di sintetizzare ormoni peptidergici. Nel siero del sangue dei portatori di questo tumore è rilevabile la presenza di un enzima, la enolasi neuronospecifica (NSE). Solitamente non si riscontrano squilibri ormonali data la secrezione di sostanze inattive. È possibile però l'insorgenza di sindromi legate alla secrezione ectopica di ormoni quali ACTH (ormone adreno-corticotropo), Calcitonina, Vasopressina.

Macroscopicamente è un tumore a localizzazione prevalentemente centrale, ilare o parailare. Precocemente da coinvolgimento linfonodale, con adenopatia ilo-mediastinica evidente spesso alla diagnosi. Rapida è poi la sua diffusione per via ematica con embolizzazione diffusa e quadri di carcinosi generalizzata.

Questo è un istotipo frequente nei fumatori.

Rappresenta il 5-15 % della casistica chirurgica. La percentuale è molto bassa soprattutto perché questo tumore è clinicamente molto maligno e spesso non è più curabile al momento della diagnosi.

Carcinoma a Grandi cellule. Indicato come carcinoma anaplastico, rappresenta il 15 % dei tumori polmonari. Raggruppa le forme più polimorfe di neoplasie, con cellule voluminose e nuclei molto irregolari disposte in accumuli o isole. La divisione nelle due varianti, a cellule giganti e a cellule chiare, non ha significato clinico. Sono anaplastici in genere, i grossi tumori a palla e quelli vegetanti nei bronchi segmentari. L'accrescimento è abbastanza rapido con tendenza infiltrante su ilo e mediastino. Si valuta, per un cancro anaplastico, un tempo di raddoppiamento della massa di circa 60-80 giorni. E causa di metastasi sia per via linfatica che ematica con maggior frequenza rispetto per esempio, al carcinoma squamocellulare. È frequente nei fumatori. Data la aggressività, è l'istotipo di più raro riscontro nelle casistiche chirurgiche (5-15 % del totale).

Adenocarcinoma . È l'istotipo che caratterizza circa il 40% delle neoplasie polmonari. Le cellule tumorali hanno origine dall'epitelio di superficie o dalle ghiandole della mucosa bronchiale e danno vita alla formazione di strutture ghiandolari con o senza produzione di muco. Talora sono evidenti cellule ad anello con castone (nucleo in periferia e muco abbondante nel citoplasma). Abbastanza frequente è il riscontro di forme miste adenosquamose.

La sede di sviluppo preferenziale di questa neoplasia è la periferia polmonare, localizzazione che permette al tumore di rimanere asintomatico anche per lungo tempo e di essere scoperto talora per caso. L'aspetto macroscopico è quello di una massa rotondeggiante di volume solitamente modesto e per questo clinicamente asintomatico.

Purtroppo, oltre alla metastatizzazione linfatica, il tumore dà metastasi per via ematica e talvolta queste localizzazioni secondarie sono responsabili dei primi sintomi di malattia.

È il tumore meno legato all'abitudine del fumo e quindi è abbastanza frequente nelle donne e nei non fumatori.

Nelle casistiche chirurgiche ha una frequenza pari al 35 % circa.

Carcinoma Bronchiolo-alveolare. È un tumore piuttosto raro (2.5 % del totale) che viene incluso tra le varianti istologiche di un adenocarcinoma. Si ipotizza che le cellule neoplastiche possano derivare dall'epitelio bronchiolare, dalle cellule alveolari di tipo II, dalle cellule di Clara o dall'epitelio bronchiale mucosecernente. Istologicamente si osservano cellule cubiche che rivestono gli alveoli, i cui setti appaiono conservati. Tali cellule disposte in fila si sollevano a volte, a formare papille o pseudocisti ripiene di muco. La scarsità di mitosi e l'assenza di distruzione dell'impalcatura del polmone l'aveva fatto ritenere in passato un tumore relativamente benigno, ma invece si tratta di un vero e proprio carcinoma.

Macroscopicamente si presentano come forme di tipo diffuso, il cui aspetto radiologico è molto simile a quello di una broncopneumonia. Il tumore è caratterizzato dall'estensione lobare senza netta delimitazione e ha insorgenza multifocale. Dopo la sua resezione non è raro assistere alla recidiva nello stesso polmone o in quello controlaterale. Raramente dà metastasi ma ha prognosi infausta.

Tumore Carcinoide . Può essere considerato come tumore bronco-polmonare a lento sviluppo e di relativa benignità, pur con la possibilità di dare metastasi a distanza.

Deriva dalle cellule di Kulchitzky, originate dalla cresta neurale e sparse in tutti i tessuti derivati dal primitivo canale endodermico (intestino e albero tracheo-bronchiale). Sono cellule con capacità di sintesi ormonale e i tumori che ne derivano rientrano nel gruppo degli Apudomi, più o meno ormono-secernenti.

Microscopicamente il tumore appare formato da cordoni, palizzate e rosette di cellule piccole, con nucleo rotondo e regolare. Sono cellule caratterizzate dalla presenza di granuli citoplasmatici di tipo neuroendocrino. La maggior parte esprime enolasi neuro-specifica (NSE) e cromogranina A. Le mitosi sono scarse e la necrosi è assente. Nel complesso il tessuto polmonare mantiene la sua identità, la struttura istologica è mantenuta. Solitamente, il tumore carcinoide appare come una vegetazione moriforme, facilmente sanguinante, che sporge in un bronco lobare o segmentario. È una neoplasia che può secernere serotonina: ciò accade raramente (5% dei casi) ma è evidente quando il tumore è voluminoso o vi sono grosse metastasi.

Nelle forme "tipiche" di carcinoide, le metastasi linfonodali sono presenti solo nel 10-15 % dei casi e non vi sono segni di invasività. Nelle forme "atipiche", nel 50% dei casi a sede periferica, si segnalano metastasi linfonodali (linfonodi ilari) o a distanza (fegato) nel 50-70 % dei casi. Nel complesso la prognosi è migliore rispetto ai carcinomi bronchiali.

2.1.3. Stadiazione delle neoplasie polmonari

Una volta ottenuta la diagnosi cito-istologica di neoplasia polmonare, è necessario andare a valutare l'esatta estensione della malattia e cioè andare a definirne una classificazione clinica in Stadi.

Possedere un valido sistema di classificazione dei tumori è da sempre un'esigenza avvertita dai medici che si occupano di queste patologie, in modo da poter disporre di uno strumento che, raggruppando i pazienti in gruppi omogenei, possa essere utile per una programmazione terapeutica più appropriata, una formulazione prognostica più precisa e un confronto dei risultati delle diverse casistiche.

2.1.3.1 Il Sistema TNM

Il sistema più utilizzato per descrivere l'estensione di malattia neoplastica è il **TNM**. Questo è un metodo di stadiazione i cui principi di base sono applicabili a tutte le sedi anatomiche. Le categorie della classificazione TNM sono definite clinicamente e possono, in un secondo tempo, essere ridefinite da ulteriori informazioni ottenute con l'esame istopatologico e/o con la chirurgia. La classificazione TNM descrive l'estensione anatomica del tumore, basandosi sulla valutazione di tre componenti:

T - identifica l'estensione del tumore primitivo.

N - identifica l'estensione di metastasi nei linfonodi regionali.

M - identifica l'assenza o la presenza di metastasi a distanza.

L'aggiunta di numeri a queste tre componenti indica l'estensione del tumore, cioè:

- T0, T1, T2, T3, T4

- N0, N1, N2, N3

- M0, M1

Tutti i casi devono essere confermati istologicamente.

Per ogni sede sono descritte due classificazioni, cioè:

a) **Classificazione clinica** (Classificazione clinica pre-trattamento), indicata come **TNM** (o cTNM). Essa è basata sui dati raccolti prima del trattamento, attraverso l'esame obiettivo, le tecniche d'immagine, l'endoscopia bronchiale, le biopsie ed altri esami specifici.

b) **Classificazione patologica** (Classificazione istopatologica o post-chirurgica) indicata come **pTNM**. Essa è basata sui dati derivati dall'intervento chirurgico e dagli esami isto-patologici sul pezzo operatorio. La valutazione patologica del tumore primitivo (pT) implica l'asportazione del tumore primitivo od una biopsia

tale da consentire la determinazione della più alta categoria pT. La valutazione patologica dei linfonodi regionali (pN) richiede la rimozione e l'esame di un numero sufficiente di linfonodi; per ogni linfadenectomia è indicato il numero minimo di linfonodi necessario per definire correttamente la categoria pN.

L'accertamento patologico di metastasi a distanza (pM) implica l'esame microscopico. La classificazione patologica non sostituisce quella clinica. A queste informazioni si possono aggiungere quelle derivate dall'analisi microscopica circa il grado di differenziazione cellulare, il Grading istopatologico (Tabella 2.1.3.1.). Esso si basa sull'analisi di tre parametri: differenziazione citologica delle cellule tumorali, numero di mitosi e presenza di atipie nucleari.

GX	Il grado di differenziazione non può essere definito.
G1	Ben differenziato.
G2	Moderatamente differenziato.
G3	Poco differenziato.
G4	Indifferenziato.

Tabella 2.1.3.1. Quadro complessivo relativo al "Grading" tumorale

I gradi 1 e 2 possono essere raggruppati come neoplasie a "basso grado" di malignità, i casi 3 e 4 possono essere raggruppati come ad "alto grado". Il "grading" ha importante valore prognostico.

Dopo aver definito le categorie T, N e M e/o pT, pN e pM queste possono essere raggruppate in stadi.

La classificazione TNM è un sistema duale che consiste in una stadiazione clinica (pre-trattamento, cTNM o TNM) e una stadiazione patologica (post-chirurgica, o pTNM).

La stadiazione clinica è utile per discutere le indicazioni al trattamento primario, la stadiazione patologica è utile per avere informazioni sulla prognosi e può essere anche utilizzata in alcuni casi per decidere l'impiego di una terapia adiuvante. Gli stadi sono indicati con i numeri: 0, I, II, III, IV.

Il carcinoma *in situ* è considerato stadio 0, i casi con metastasi a distanza sono considerati di stadio IV. La stratificazione adottata è tale da assicurare, per quanto possibile, che ogni stadio sia abbastanza omogeneo nei confronti della sopravvivenza.

2.1.3.2. Il Sistema TNM e la neoplasia polmonare

In specifico, parlando di carcinomi polmonari, è necessario avere prima di tutto la verifica istologica del tumore e i casi vanno considerati separatamente in base al tipo istologico.

La classificazione TNM aggiornata sino alla sua quinta edizione prevede:

Classificazione clinica e patologica (Sobin et al., 1997) (le categorie pT, pN e pM corrispondono alle categorie T, N e M)

T- Tumore primitivo

TX	Il tumore primitivo non può essere definito, oppure ne è provata l'esistenza per la presenza di cellule atipiche nell'escreato o nel liquido di lavaggio bronchiale, ma non è visualizzato con le tecniche per immagini o con la broncoscopia
T0	Non segni del tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumore di 3 cm o meno nella sua dimensione massima, circondato da polmone e da pleura viscerale, e alla broncoscopia non si rilevano segni d'invasione più prossimale del bronco ilare (per esempio non nel bronco principale).
T2	Tumore con una qualsiasi delle seguenti caratteristiche di dimensione o estensione: - superiore a 3 cm nella dimensione massima - interessamento del bronco principale, 2 cm o più distalmente dalla carina - invasione della pleura viscerale - associato ad atelectasia o polmonite ostruttiva che si estende alla regione ilare, ma non interessa il polmone in toto
T3	Tumore di qualunque dimensione che invade direttamente una delle seguenti strutture: parete toracica (inclusi i tumori del sulcus superiore), diaframma, pleura mediastinica, pericardio parietale; oppure tumore del bronco principale a meno di 2 cm distalmente alla carina, ma senza interessamento della carina stessa; oppure associato ad atelectasia o polmonite ostruttiva in toto
T4	Tumore di qualunque dimensione che invade direttamente una delle seguenti strutture: mediastino, cuore, grossi vasi, trachea, esofago, corpi vertebrali, carina; oppure nodulo(i) neoplastico(i) separato(i) nello stesso lobo oppure tumore con versamento pleurico maligno

Il poco frequente tumore a diffusione superficiale di qualunque dimensione, con la sua componente invasiva limitata alla parete bronchiale, che può estendersi prossimalmente al bronco principale, è classificato come T1. La maggior parte dei versamenti pleurici associati al carcinoma polmonare è dovuta alla neoplasia. Tuttavia in alcuni pazienti si hanno esami citopatologici del liquido pleurico (non ematico e non essudativo) ripetutamente negativi. Quando questi dati ed il giudizio clinico indicano che il versamento non è neoplastico, esso dovrebbe essere escluso come elemento per la stadiazione ed il paziente deve essere classificato

come T1, T2 o T3. La categoria T2 include sia il tumore che infiltra la membrana elastica della pleura viscerale che il tumore presente sulla superficie della pleura viscerale

N - linfonodi

NX	I linfonodi regionali non possono essere definiti
N0	Assenza di metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi nei linfonodi omolaterali peribronchiali e/o omolaterali ilari e intrapolmonari, comprendendo anche l'interessamento per estensione diretta
N2	Metastasi in linfonodi mediastinici omolaterali e/o sottocarinali
N3	Metastasi nei linfonodi mediastinici controlaterali, negli ilari controlaterali, negli scalenici o nei sovraclaveari omo- o controlaterali

L'esame istologico di un pezzo operatorio ottenuto con una linfadenectomia ilare o mediastinica include di norma 6 o più linfonodi.

I **linfonodi regionali** sono quelli intratoracici, scalenici, e sovraclaveari.

I **linfonodi intratoracici** comprendono:

- **Linfonodi mediastinici:** mediastinici superiori, paratracheali, pretracheali, mediastinici anteriori, retrotracheali, tracheobronchiali (paratracheali inferiori), sottoaortici (finestra aortica), para-aortici (aorta ascendente), sottocarenali, paraesofagei (sotto la carina), del legamento polmonare.
- **Linfonodi peribronchiali ed ilari:** ilari (del bronco principale), interlobari, lobari, segmentari, subsegmentari.

M- metastasi

MX	La presenza di metastasi a distanza non può essere definita
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Presenza di metastasi a distanza sono compresi noduli neoplastici (unici o multipli) separati in un altro lobo (omo- o controlaterale)

Le informazioni riguardanti la presenza di metastasi da neoplasia polmonare, sono ottenibili dalla valutazione della TC addome completo ed encefalo e dell'esame scintigrafico "total body" che segnala eventuali secondarismi ossei. Questa indagine utilizza, come mezzo rilevatore, dei composti fosfatici marcati con ^{99m}Tc (Tecnezio) che vengono captati dal tessuto osseo. La loro deposizione va a riflettere l'entità dei fenomeni osteoblastici ossei. La deposizione del radiofarmaco avviene entro un'ora dalla somministrazione e

le aree di ipercaptazione corrispondono ad un aumento dell'attività osteoblastica che accompagna i fenomeni di osteolisi metastatica.

Se necessario è possibile ricorrere alla PET (Giorgetti et al., 2002) ovvero una tecnica diagnostica medico-nucleare che utilizza radioisotopi emettenti positroni (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F) che possono essere incorporati dai composti organici senza alterarne le caratteristiche biochimiche. Essi permettono l'acquisizione di immagini a carattere biochimico-metabolico. La rilevazione della captazione dell' ^{18}F -deossiglucosio associata al metabolismo glucidico, è un efficace mezzo di dimostrazione della presenza di tessuto vitale.

2.1.3.3. Stadiazione TNM del carcinoma polmonare

La definizione dei vari parametri (T, N, M) consente di attribuire a ogni paziente uno stadio clinico o patologico di malattia, come schematicamente illustrato nella Tabella 2.1.3.3.

Carcinoma occulto	TX	N0	M0
Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio IA	T1	N0	M0
Stadio IB	T2	N0	M0
Stadio IIA	T1	N1	M0
Stadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadio IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadio IIIB	ogni T	N3	M0
	T4	ogni N	M0
Stadio IV	ogni T	ogni N	M1

Tabella 2.1.3.3. Quadro clinico complessivo determinato come livello di "stadiazione"

Per quanto riguarda la stadiazione del tumore polmonare a piccole cellule (Micke et al, 2002), la dizione comune prevede la differenziazione in:

- **Malattia limitata:** endotoracica con o senza metastasi linfonodali omolaterali e controlaterali mediastiniche e sovraclaveari, con o senza versamento pleurico omolaterale.
- **Malattia estesa:** ogni sede di malattia oltre alla definizione di malattia limitata.

2.1.4. Fattori Prognostici

Sono caratteristiche legate alla neoplasia ed al paziente, in grado di condizionare l'evoluzione della malattia o di influenzare l'esito di un trattamento. I fattori determinanti la prognosi dopo l'intervento chirurgico

di tumore polmonare comprendono lo stadio di malattia (dimensioni del tumore e la presenza o meno di metastasi linfonodali), la classificazione patologica, il tipo istologico (l'epidermoide, un tipo di NSCLC ben differenziato è il più favorevole), stato di validità clinica della persona (*performance status*), la presenza o meno di calo ponderale negli ultimi 4-6 mesi, l'età, le terapie adiuvanti e neoadiuvanti (quest'ultima allo stadio N2 sembra migliorare la curabilità chirurgica e la sopravvivenza), l'espressione di geni correlati al cancro (Ki 67, K-*ras*, bcl-2, FHIT e **telomerasi**...) così come i valori ematici di alcuni markers tumorali e di malattia [es. antigene carcinoembrionale (CEA) e il polipeptidico tissutale TPA; cromogranina A, ProGPR, NSE, CYFRA 21-1 in SCLC; SPR1,..], la presenza di malattie concomitanti o pregresse (es. la malattia ostruttiva cronica COPD e la polmonare interstiziale), l'abitudine al fumo e l'atteggiamento psichico (Osaki et al., 2001 et 2004; Junker, 2001; Wallace et al., 2003; Wu et al., 1999; Taga et al., 1999; Komiya et al., 2000; Wang et al., 2000 and 2002; Pasini et al., 2002; Sekine et al., 2003; Buccheri et al., 1995 et 2004 a e b; Svobodnik et al., 2004; Yokota et al., 2004; Taneja et al., 2004; Destro et al., 2004; Meert et al., 2004; Tomida et al., 2004; Zhu et al., 2006).

Lo stato patologico (specialmente lo stato N) è il fattore più influente per la ricorrenza del tumore, la metastatizzazione ed il tempo di sopravvivenza. La TC di torace, addome e cranio ha dimostrato un potere predittivo dell'operabilità nel 77% dei casi, lievemente maggiore di quello del test TPA (65%) e CEA (69%) e quest'ultimo si è rivelato più predittivo di ogni altro metodo nel pronosticare la possibile recidiva post-chirurgica (correttezza diagnostica complessiva: 83%). Per i pazienti in stadio III e IV sono sicuramente fattori prognostici il performance status, la presenza o meno di calo ponderale, la presenza di metastasi e la loro localizzazione. In uno studio condotto su campioni di NSCLC ottenuti da pazienti operati e senza altro tipo di trattamento, è stato evidenziato un effetto cooperativo tra attività telomerasica e l'espressione di p16 nella valutazione prognostica, specialmente agli stadi I e II (Gonzales-Quevedo et al., 2002). È stata evidenziata inoltre un'associazione tra neoplasia polmonare e presenza di ripezioni minisatellite disposte in tandem e polimorfiche (denominate MNS 16A) nella regione downstream del gene per la telomerasi (Wang et al., 2003).

Per i pazienti in stadio I e II di malattia, fattori prognostici da considerare sono le dimensioni del tumore e la presenza o meno di metastasi linfonodali (stadiazione).

Per i pazienti in stadio III e IV fattori prognostici sono sicuramente lo stato di validità della persona, la presenza o meno di calo ponderale, la presenza di metastasi e la loro localizzazione.

2.1.5. La terapia delle neoplasie polmonari

La pianificazione di un trattamento è possibile solo dopo un'adeguata stadiazione del paziente. L'approccio al paziente deve essere multidisciplinare e gli interventi terapeutici possibili sono suddivisi in tre diverse modalità:

1. Terapia Chirurgica
2. Terapia Medica
3. Radioterapia

Dei tre approcci, sicuramente la chirurgia rappresenta la via più efficace in quanto è l'unica che possa condurre alla guarigione.

Dato il diverso comportamento biologico, è necessario andare a distinguere la terapia di un carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) da quella del carcinoma a piccole cellule (SCLC).

Lo schema generale che viene generalmente adottato per affrontare le patologie neoplastiche polmonari è quello rappresentato nella Figura 2.1.5.

Come si può osservare, i tumori a piccole cellule ("small cell lung carcinomas", SCLC), a prescindere dalla stadiazione, non sono operabili e sono trattati direttamente con chemioterapia o radioterapia. Questa tipologia di neoplasia, difficilmente trattabile, ha una prognosi solitamente infausta e quindi lo scopo dell'approccio terapeutico è solo quello di migliorare le condizioni generali del paziente e di prolungarne quanto più possibile la vita. Un discorso completamente diverso è quello relativo alle patologie non a piccole cellule ("non small cell lung carcinomas", NSCLC). La stadiazione, in questo caso, è cruciale dato che in base ad essa le indicazioni per procedere sono radicalmente differenti. La stadiazione precoce I, sia Ia che Ib, e quella intermedia II, sia IIa che IIb, sono patologie affrontabili con la chirurgia, che in una percentuale abbastanza significativa di casi si può dimostrare curativa in senso completo, dato che non si hanno recidive o progressioni di patologia entro i 10 anni successivi dall'intervento. Nel caso in cui, invece, la malattia si ripresenti, allora le indicazioni prevedono schemi radio e chemioterapici che possono ricondurre la patologia nei casi di operabilità ed in alcuni casi di guarigione.

Le stadiazioni avanzate III, sia IIIa che IIIb, invece, hanno una prognosi più variabile, anche se solitamente infausta. L'approccio terapeutico in questi casi esclude la chirurgia, a causa dell'estensione della patologia e della compromissione degli organi, e procede con la chemioterapia e la radioterapia, secondo protocolli

standard. Lo scopo della terapia in questo caso è esclusivamente quello di prolungare per quanto possibile l'aspettativa di vita del paziente e di migliorarne i sintomi.

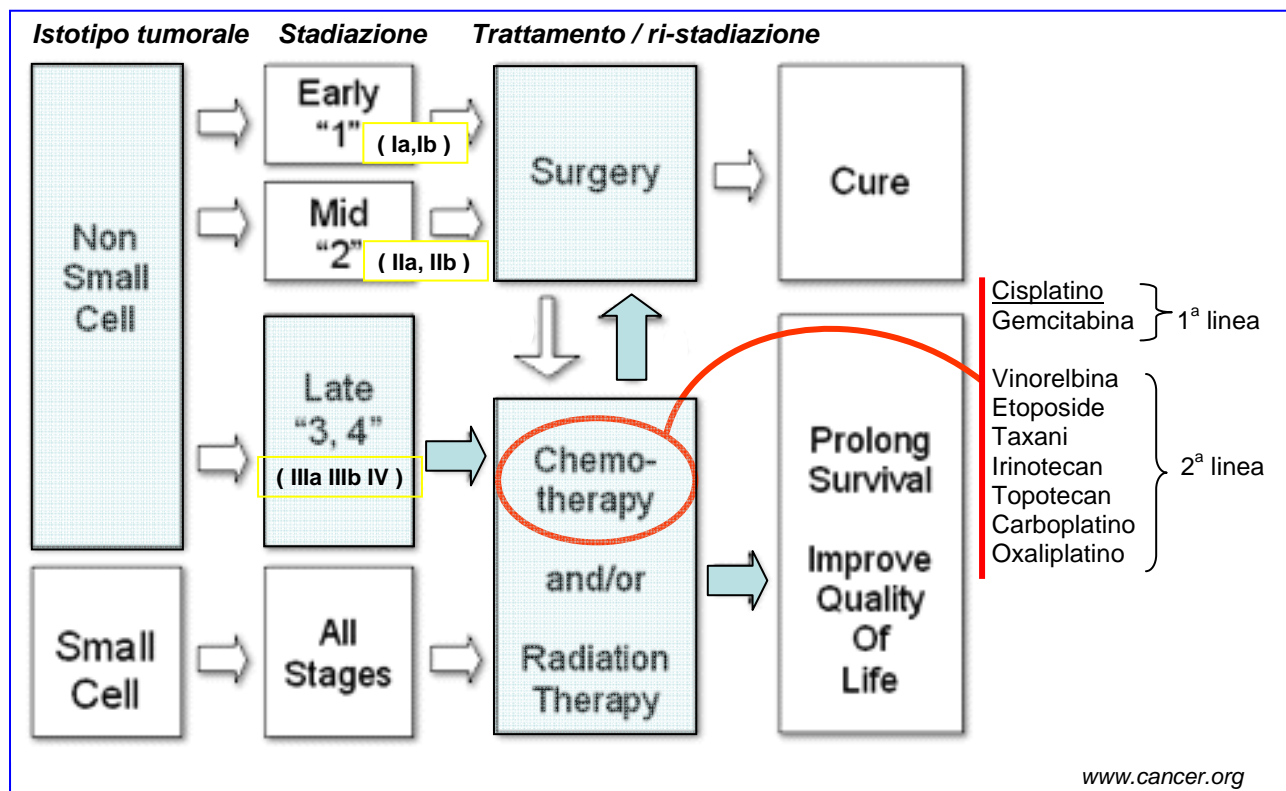


Figura 2.1.5. Diagramma riassuntivo delle procedure cliniche e terapeutiche per le neoplasie polmonari. L'approccio terapeutico del paziente risulta multidisciplinare. Per le neoplasie NSCLC i pazienti considerati operabili sono quelli con stadiazione più favorevole I-II-IIIa. I pazienti in stadio IIIb e IV sono sottoposti esclusivamente a trattamento chemioterapico che risulta essere di tipo palliativo e che prevede associazioni con cisplatino, gemcitabina, vinorelbina, etoposide taxani, irinotecan, topotecan.. Per le neoplasie a piccole cellule la polichemioterapia ha migliorato i tassi di remissione completa e la sopravvivenza. La chemioterapia nello SCLC viene quindi eseguita a tutti gli stadi anche se la durata della risposta è breve. Essa prevede cisplatino o carboplatino, etoposide per una stadiazione IIIa e IIIb, mentre nella stadiazione IV il trattamento è solo di tipo palliativo. I tumori NSCLC allo stadio I e II sono sottoposti ad intervento chirurgico curativo risolutivo, gli stadi avanzati 3 e 4 alla chemioterapia e/o radioterapia per la finalità di miglioramento della qualità della vita e incremento del tempo di sopravvivenza. I tumori di tipo SCLC a tutti gli stadi vengono trattati esclusivamente con chemioterapia e/o radioterapia.

1.4. Telomerasi per la Diagnosi e la Prognosi del tumore

La maggior parte degli autori indica l'applicazione della telomerasi come possibile fattore diagnostico e prognostico. L'attivazione della telomerasi avviene nel momento in cui inizia il processo neoplastico. La valutazione dell'attività telomerasica richiede di testare un campione biologico, che può essere ottenuto con

metodi non invasivi e può essere eseguito in campioni freschi, per esempio BAL (lavaggio broncoalveolare), agoaspirati e campioni inclusi in paraffina.

La telomerasi potrebbe rappresentare un marker specifico clinicamente usato per una prima individuazione e per la conferma della presenza di cellule neoplastiche.

Il ruolo della telomerasi come fattore diagnostico è stato ampiamente documentato. Il test tradizionale TRAP (telomerase repeats amplification protocol) radioattivo e le sue più recenti modificazioni (real-time PCR TRAP), unito alla immunohistochimica per hTERT nucleare, assicurano alta sensibilità e relativa accuratezza dei risultati per un gran numero di differenti istotipi tumorali. Mentre queste caratteristiche fanno dell'analisi della telomerasi un potenziale marker per la diagnosi tumorale, vi sono molti problemi che devono essere superati affinché queste metodiche diventino routine clinica.

La preparazione del campione e l'accessibilità alla massa tumorale limitano la precisione del test e i molti vantaggi delle procedure diagnostiche di routine, come TC o la valutazione biptica, non sono così evidenti. In ogni caso, la piccola quantità di campione richiesta e il relativo basso costo rendono il metodo potenzialmente interessante.

Oltre a tali applicazioni diagnostiche, l'analisi della telomerasi potrebbe anche essere usata come fattore prognostico. La prognosi e la terapia follow-up del tumore presentano un numero di variabili che rendono difficile una personalizzazione della terapia per ogni singolo paziente. La prognosi è un importante parametro di considerazione dell'aspettativa di vita del paziente, soprattutto nel caso delle neoplasie polmonari. Essa dipende dalla stadiazione del tumore e descrive la probabilità che il tumore progredisca. Scegliere lo schema terapeutico più opportuno per ogni singolo paziente dipende da molti fattori, incluse la presenza e la diffusione di metastasi, le condizioni generali del paziente e l'evoluzione del tumore.

L'analisi della telomerasi potrebbe essere un aiuto nel determinare se applicare una terapia farmacologia aggressiva, dato che le decisioni su quali terapia seguire sono spesso basate solo sull'esperienza degli oncologi.

La telomerasi potrebbe essere usata come un test di follow-up per determinare l'efficacia del trattamento.

I dati sull'effettivo ruolo della telomerasi nella prognosi tumorale non sono ancora conclusivi e dovranno essere determinati alla luce di considerazioni più complesse che riguardino anche l'istopatologia.

2.1.7. La Telomerasi come Marcatore Diagnostico dei Tumori polmonari

Dalle prime indicazioni ottenute circa la capacità dell'enzima telomerasi di sostenere il processo di immortalizzazione cellulare, si sono moltiplicati gli studi tesi a valutare, *in vivo*, l'attività dell'enzima in campioni di pazienti portatori di neoplasia polmonare. In questo ambito, le prime analisi dell'attività telomerasica sono state condotte su pezzi istologici di tumori polmonari primitivi (Kim et al., 1994; Hiyama et al., 1995; Wang et al., 2000; Volm et al., 2000; Kumaki et al., 2001; Chen et al., 2002; Hiyama et al., 2003). Uno studio si basava essenzialmente su un campione di 136 neoplasie polmonari ottenute da resezione chirurgica. L'attività telomerasica è stata evidenziata nel 80.1% dei 136 casi ed era massima in tutti i campioni relativi a SCLC (11/11). Erano risultati positivi inoltre 4 dei 68 controlli negativi provenienti dagli stessi interventi. Questo studio ha consentito di evidenziare la positività marcata dell'attività telomerasica nell'istotipo tumorale a piccole cellule rispetto al NSCLC che invece presentava ampia variabilità di tali valori enzimatici (Hiyama et al., 1995). Nel 1999 dallo studio di pazienti portatori di NSCLC in stadio I di malattia, venne affermato il ruolo dell'attività telomerasica come fattore prognostico, come indicatore di sopravvivenza e quindi come possibile marcatore tumorale (Marchetti et al., 1999). L'esiguità del campione però non aveva consentito di ottenere dati statisticamente significativi riguardo alla correlazione tra l'attività enzimatica sul pezzo operatorio e l'istotipo tumorale. Non era stata evidenziata alcuna correlazione significativa tra la dimensione della neoplasia e l'entità dell'attività telomerasica mentre era rilevabile nell'analisi grading tumorale-telomerasi. L'attività telomerasica e l'espressione di hTERT risultano incrementare in relazione al fenomeno di cancerogenesi che comprende gli stadi di trasformazione da epitelio bronchiale normale o bronchitico a metaplasia squamosa (33% +) e displasia (35% +) a carcinoma squamocellulare (100% +) (Shibuya et al., 2001). Era già stato infatti dimostrato come la deregolazione dell'attività telomerasica fosse un evento precoce nella patogenesi multistadio dei carcinomi broncogeni e che un'intensa localizzazione focale dell'espressione di hTR, componente ad RNA dell'enzima, nel carcinoma *in situ* potesse indicare un'imminente invasione (Yashima et al., 1997). Uno studio recente attribuisce una significatività statistica come fattore prognostico, in pazienti di NSCLC, all'espressione di mRNA di hTERT, allo stato pN e allo stadio patologico di malattia (stadio p). Inoltre la sopravvivenza a 5 anni per i pazienti con espressione di mRNA di hTERT alta o moderata risulta rispettivamente del 46.9% e 77.9% (Fujita et al., 2003). Altri studi confermano i dati sopra riportati dimostrando come sia l'attività telomerasica che l'espressione di hTERT in NSCLC risultino significativamente correlate con le metastasi linfonodali (N0 vs N1+2) e come l'attività telomerasica correli con la differenziazione tumorale e lo stadio, ma non con altre variabili clinicopatologiche

(Toomey et al., 2001). I pazienti risultati positivi ad hTERT sopravvivevano per un periodo significativamente più breve rispetto ai negativi e la riattivazione della telomerasi sembra assumere il significato di fattore prognostico negativo (Albanell et al., 1997; Hara et al., 2001; Wu et al., 2003).

Parallelamente ad un miglioramento delle conoscenze riguardo alla funzionalità e regolazione della telomerasi, sono stati condotti studi atti a valutare la presenza dell'attività telomerasica in campioni di escreato, di lavaggio broncoalveolare e su campioni biotici (Yahata et al., 1998 a e b; Arai et al., 1998; Hess et al., 2002).

A testimonianza di ciò in uno studio riguardante 52 casi di cui 42 clinicamente sospetti neoplastici, era stata dosata l'attività telomerasica in escreti, lavaggi broncoalveolari e biopsie, effettuate in corso di broncoscopia (Sen et al., 2001).

Più specificamente lo studio è stato effettuato su 7 pazienti allo stadio IIIa, su 24 pazienti allo stadio IIIb e 8 allo stadio IV. I risultati ottenuti, che suggerivano una significativa correlazione tra lo stadio di malattia e l'attività telomerasica nell'escreato, nel BAL e nei prelievi biotici, devono essere però rivisti considerando il tipo di campione, limitato per numero di casi e non rappresentativo per tutti gli stadi di malattia. Nella casistica descritta mancano inoltre indicazioni relative agli istotipi tumorali. I pazienti con neoplasia polmonare sono stati essenzialmente suddivisi nei due gruppi: SCLC e NSCLC. Su 41 neoplasie diagnosticate, il dosaggio enzimatico della telomerasi nel BAL si è rivelato negativo in 12 pazienti (12/41), di cui 8 erano allo stadio IIIb. Di questi 8 casi, negativi inspiegabilmente all'analisi dell'attività telomerasica condotta sul BAL, 7 campioni di escreato risultavano positivi alla telomerasi e di questi solo 4 sono risultati positivi per cellule neoplastiche all'analisi citologica. In conclusione per lo stadio di malattia IIIb l'analisi dell'escreato è risultata più efficace per la ricerca dell'attività telomerasica rispetto all'utilizzo del BAL o all'analisi citologica.

La possibilità di utilizzare un marcatore tumorale come la telomerasi nello studio e nella diagnostica delle neoplasie polmonari assume particolare interesse se si pensa alla difficoltà diagnostica che si incontra in caso di primitività polmonari periferiche. In questi casi, infatti, l'indagine broncoscopica non sempre garantisce di ottenere materiale idoneo per la valutazione cito-istologica, per problemi anatomici e strumentali. In queste condizioni, il materiale idoneo nella valutazione della composizione cellulare del polmone profondo potrebbe essere quello ottenuto dal lavaggio broncoalveolare. Tale metodica è stata valutata in un gruppo di 29 pazienti sottoposti a broncoscopia per sospetta neoplasia polmonare. Sono stati diagnosticati 22 tumori polmonari e 7 lesioni di natura non neoplastica (Dikmen et al., 2003). Tra le patologie

benigne è stato riscontrato 1 accesso polmonare e 1 caso di Tuberculosis. I pazienti in studio sono stati classificati in base alla istologia tumorale, e si è valutata l'entità dell'attività telomerasica e la positività all'analisi citologica. Per la prima volta, uno studio sulla attività telomerasica legata alle neoplasie polmonari riportava una distinzione tra i vari tipi istologici di malattia e la relativa espressione enzimatica.

La sensibilità e specificità dell'indagine citologica nei due gruppi (neoplasia vs no neoplasia) erano del 54.4% e del 100% rispettivamente, mentre per l'attività telomerasica rispettivamente del 72.7% e 85.7%. Purtroppo l'esiguità del campione non permetteva analisi di correlazione tra i dati ottenuti. Nei 12 pazienti con carcinoma spinocellulare l'espressione dell'attività telomerasica era evidente solo in 10 di essi (83.3%) e degli 8 adenocarcinomi, il 50% (4) esprimevano l'enzima. 2 SCLC diagnosticati presentavano attività telomerasica.

In questo studio l'attività telomerasica in campioni di BAL era positiva in tutti e 13 i tumori visibili endoscopicamente (100%), mentre il BAL effettuato per neoformazioni polmonari non visibili endoscopicamente, risultava positivo all'attività telomerasica in soli 3 casi dei 9 totali (Dikmen et al., 2003).

Lo studio ha inoltre confermato il dato riportato in letteratura che indica la possibile presenza di falsi positivi con percentuali variabili tra il 18% e il 31% (Sen et al., 2001).

L'interesse per la diversa espressione dell'enzima nei differenti istotipi neoplastici polmonari, nasce proprio da questi studi iniziali che non hanno permesso di ottenere dati statisticamente significativi circa la correlazione istotipo-attività telomerasica ma che comunque hanno cominciato a sottolineare la presenza di diversi livelli di positività. A questo riguardo è stata dimostrata una marcata positività degli SCLC, una variabilità di espressione negli NSCLC e l'assenza di attività in specifiche forme neoplastiche quali il tumore carcinoide (Sarvesvaran et al., 1999). Il tumore di tipo carcinoide, a basso grado di malignità, presenta un'eterogeneità di espressione della telomerasi, in associazione alla presenza o meno di delezioni alleliche in corrispondenza di geni localizzati in 10p o 3p che agiscono indipendentemente come soppressori della componente ad RNA telomerasica (Miura et al., 2001; Iniesta et al., 2004). Uno studio ha dimostrato come le tipiche cellule carcinoidi, telomerasi negative (Yashima et al., 1997), siano mortali in stadio pre-M2, mentre le atipiche cellule carcinoidi, quelle del carcinoma polmonare neuroendocrino a larghe cellule e del SCLC siano immortali in stadio post-M2 e presentino alti livelli di attività telomerasica (Gomez-Roman et al., 2000).

Recentemente si stanno conducendo studi mirati alla valutazione dell'espressione differenziale in tumori neuroendocrini polmonari (Zaffaroni et al., 2003).

Sono stati a tal fine valutati 38 casi, di cui sono risultati telomerasi positivi: 14 dei 15 (93%) SCLC, 7 degli 8 (87%) carcinomi a grandi cellule con caratteristiche neuroendocrine e solo 1 su 15 (7%) dei tumori carcinoidi tipici. Altri autori hanno dimostrato come un alto livello del DNA del gene di hTERT circolante libero nel plasma, quantificato con la metodica della real-time PCR, sia da considerarsi un grande fattore di rischio in un'ottica di screening e chemioprevenzione, essendo stato riscontrato così elevato in pazienti di carcinoma polmonare (Soria et al., 2002; Sozzi, 2003). La determinazione dell'attività telomerasica è stata compresa inoltre nello studio della malattia minima residua in pazienti con tumori solidi, tra cui il tumore polmonare (Böckmann et al, 2001).

SCOPO DEL LAVORO 2

Gli scopi del presente studio sono stati molteplici.

- Valutare il significato del dosaggio dell'enzima telomerasi come fattore diagnostico e prognostico in campioni biologici di neoplasie polmonari a differente stadiazione. Questi sono stati ottenuti da tessuti patologici tumorali ottenuti da pezzi chirurgici e da lavaggi broncoalveolari.
- Verificare la possibilità di associare le differenti metodiche di dosaggio della telomerasi alle metodologie di routine diagnostica per aumentare la specificità e la precocità complessiva.
- Correlare il livello di attività telomerasica con la risposta dei pazienti alla chemioterapia

MATERIALI E METODI 2

2.2.1. Pazienti e criteri di inclusione

I pazienti sono stati ospedalizzati presso la struttura Ospedale Maggiore della Carità di Novara. Il criterio principale di inclusione nello studio era la presenza di una sospetta neoplasia periferica polmonare, soprattutto se non chiaramente definibile dal quadro radiologico. Pazienti fumatori, ex-fumatori e non fumatori sono stati inclusi, sia di sesso femminile che maschile, di qualsiasi età. I pazienti con documentazione TAC (tomografia assiale computerizzata), eseguita sia presso la struttura che in strutture esterne, erano sottoposti ad intervento di endoscopia toracica (FBS fibrobroncoscopia), lavaggio broncoalveolare (BAL), broncoaspirato ed agoaspirato nel reparto di Pneumologia della struttura stessa (Resp. Dott. Piero Balbo). Il principale criterio di esclusione è stato la presenza di lesione visibile endoscopicamente. Il materiale diagnostico utilizzato nello studio rientra nella normale routine prevista nei casi di sospetta neoplasia polmonare. È stato quindi esaminato solo il materiale in eccesso rispetto alle necessità diagnostiche della struttura.

I pazienti a bassa stadiazione che avevano subito chirurgia con relativa asportazione del frammento tumorale sono stati inclusi nello studio per valutarne la positività immunoistochimica della telomerasi. I campioni esaminati erano in eccesso rispetto alle necessità diagnostiche di routine della struttura ospedaliera.

2.2.2. Analisi Immunoistochimica

Per l'esame immunoistochimico è stata messa a punto una metodica originale. I preparati istologici venivano deparaffinizzati e reidratati mediante scale di xilene ed etanolo. A questo punto venivano trattati con H₂O₂ al 3% per 8 minuti, al fine di eliminare le perossidasi endogene, quindi lavati con PBS per 2 volte per 3 minuti ed incubati per 8 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo primario policlonale anti-human TERT (H-231 Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) diluito 1:100 con diluente DAKO (DAKO ChemMate, DAKO A/S Danimarca). Al termine dell'incubazione, i vetrini venivano lavati 2 volte in PBS per 5 minuti ed incubati con l'anticorpo linker biotinilato per 15 minuti, secondo le istruzioni del kit di rivelazione (LSAB+ peroxidase, DAKO). All'anticorpo secondario seguivano due lavaggi con PBS e un'incubazione con streptavidina marcata con perossidasi per 15 minuti. Il colore veniva sviluppato, dopo 2 lavaggi di 3 minuti con PBS, mediante l'incubazione di 4 minuti con diaminobenzidina. Dopo un lavaggio con acqua corrente

per almeno 5 minuti i vetrini venivano colorati con ematossilina di Mayer per 1 minuto. Al termine del lavaggio con acqua corrente per almeno 3 minuti i vetrini venivano montati ed erano pronti per l'esame al microscopio. L'immunoistochimica di routine prevedeva la determinazione delle citocheratine (CK 7 e CK 20), l'enolasi neuro-specifica (NSE), la cromogranina e la sinaptofisina.

2.3. Preparazione materiale biologico della clinica

Le fibrobroncoscopie sono state eseguite con il supporto dell'anatomo-patologo (Dott.ssa Silvia Cristina) che ne ha curato l'esame estemporaneo del campione prelevato con agoaspirazione. Il materiale diagnostico si componeva, a seconda del caso clinico, di agoaspirato su lesione polmonare, agoaspirato su linfonodi ilo-mediastinici (ilari, sottocarenali, paratracheali). Per completare il quadro diagnostico venivano anche eseguiti BAL e broncoaspirato. Il BAL è stato eseguito selettivamente nelle strutture bronchiali del segmento tributarie dell'area di localizzazione della lesione.

Al fine di evitare contaminazioni ematiche dei campioni, è stata data precedenza al BAL rispetto alle altre procedure. I campioni citologici sono stati inviati ai laboratori di Anatomia Patologica per gli esami di routine, e al laboratorio di Farmacologia del Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro" (Resp. Dott. Colangelo) per l'esame biochimico specifico per il dosaggio dell'attività dell'enzima telomerasi.

I pazienti elegibili per la chirurgia (bassa stadiazione, buone condizioni generali) sono stati sottoposti ad intervento (lobectomia) presso la Clinica di Chirurgia Generale (Dir. Prof. Marcello Garavoglia) dalla Prof. Caterina Casadio. Il pezzo operatorio è stato quindi processato ed analizzato presso il Servizio di Anatomia Patologica dell'ospedale (Dir. Prof. Guido Monga) per la diagnosi istologica definitiva. A partire da questo materiale incluso sono stati anche allestiti i vetrini (Sig.ra G. Nicosia) per lo studio dell'espressione dell'enzima telomerasi con metodica immunoistochimica.

2.2.4. Procedure analitiche

Preparazione del paziente all'esame endoscopico. A tutti i pazienti con sospetta neoplasia polmonare sono stati effettuati lavaggi broncoalveolari mediante procedura standard (BAL). In sintesi, il paziente veniva preparato previa somministrazione intramuscolare di atropina 0.5-1 mg (fiale da 1 mg/ml) e prometazina 25-50 mg (fiale da 25mg/ml), trenta minuti prima dell'indagine, seguita da anestesia locale dell'orofaringe e delle

corde vocali con lidocaina 2%. Con il paziente in posizione supina, veniva preso un accesso venoso (avambraccio) per la somministrazione di soluzione fisiologica (0.9% sodio cloruro) e di una soluzione di sedativo-ipnotico non barbiturico midazolam (0.07 mg/kg, fiale da 1 ml ,midazolam 5mg/ml) 5 mg diluita in 5 ml di soluzione fisiologica .

2.2.4.1. Procedure per effettuare il BAL ed il broncoaspirato

Al paziente così preparato, veniva introdotto per via orale il broncoscopio (Olympus, modelli XT20 e XT40) e incuneato (wedge position) nel segmento bronchiale interessato (Figura 2.2.4.1.). A questo livello, il segmento interessato veniva irrorato con un volume variabile tra i 50 - 100 ml di soluzione fisiologica a 37°C, in funzione della localizzazione della lesione e dell'accessibilità bronchiale. Il recupero del liquido di lavaggio (BAL) veniva effettuato con continua e costante aspirazione in siringa sterile (50 ml) ed immediatamente processato per le successive analisi. Il broncoaspirato rappresentava il materiale ricavato dalla continua aspirazione durante tutta la procedura endoscopica delle secrezioni presenti nell'albero bronchiale.

La procedura veniva seguita attraverso controllo fluoroscopico.

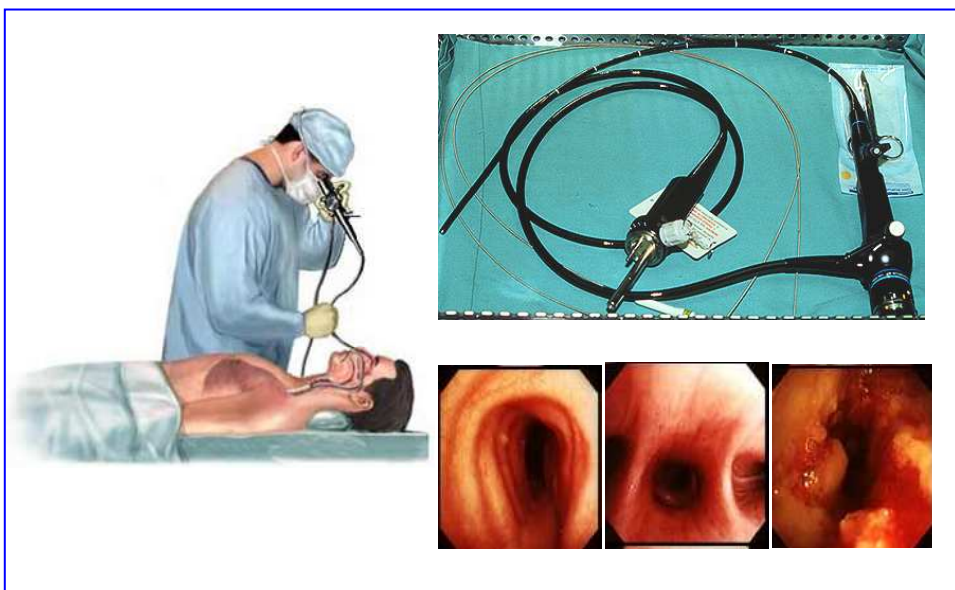


Figura 2.2.4.1. L'esame broncoscopico permette l'esplorazione dell'albero bronchiale sino ai rami segmentari e sottosegmentari. L'indagine consente di visualizzare direttamente la mucosa bronchiale ed evidenziarne eventuali alterazioni. Il materiale così ottenuto ha una composizione cellulare che riflette quella dell'ambiente polmonare profondo.

2.2.5. Estrazione e purificazione dell'enzima telomerasi dalle cellule ottenute mediante BAL e broncoaspirato

Per l'estrazione dell'enzima telomerasi dai BAL, si provvedeva alla diluizione del liquido di lavaggio di ogni paziente con uguale volume di soluzione fisiologica. Dopo aver trasferito la soluzione in provette sterili da centrifuga, i campioni erano centrifugati a 400 g per 10 minuti a 4 °C. Questo permetteva di separare le cellule integre contenute nella soluzione (pellet) dal liquido di lavaggio. Dopo aver decantato il surnatante, le cellule concentrate sul fondo della provetta venivano risospese su ghiaccio con 5 ml di tampone fosfato isototonico sterile (pH 7.39, PBS) composto da NaCl 120 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM. Le cellule venivano nuovamente centrifugate a 200 g per 10 minuti a 4 °C. La metodica di estrazione utilizzata si basava fondamentalmente sul metodo descritto da Kim (Kim et al., 1994).

Si procedeva quindi alla determinazione dell'attività telomerasica mediante Trap Assay e/o TRAP-RTQ-TRAP (vedi Materiali e Metodi Parte 1).

ANALISI STATISTICA 2

Le variabili considerate in questo studio sono state categorizzate come segue: stadio (I-II-III-IV), tipo istologico, grado istologico (G1-G2-G3), malattia residua, attività telomerasica, età, fumo, metastasi e linfonodi interessati dalla malattia. L'associazione tra l'attività telomerasica, stadio tumorale, tipo e grado istologico, è stata valutata utilizzando la regressione logistica. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma Excel (Microsoft, US).

RISULTATI E DISCUSSIONE 2

I pazienti considerati nello studio sono stati complessivamente 117, 85 di sesso maschile e 32 di sesso femminile. L'età minima dei pazienti era di 33 e quella massima di 81. Un'analisi complessiva dei soggetti considerati in questo studio ha permesso di mettere in evidenza che i pazienti con neoplasia polmonare erano prevalentemente fumatori o ex fumatori. Inoltre, nella maggiorparte delle donne non fumatrici si è registrato che il coniuge era un forte fumatore all'interno delle mura domestiche.

I pazienti sono stati stadiati presso il servizio di Anatomia Patologica mediante differenti indagini. Quelle radiologiche, RX torace e la tomografia toracica (TAC), sono servite per avere una indicazione circa l'estensione loco-regionale della malattia a livello polmonare e linfonodale. Le indagini broncoscopiche, stadiative e diagnostiche, hanno fornito materiale per lo studio citologico o istologico del tessuto patologico.

Per completare le indagini stadiative è stata anche valutata la possibile estensione di malattia in sede extratoracica, attraverso l'esecuzione di TAC addome, TAC encefalo e scintigrafia ossea "total body". La classificazione TNM utilizzata fa riferimento alla quinta edizione del Manuale TNM (Sobin LH, Wittekind Ch eds - UICC: TNM Classification of Malignant Tumors, 5th. ed. John Wiley, 1997, New York). Essa coincide con la classificazione dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC).

I pazienti sono stati operati presso la struttura ospedaliera novarese (Prof.sa Casadio) e la massa tumorale asportata è stata fissata, inclusa e analizzata presso l'Anatomia Patologica dell'Ospedale (Prof.Monga).

In parallelo con le procedure standard di analisi che ne hanno permesso di definire la tipologia neoplastica e le peculiarità diagnostiche, abbiamo condotto le analisi immunoistochimiche per l'analisi della telomerasi.

Nella Figura 2.1 vengono mostrati alcuni pannelli dimostrativi dei principali istotipi su cui è stata condotta l'analisi immunoistochimica della telomerasi. Per questa prima parte dello studio sono stati considerati i soli pazienti operati stadiati come I e II, cioè quelli che avevano come prima indicazione terapeutica il trattamento chirurgico. Il loro numero complessivo è di 60.

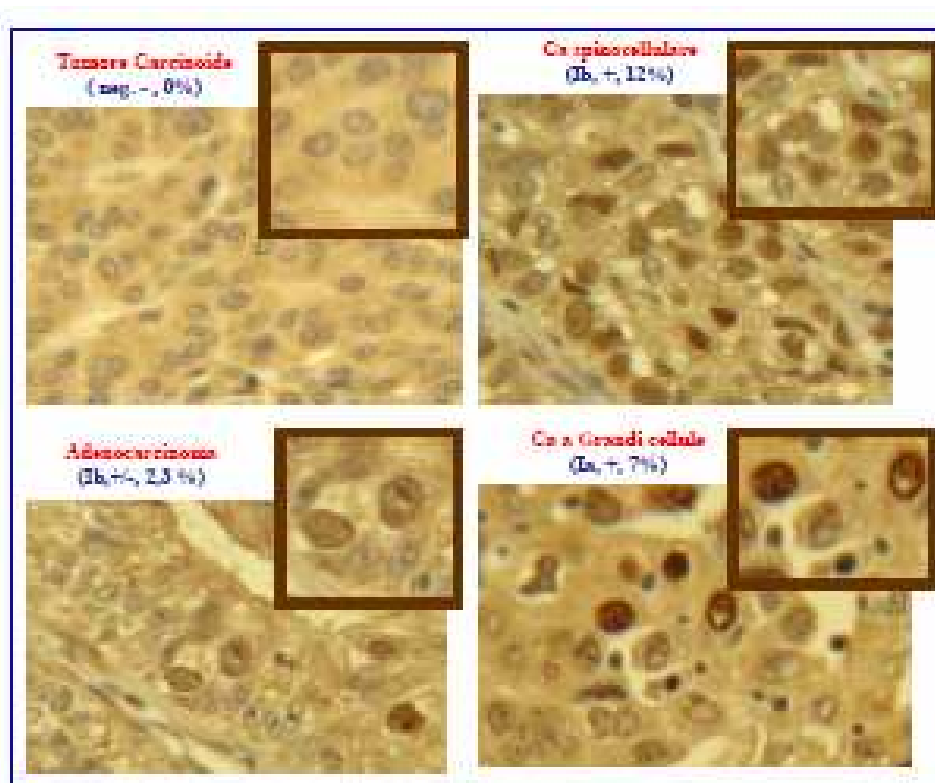


Figura 2.1. Queste immagini ottenute mediante immunistochemica sono indicative dell'attività telomerastica nei diversi istotipi tumorali. il tumore carcinoida (in alto a sx: negativo, -, 0%) risultava telomerasi negativo ed infatti non era evidenziabile alcuna colorazione, confermando i dati di letteratura (Miura et al., 2001, Iniesta et al., 2004). mentre intensa e diffusa positività si trovava nel carcinoma spinocellulare Ib (in alto a dx: Ib, +, 12%), l'adenocarcinoma (in basso a sx: Ib, +/-, 2,3%) ed il carcinoma a grandi cellule. (in basso a dx: Ia, +, 7%) L'immunistochemica è stata condotta utilizzando un anticorpo policlonare diretto contro la porzione proteica hTERT dell'enzima, l'adenocarcinoma ed il carcinoma a grandi cellule. L'interpretazione del dato immunistochemico è avvenuta secondo 2 parametri: 1) la percentuale di cellule telomerasi positive (il valore è calcolato su una conta di 250 cellule); 2) l'intensità della marcatura indicata come: negativo (-), poco positivo (+/-), positivo (+) molto positivo (++).

La determinazione della positività alla telomerasi è stata eseguita contando il numero di cellule positive per ogni campo di analisi. Il risultato è stato espresso come percentuale di cellule positive rispetto al numero totale di cellule presenti in ogni campo (mediamente 250 cellule).

I risultati sono riportati nella Tabella 2.1, e riassumono tutti i dati relativi alla presenza di linfonodi positivi, alla presenza di metastasi, agli indici di neovascolarizzazione e di proliferazione, oltre che quelli della positività dei nuclei all'enzima telomerasi. I dati sono suddivisi per istotipo e per grado di progressione della patologia.

istotipo	caso n°	Lesione cm	Linfonodi positivi / asportati	MicromTS	CD 34	MIB-1 %	cells Telo pos/campo	score	BAL	
ADENO G1	1	2.6	0/6	0	neg	5.00	1	1/5	-	
	2	2.5	0/3	0	neg	27.12	3	1/5		
ADENO G2	3	2	0/4	0	neg	10.00	3	1/5	-	
	4	3.5	0/8	0	neg	18.00	4	1/5		
	5	1	0/8	0	neg	18.50	1	1/5		
	6	4.5	0/16	0	neg	24.11	3	1/5		
	7	1	0/8	0	neg	25.36	1	1/5		
	8	1	0/5	0	neg	34.51	2	1/5		
	9	3.3	0/3	0	pos	55.96	10	4/5		+
	10	4	0/8	0	pos	24.00	12	2/5		
	11	1.2	0/4	1	pos	68.00	15	4/5		
	12	6	3/10	1	neg	47.00	13	4/5		
	ADENO G3	13	5	0/14	0	neg	33.85	2		
	14	3.5	0/2	0	neg	38.00	6	1/5		
15	6.5	0/5	0	neg	38.00	4	1/5			
16	3.2	0/9	0	neg	54.00	1	1/5			
17	2	0/6	0	pos	32.67	12	3/5			
18	1.5	0/11	0	pos	50.67	10	3/5			
19	2	1/19	1	neg	30.00	10	4/5			
20	2.5	1/4	1	neg	45.30	13	4/5			
21	4.5	2/12	1	pos	35.74	12	5/5			
BAC mucoso	22	9.5	0/3	0	neg	16.50	3	0/5		
	23	6	1/8	1	pos	35.88	25	5/5		
K CG	24	2.8	0/14	0	neg	17.00	2	0/5		
	25	2	0/15	0	neg	18.50	2	0/5		
	26	1.3	0/7	0	neg	26.00	4	1/5		
	27	4.5	0/12	0	neg	41.53	3	1/5		
	28	8	0/5	0	neg	32.47	6	1/5		
	29	4.5	0/7	0	neg	52.00	4	1/5		
	30	4	0/8	0	neg	59.00	2	1/5		
	31	3	0/8	0	neg	67.00	1	1/5		
	32	4.5	0/12	0	neg	71.00	2	1/5		
	33	2.3	0/4	0	pos	25.23	10	3/5	-	
	34	3	1/7	1	neg	52.00	17	4/5		
	K SPINO G2	35	4	0/14	0	neg	31.00	2	1/5	
36		2.5	0/3	0	neg	31.00	4	1/5		
37		2.5	0/6	0	neg	31.12	4	1/5		
38		3.5	0/4	0	neg	31.22	5	1/5		
39		3.7	0/4	0	neg	31.38	6	1/5		
40		2.5	0/4	0	neg	32.52	4	1/5		
41		3	0/1	0	neg	45.23	2	1/5		
42		2	0/18	0	neg	49.71	2	1/5		
43		8	0/7	0	neg	52.00	1	1/5	-	
44		4	0/6	0	neg	80.00	0	1/5		
45		4.5	0/7	0	pos	49.55	17	3/5		

	46	4.5	1/15	1	neg	31.46	25	4/5	
K SPINO G3	47	6	0/8	0	neg	18.00	1	0/5	
	48	5	0/7	0	neg	22.00	1	0/5	
	49	5.5	0/7	0	neg	28.00	2	1/5	
	50	4.5	0/7	0	neg	30.00	0	1/5	
	51	2.5	0/2	0	neg	33.00	1	1/5	
	52	4.5	0/2	0	neg	33.70	2	1/5	
	53	3	0/6	0	neg	37.00	3	1/5	
	54	1.7	0/5	0	neg	38.32	1	1/5	+/-
	55	2.5	0/3	0	neg	44.00	1	1/5	
	56	4.5	0/3	0	neg	48.00	5	1/5	
	57	4	0/10	0	neg	75.00	0	1/5	
	58	6	0/12	0	neg	77.00	1	1/5	
	59	4	0/13	0	pos	37.01	12	3/5	
	60	2	0/8	0	pos	40.43	10	3/5	

Tabella 2.1. Riassunto dei dati relativi ai vari gruppi di pazienti omogenei per istotipo, con stadiazione di malattia I e II.

I valori indicativi del limite minimo di significatività (cut off) per ogni marker sono quelli adottati a livello internazionale (Spyratos et al., 2002), ed i criteri che sono stati adottati per l'analisi dei pazienti erano i seguenti:

- *linfonodi* > 0, qualsiasi valore superiore a 0 era indicatore di malignità avanzata
- *MicroMTS* > 0, presenza di micrometastasi, qualsiasi valore superiore a 0 era indicatore di malignità avanzata
- *CD34* > 0, densità dei capillari positiva, indicava fenomeni di neovascolarizzazione e cioè presenza di neoformazioni, possibilmente neoplastiche
- *MIB-1* > 25%, indicava che vi era un'intensa attività proliferativa, possibilmente dovuta alla presenza di divisioni cellulari anche di tipo neoplastico.
- *cells Telo pos/campo*, indica la presenza di cellule che dimostrano attività telomerasica. Un cut off di almeno 5 cellule sicuramente positive indicava un alto grado di probabilità di presenza di cellule tumorali

Dall'esame dei risultati si evincono alcuni dati salienti. Anzitutto si può osservare come non esista una chiara correlazione tra la dimensione della lesione e l'avanzamento della neoplasia. La dimensione quindi non sembra essere un parametro di riferimento sia per indicare l'evoluzione, sia per suggerire il grado di aggressività, e cioè di probabilità che la neoplasia evolva rapidamente ad una stadiazione più elevata e quindi sia indice di scarsa aspettativa di vita da parte del paziente. Un secondo dato rilevante è che non sembra esistere una correlazione diretta tra presenza di micrometastasi ed il numero di linfonodi asportati. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che il numero di linfonodi asportati durante la chirurgia è variabile da paziente a paziente e dipende esclusivamente dalla visibilità e dall'accessibilità degli stessi. Lo stesso

discorso vale per l'evidenziazione di micrometastasi, dato che l'assenza di micrometastasi non indica un valore assoluto, ma semplicemente un valore di probabilità che la neoplasia non sia aggressiva, dato che non tutte le microlesioni sono facilmente evidenziabili.

L'esame dei valori di MIB-1 e CD 34, che sono indicativi rispettivamente di iper-proliferazione cellulare e presenza di neoformazioni probabilmente tumorali, non sembra dare un contributo diagnostico e prognostico di rilievo. La correlazione tra i due valori infatti non è molto elevata, indipendentemente dal tipo di lesione e dal suo stadio di progressione. Inoltre, non sembra esserci correlazione diretta tra i singoli valori e la presenza di linfonodi positivi o di micrometastasi, anche forse a causa di quello che è stato detto precedentemente.

L'analisi della presenza di cellule telomerasi-positivo, e cioè di cellule che sono sicuramente tumorali, sembra correlare solo in parte con i valori di MIB-1 e CD 34, mentre sembra essere più direttamente in relazione con quelli che sono i valori di positività linfonodali e metastatico.

Nel complesso i dati evidenziano che vi sono alcuni fattori che influenzano la possibilità di trarre considerazioni utili per la diagnosi precoce e la possibilità di prevedere a lungo termine l'evoluzione dei pazienti portatori di neoplasia primitiva. Anzitutto, l'intervento asporta la massa primaria ma permette un'analisi solitamente solo parziale di quelli che sono i linfonodi sentinella, a causa, come detto, dell'impossibilità di asportarne il maggior numero possibile. I marcatori solitamente utilizzati per la refertazione definitiva della lesione asportata, sembrano essere solamente descrittivi della neoplasie, fornendo solo dati parziali sulla stadiazione e sulla potenzialità di progressione della lesione. L'analisi dell'attività telomerasica, pur permettendo di indicare la presenza di cellule sicuramente tumorali, necessita di uno studio di correlazione su un più ampio numero di campioni e soprattutto di uno studio a lungo termine sui pazienti operati che sono stati stadati I e II.

Del resto, lo studio sta proseguendo attraverso il follow-up dei pazienti qui presentati, al fine di evidenziare una correlazione a posteriori tra i dati ottenuti a livello sperimentale dall'analisi della telomerasi, dei marcatori di routine (MIB-1 e CD 34), e l'eventuale progressione della patologia. Questa analisi richiederà almeno 5 anni e quindi, almeno per ora i dati non ci permettono di giungere a conclusioni definitive. Le uniche considerazioni che possono essere fatte sono quelle che evidenziano che, essendo la telomerasi un marcatore diretto di malignità, essa può fornire dati più sicuri riguardo alla presenza di cellule tumorali nel campione chirurgico e può permettere di discriminare con tessuti iperplastici o a bassa capacità proliferativa.

Per arrivare a descrivere un significato prognostico di questo tipo di analisi, bisognerà attendere, come detto, l'analisi a lungo termine dei pazienti.

L'analisi immunohistochimica permette anche di evidenziare un interessante aspetto quantitativo oltre che qualitativo dell'analisi della telomerasi. La positività telomerasica nucleare dei preparati fornisce un'idea qualitativa delle cellule e del loro numero, ma anche un aspetto quantitativo dovuto all'intensità di marcatura nucleare. Questo aspetto potrebbe rivelarsi importante dato che la quantità di enzima presente a livello nucleare correla con la capacità proliferativa e l'aggressività della cellula tumorale. Anche in questo caso è richiesta un'analisi a lungo termine dei pazienti che potrebbe mettere in stretta correlazione, oltre al numero di cellule telomerasi-positivo, il loro grado di positività con la probabilità di un'evoluzione infausta per il paziente

Per alcuni pazienti (6) è stato possibile effettuare l'analisi dell'attività telomerasica anche sulle cellule derivate dal lavaggio broncoalveolare (Tabella 2.1). Come si può osservare, nonostante la bassa numerosità dei campioni, il grado di correlazione tra il valore relativo alla telomerasi presente nel liquido broncoalveolare (BAL) non correla con accuratezza con il dato osservato con immunohistochimica, dato che solo in un caso vi è una chiara positività. La scarsa correlazione tra l'analisi della telomerasi nelle cellule derivate dal BAL e quelle ottenute con immunohistochimica direttamente sul frammento fissato, mette in evidenza come il materiale ottenuto per mezzo del BAL non sembri fornire una base analitica affidabile per le neoplasie a bassa stadiazione. Questo ci permette di affermare che le potenzialità del dosaggio telomerasico su BAL per evidenziare precocemente in modo non invasivo e rapido la presenza di neoplasie polmonari, non siano elevate. L'analisi dei campioni provenienti da pazienti con istotipi a stadiazione superiore ha permesso, invece, di mettere in evidenza sia alcune potenzialità del dosaggio telomerasico che alcuni limiti legati alla preparazione del campione. Anzitutto, bisogna premettere che il numero dei pazienti dai noi esaminato per gli stadi III e IV, non era tale da permettere di arrivare a delle conclusioni statisticamente definitive.

Il dosaggio della telomerasi sul BAL effettuato su questi pazienti ha messo in luce un limite del dosaggio. Infatti, si assiste frequentemente ad una negatività TRAP che sembra legata soprattutto alla presenza di un istotipo tumorale di tipo spinocellulare nella stadiazione III. Questo dato sembra essere in contrasto con i dati ottenuti dai pazienti con lo stesso tipo di neoplasia con stadiazione I, dove era stata dimostrata una netta presenza di cellule tumorali telomerasi-positivo con l'immunohistochimica. La spiegazione più plausibile sarebbe da ricercarsi, a nostro avviso, nelle caratteristiche di "neoplasia solida" dell'istotipo spinocellulare. Infatti, la progressione di questa neoplasia porta alla graduale esposizione sulla sua superficie di cellule

desquamanti e necrotiche e non di cellule tumorali. Il lavaggio BAL, quindi raccoglierebbe prevalentemente queste cellule esfoliate, dove sicuramente non è più presente attività telomerastica. Questa ipotesi, sembra trovare supporto nel fatto che il BAL effettuato su lesioni centrali dello stesso tipo, e quindi più facilmente accessibili, risulta anch'esso telomerasi-negativo. Inoltre, una possibile conferma viene dall'analisi immunohistochimica del caso di spinocellulare a stadio IIb incluso nello studio, dove è stata osservata la presenza di cellule telomerasi-positivo nella porzione più interna della massa, circondate da importanti porzioni necrotiche periferiche. Il caso era stato classificato con una positività (+) del 12% delle cellule per quanto riguarda l'esame immunohistochimica e negativo per il BAL.

I risultati riferiti alla positività telomerastica del BAL sono stati espressi come: negativo (-), poco positivo (+/-), sicuramente positivo (+), molto positivo (++) . Questi dati sono stati ottenuti dalla comparazione tra i dati misurati con la metodica TRAP tradizionale e quella TRAP-RTQ-PCR, e sono definiti complessivamente dal termine TRAP assay. La Figura 2.2 mostra un esperimento tipico TRAP tradizionale. La presenza dell'attività telomerastica è evidenziata da prodotti di amplificazione di frammenti elongati con 6 basi ripetute (TTAGGG). L'intensità complessiva delle bande in ogni colonna dà la misura quantitativa dell'attività telomerastica.

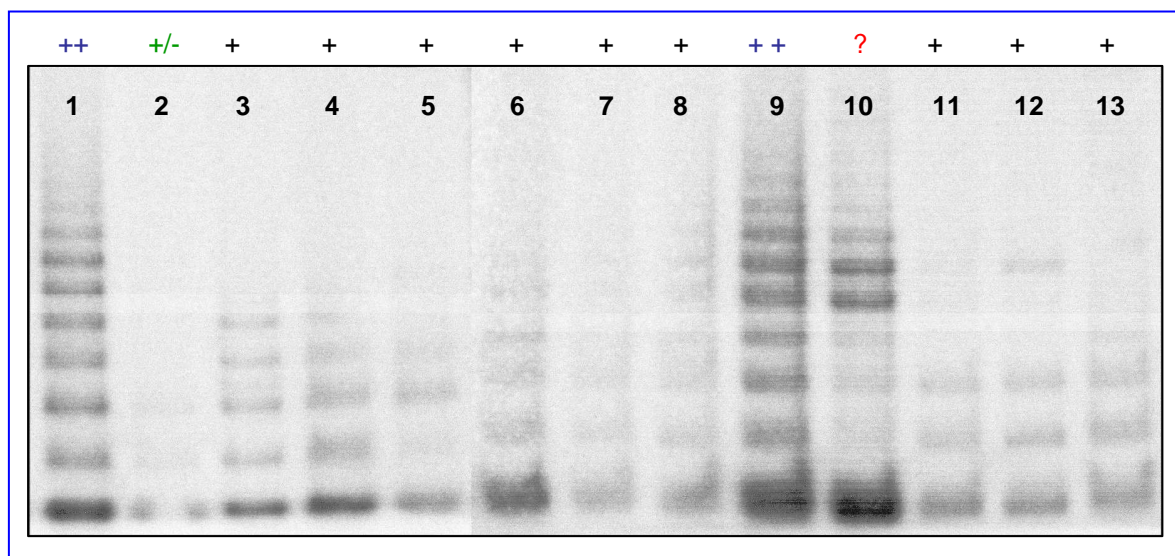


Figura 2.2. Esperimento tipico di TRAP: il bandeggio corrisponde ai prodotti di amplificazione dei frammenti elongati con 6 basi ripetute (TTAGGG) dovuti all'attività telomerastica. L'intensità delle bande correla con l'attività complessiva della telomerasi contenuta in 1 µg di proteina di ogni campione.

Colonna 1: controllo vero positivo (estratto da linea tumorale MCF-7): ++

Colonna 2: paziente con **blanda positività (+/-)**

Colonne 3-8 e 11-13: pazienti sicuramente positivi (+).

Colonna 9: paziente **molto positivo (++)**.

Colonna 10: **caso dubbio** da riconfermare con ripetizione dell'esperimento e TRAP-RTQ-PCR:

La Tabella 2.2 riassume i dati relativi ai casi di stadiazione III. Per questi 24 pazienti i dati clinici a disposizione sono stati limitati. Infatti, è stato possibile raccogliere solo dati relativi all'istotipo e all'effettiva stadiazione effettuata con analisi citologica mediante aspirato con ago sottile. L'analisi del liquido broncoalveolare (BAL) è stato riportato per ogni singolo paziente. Questi pazienti, che presentavano già processi metastatici, andavano incontro a terapia con farmaci antineoplastici. I pazienti sono stati raggruppati sia per sottotipizzazione (a o b) sia per l'attività telomerastica. È stato possibile ottenere dei gruppi omogenei per i quali si stanno seguendo degli studi di follow up che riguardano la ristadiatione (alcuni di questi dovrebbero essere ristadiati IV, e cioè con evoluzione infausta di patologia) e la risultante alla terapia.

Istotipo neoplasia	Stadio	"TRAP" su BAL
Spinocellulare	IIIa	negativo negativo
Adenocarcinoma	IIIa	negativo negativo negativo negativo
Adenocarcinoma	IIIb	negativo negativo
Spinocellulare	IIIb	negativo negativo negativo negativo negativo negativo negativo
Spinocellulare	IIIb	+ / - + / - + / - + / - + / - + / -
Adenocarcinoma	IIIb	+ + +

Tabella 2.2. Pazienti con stadio di malattia III (a e b) con relativa attività telomerastica.

Per alcuni di questi pazienti è già stato possibile ottenere dei dati relativi alla correlazione tra l'attività telomerasica e la risposta alla chemioterapia. Nella Tabella 2.3 sono riassunti i dati complessivi.

Istotipo	Stadio	TRAP" su BAL	Chemioterapia (CT)	Cicli completati	Evoluzione
Spinocellulare	IIIa	negat	Oxaliplatino (65 mg/m ²) 100 mg Vinorelbina (25 mg/m ²) entrambi gg 1-8 ogni 21 gg	5	Malattia stazionaria (SD =stable disease).
Adenocarc	IIIa	negat	Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Etoposide (VP 16)(120 mg/m ²) 180mg gg 1-3, ogni 21 gg	6	Risposta parziale (RP =partial response) sul mediastino. A 3 mesi dalla fine della CT ed a
Adenocarc	IIIb	negat	Carboplatino (400 mg) gg 1ogni 21 gg Vinorelbina (36.5 mg) gg	6	Risposta parziale (RP) alla CT. Malattia
Spinocellulare	IIIb	negat	1° linea: Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1ogni 21 gg Gemcitabina (1200 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg 2° linea per PD: Taxotere (75 mg/m ²) gg 1ogni 21 gg Carboplatino (400 mg) gg 1 ogni	6	Risposta alla CT. Progressione mediastinica (PD= progression disease) di malattia a 8 mesi dalla fine della CT.
Spinocellulare	IIIb	negat	Oxaliplatino (65 mg/m ²) 110 mg Gemcitabina (1000 mg/m ²) 1800mg entrambi gg 1-8 ogni 21 gg	6	Risposta completa (RC = complete response) alla CT a10 mesi dalla fine del trattamento.
Spinocellulare	IIIb	+ / -	1° linea: Cisplatino (80 mg/m ²) gg1ogni 21 gg Gemcitabina (1200 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg 2° linea: Taxotere (70 mg/m ²) 130 mg gg1 ogni 21 gg Temozolomide (200 mg/m ²) gg	4	Risposta parziale (RP) alla CT. Durante la seconda linea decesso per PD encefalica .
Adenocarcinoma	IIIb	+	Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1ogni 21 gg Etoposide (120 mg/m ²) gg 1-2-3 ogni 21 gg	4	Remissione mantenuta a 7 mesi dalla fine della CT poi decesso per PD

Tutti i pazienti sono in vita.

Risposta obiettiva alla terapia.

Evoluzione patologica favorevole.

Riduzione dei cicli di CT ed aumento progressivo dell'attività telomerasica.

Deceduti per PD encefalica.

Tabella 2.3. Pazienti con stadio di malattia III (a e b) con relativa attività telomerasica, schema terapeutico ed evoluzione della malattia.

Dalla tabella emergono alcune interessanti correlazioni. Anzitutto, i pazienti che presentavano assenza di attività telomerasica sopportavano un numero di cicli terapeutici maggiore rispetto ai gruppi in cui era evidenziabile un'attività enzimatica, anche se modesta. La cosa più importante però è che i pazienti telomerasi-negativi hanno avuto una risposta obiettiva alla terapia e sono attualmente in vita. I pazienti con telomerasi dimostrabile nel BAL, invece, sono deceduti entro i primi 4 cicli di chemioterapia.

Come è noto, il trattamento chemioterapico ha finalità palliativa o di sottostadiazione della neoplasia e quindi questi risultati, seppur privi di un reale significato statistico a causa della bassa numerosità del campione, danno alcune indicazioni che, se confermate, potrebbero dare un quadro prognostico più completo per descrivere le aspettative di vita del paziente. Anche in questo caso, il follow up di un numero significativo di pazienti permetterà di dimostrare con maggiore chiarezza il reale contributo del dosaggio della telomerasi

nella descrizione prognostica di pazienti in stadio avanzato. Si può comunque supporre che la positività telomerastica, più che alla diagnosi, sembra collegata alla capacità invasiva della neoplasia stessa. Elementi che sono di ulteriore sostegno possono però essere dedotti dall'analisi della casistica di stadiazione IV.

I casi riferiti allo stadio IV, 33 pazienti, sono riassunti nella Tabella 2.4.

Istotipo neoplasia	Dimensione della lesione	TRAP su BAL
Adenocarcinoma	50 mm	-
	52 mm	-
	30 mm	+ / -
	20 mm	+ / -
	60 mm	+ / -
	61 mm	+ / -
Ca a Grandi Cellule	50 mm	-
	50 mm	-
	35 mm	+
	33 mm	+
	30 mm	++
	31 mm	++
Ca Bronchiolo-alveolare	20 mm	+ / -
	31 mm	+ / -
	13 mm	+ / -
	14 mm	+
	40 mm	+
	30 mm	++
	50 mm	++
Ca Spinocellulare	51 mm	-
	49 mm	-
	50 mm	+ / -
	49 mm	+ / -
	51 mm	+ / -
	42 mm	+
	43 mm	+
	38 mm	+
	36 mm	+
	25 mm	+
	60 mm	++
	25 mm	++
	25 mm	++
28mm	++	

Tabella 2.4. Pazienti con stadiazione IV raggruppati per istotipo ed attività telomerastica nel BAL. Si noti la mancanza di correlazione tra l'istotipo, la dimensione e l'attività telomerastica.

Riassumendo i dati complessivi per la telomerasi dosata nei BAL, 6 casi su 33 si dimostravano telomerasi negativi (18 %), i restanti 27 presentavano attività telomerasica misurabile e tra questi 8 erano ad alta positività (24 %), 9 a media positività (27 %), e 10 a scarsa positività (30 %).

Bisogna segnalare l'alta positività delle neoplasie bronchiolo-alveolari (7 casi). I carcinomi bronchiolo-alveolari sono neoformazioni polmonari maligne solitamente non facilmente diagnosticabili e di non semplice diagnosi differenziale. La patologia, infatti, è caratterizzata, a livello radiologico, da un'estensione lobare senza netta delimitazione e simile ad un addensamento flogistico broncopolmonare. La diagnosi per questo tipo di patologia deriva essenzialmente dallo studio dell'ambiente alveolare attraverso il BAL e da prelievi bioptici ottenibili per via endoscopica. Partendo dai presupposti anatomo-patologici, per cui il carcinoma bronchiolo-alveolare origina da cellule di rivestimento della cavità alveolare disposte in singolo strato a rivestire la parete, è verosimile ipotizzare che tali cellule, esposte e più facilmente staccabili dalla parete stessa, possano venire più facilmente raccolte nel liquido di lavaggio bronco-alveolare. Questo può spiegare l'elevato valore di attività telomerasica riscontrata, più che la differente attività intrinseca della patologia. Il BAL e l'analisi della telomerasi eseguiti in caso di sospetto carcinoma bronchiolo-alveolare potrebbe verosimilmente avere un significato altamente predittivo per la diagnosi di questa patologia.

Poiché le neoplasie a stadiazione IV non vengono operate, non siamo in possesso di reperti istologici per l'analisi immunoistochimica che possano aiutare a comprendere il profilo telomerasico di queste neoplasie.

Bisogna anche sottolineare la presenza di un istotipo spinocellulare stadio IV di dimensioni elevate (60 mm) che possiede alta positività telomerasica. Questo dato ci pare interessante poiché permette di suggerire l'ipotesi che la neoplasia spinocellulare possa venire più facilmente diagnosticata per la telomerasi con il BAL, solo nelle fasi iniziali di sviluppo (stadio I) e nelle fasi molto avanzate della patologia (stadio IV), piuttosto che nelle sue fasi evolutive intermedie (stadio II e III).

Da questi dati si evidenzia anche come non esista una correlazione diretta tra l'estensione anatomica del tumore primitivo, l'istotipo e l'attività telomerasica. Per alcuni di questi pazienti (10) è stato possibile disporre dei dati relativi alla sopravvivenza. I dati sono stati riassunti nella Figura 2.3. che illustra un modello di curva di sopravvivenza elaborato secondo il modello Kaplan-Meyer.

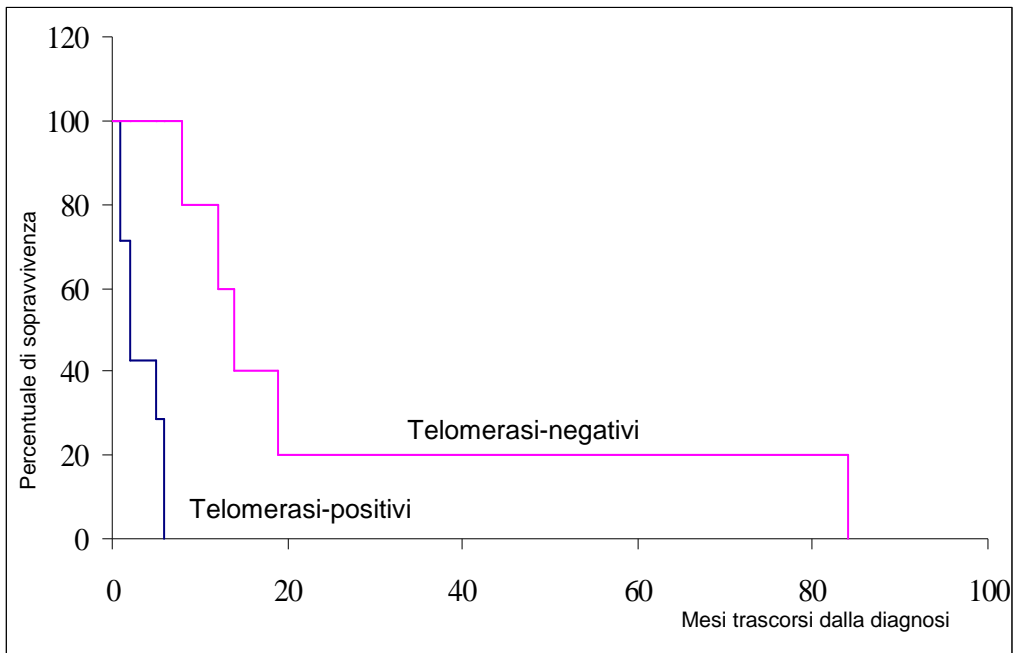


Figura 2.3. Analisi della sopravvivenza dei pazienti telomerasi-negativi (- e +/-, linea superiore) e telomerasi-positivi (+ e ++, linea inferiore) secondo Kaplan-Meyer. In ordinate sono riportate le percentuali di sopravvivenza in funzione dei mesi trascorsi dalla diagnosi. Alla data della diagnosi è stata effettuata anche l'analisi del lavaggio broncoalveolare.

Come si può osservare, le prospettive di vita dei pazienti che non presentavano attività telomerasica (telomerasi – e +/-) sono decisamente superiori. Purtroppo, la scarsa numerosità dei pazienti di cui si disponeva di un quadro completo di dati a partire dalla diagnosi, non ha permesso di fare valutazioni statisticamente significative, ma solo delle considerazioni. Pare comunque evidente che le aspettative di vita dei pazienti che non avevano valori significativi di attività enzimatica nel BAL fossero maggiori. Per meglio comprendere questi dati abbiamo anche analizzato la tipologia di trattamento chemioterapico a cui sono stati sottoposti i pazienti. I dati sono riassunti nella Tabella 2.5.

Istotipo neoplasia	Stadio	"TRAP" su BAL	Chemioterapia (CT)	Cicli completati	Evoluzione
Ca Spinocellulare	IV	-	Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21gg	9	No risposta ma PD. Decesso a 9 mesi dalla diagnosi.
Adenocarcinoma	IV	-	Gemcitabina (1350 mg) Oxaliplatino (88 mg) entrambi gg 1-8 ogni 21 gg	8	Risposta parziale (RP) e malattia stazionaria (SD). Attesa ristadiazione.
Ca a Grandi cellule	IV	+ / -	Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Gemcitabina (1200 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	8	Risposta parziale (RP). PD dopo 3 mesi dalla fine del trattamento e decesso del paziente.
Ca a Grandi cellule	IV	+ / -	Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Gemcitabina (1200 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	6	Assenza di risposta. PD con decesso a 8 mesi dalla diagnosi.
Adenocarcinoma	IV	+ / -	1° linea: Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg 2° linea: Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Gemcitabina (1350 mg) gg 1-8 ogni 21 gg 3° linea: Taxotere (75 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Vinorelbina per os (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg 4° linea: Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	20	Completati 6 cicli di 1a linea, 6 di 2a linea e 8 di 3a linea. PD da marzo 2003. Attualmente in vita.
Ca Spinocellulare	IV	+	Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	2	Paziente deceduto.
Ca a Grandi cellule	IV	+	1° linea: Cisplatino (80 mg/m ²) gg 1 ogni 21 gg Gemcitabina (1200 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg 2° linea: Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	3	PD alla ristadiazione quindi si inizia monoterapia palliativa. Decesso a 6 mesi dalla diagnosi.
Adenocarcinoma	IV	+	Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	2	PD. Decesso a 6 mesi dalla diagnosi
Ca Bronchiolo-alveolare	IV	++	Vinorelbina (25 mg/m ²) gg 1-8 ogni 21 gg	1	PD rapida e decesso a 1 mese dalla diagnosi.
Ca a Grandi cellule	IV	++	Gemcitabina (1000 mg/m ²) Oxaliplatino (65 mg/m ²) Entrambi gg 1-8 ogni 21 gg	1	PD rapida e decesso a 1 mese dalla diagnosi.

Riduzione progressiva del n° di cicli di CT effettuati ed aumento progressivo dell'attività telomerastica.

Tabella 2.5. Tabella riassuntiva degli schemi di terapia farmacologica adottata. Correlazione tra istotipi tumorali stadio IV, attività telomerastica in BAL, tipologia di farmaci, numero di cicli ed evoluzione clinica della malattia. CT= chemioterapia PD= progressione della malattia

Questi dati ci permettono di avere un quadro più completo dei pazienti. Come si può osservare, essi possono essere suddivisi in 4 gruppi, in base all'attività telomerastica nel BAL. Quelli telomerasi-negativi (-, 5/10) hanno dimostrato una capacità di sopportare mediamente un numero maggiore di cicli terapeutici, oltre ad essere rimasti in vita per un numero di mesi superiore ai pazienti ad alta positività. Questo tipo di patologie a stadiazione IV ha prognosi infausta, e la sopravvivenza media è assai ridotta. La terapia farmacologica non assume per questi pazienti un significato terapeutico.

Se si prende in considerazione la positività telomerastica, si può osservare che tutti i pazienti telomerasi negativi o scarsamente positivi, indipendentemente dal tipo di patologia e dallo schema terapeutico, sopportano un numero di cicli chemioterapici superiore ed hanno un'aspettativa di vita più lunga.

Il limitato numero di pazienti, anche in questo caso, non permette di fare ulteriori correlazioni, anche perché non siamo in possesso di molti dati riferiti a pazienti poco o scarsamente positivi per la telomerasi ma non in terapia presso la nostra struttura.

Per quanto riguarda i pazienti con significativa attività telomerasica (+ e ++), si osserva una scarsa prospettiva di vita correlata al basso numero di cicli terapeutici a cui i pazienti sono andati incontro. In particolare, nei pazienti ad elevata stadiazione (++, 2/10) il decesso interveniva molto rapidamente. Sembra importante rilevare che non sembra esserci alcuna correlazione tra telomerasi, aspettative di vita ed istotipo tumorale.

Come detto, il piccolo numero di pazienti di cui è stato possibile seguire l'evoluzione ed il quadro chemioterapico a cui sono andati incontro, non ci permette di chiarire l'importanza dei singoli fattori considerati nello studio. Sembrerebbe esserci una correlazione diretta tra l'evoluzione del livello di attività telomerasica e l'abbassamento delle prospettive di vita del paziente, ma, soprattutto, sembrerebbe esserci un abbassamento dell'efficacia terapeutica direttamente correlata con l'aumento della presenza della telomerasi.

Questi dati, nel complesso, propongono un ruolo potenziale del dosaggio della telomerasi nella prognostica delle neoplasie polmonari. Oltre a contribuire a formare un quadro più completo per descrivere ogni singolo paziente, il dosaggio enzimatico su campioni con una metodica non invasiva come il BAL permetterebbe di ottenere dati sull'evoluzione della patologia e probabili indicazioni sull'intervento terapeutico da adottare.

I dati, comunque, non ci permettono di chiarire se la presenza di telomerasi sia un indicatore di resistenza alla chemioterapia, oppure sia semplicemente un marker di progressione. L'auspicio è che con una casistica più ampia sarà possibile confermare alcune delle ipotesi presentate in questo lavoro.

CONCLUSIONI 2

Questo studio aveva tra i suoi intenti primari, quello di valutare il reale potenziale diagnostico della telomerasi nelle patologie neoplastiche polmonari. Abbiamo preso in considerazione questo tipo di neoplasie perché esistono ancora alcune problematiche legate sia alla corretta rilevazione diagnostica, che alla tipologia di trattamento da seguire. Inoltre, nell'ambito delle patologie polmonari le numerose varietà istotipiche rendono ulteriormente complesso l'aspetto diagnostico.

La corretta definizione di malattia e di stadiazione giocano un ruolo determinante per la sopravvivenza del paziente, poiché ne condizionano grandemente la terapia. La presenza di attività telomerasica correla con la presenza di cellule sicuramente tumorali nel campione biologico. Questo marker diagnostico specifico, è stato quindi scelto per valutare la possibilità di accrescere l'accuratezza diagnostica.

I dati raccolti in questo studio modificano sostanzialmente l'ipotesi legata al potenziale diagnostico di questo enzima che sembra comunque interessante, ma sensibile a numerose variabili legate soprattutto al corretto prelievo del campione di BAL da analizzare. I dati ottenuti con l'analisi immunocitochimica dell'enzima, contribuiscono notevolmente alla sua specificità diagnostica, ma non possono essere prodotti per patologie con stadiazione molto avanzata.

L'analisi complessa, che include dati diagnostici, terapia e "follow-up", anche se preliminari, suggerisce che la valutazione dell'attività telomerasica, possa avere anche un interessante valore prognostico.

Questi risultati, sicuramente incoraggiano ulteriori verifiche sperimentali per dimostrare se le ipotesi da noi suggerite da questo studio possano trovare conferma.

BIBLIOGRAFIA 2

➤ **Sito Web <http://www.cancer.gov> del National Cancer Institute (NCI):** accesso online ad informazioni sul cancro e sperimentazioni cliniche. Include il PDQ®, un database di informazioni sul cancro (prevenzione, screening, diagnosi, trattamento, genetica, studi clinici) e CANCERLIT®, database di citazioni ed estratti di articoli scientifici sul cancro.

➤ **Informazioni su ricerca, sintomi, diagnosi e trattamento del cancro del polmone. Pubblicazione del National Cancer Institute (NIH) N.ro 99-1553.**

Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, Klimstra D, Venkatraman E, Moore MA, Dmitrovsky E. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst.* **1997** Nov 5;89(21):1609-15.

American Cancer Society. Facts and Figures 2002. Atlanta, GA, *American Cancer Society*, **2002**, p4.

Arai T, Yasuda Y, Takaya T, Ito Y, Hayakawa K, Toshima S, Shibuya C, Yoshimi N, Kashiki Y. Application of telomerase activity for screening of primary lung cancer in broncho-alveolar lavage fluid. *Oncol Rep.* **1998** Mar-Apr;5(2):405-8.

Bach PB, M.J. Kelley, R.C. Tate, D.C. Mc.Crory. Screening for lung cancer. *Chest* **2003**, 123:72s-82s.

Böckmann B, Grill HJ Giesing M. Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors. *Biomolecular Engineering* 17 (**2001**) 95-111.

Buccheri G, Ferrigno D. Prognostic factors of small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* **2004** Apr;18(2):445-60 a.

Buccheri G, Ferrigno D. Prognostic factors. *Hematol Oncol Clin North Am.* **2004** Feb;18(1):187-201.b.

Buccheri G, Ferrigno D. The tissue polypeptide antigen serum test in the preoperative evaluation of non-small cell lung cancer: Diagnostic yield and comparison with conventional staging methods. *Chest* **1995**;107: 471-6.

Chen W, Xiong X, Zhou H, Zhou Q. Expression of telomerase activity, telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in lung cancer. *Chin Med J (Engl).* **2002** Feb;115(2):290-2.

Destro A, Bianchi P, Alloisio M, et al. K-ras and p16^{INK4A} alterations in sputum of NSCLC patients and heavy asymptomatic chronic smokers. *Lung Cancer* (**2004**) 44, 23-32.

Dikmen E, Kara M, Dikmen G, Cakmak H, Dogan P, Detection of telomerase activity in bronchial lavage asan adjunct to cytological diagnosis in lung cancer *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* **2003**, 23: 194-200.

Di Mari A, Bollina P., Tralongo P. "Farmaci chemioterapici nel tumore polmonare". Guida alla somministrazione e all'uso.- *Pacini Editore*

Eijkemans GJ, Takala J. Moving knowledge of global burden into preventive action. *Am J Ind Med.* **2005** Dec;48(6):395-9,

Falchetti ML, Levi A, Molinari P, Verna R, D'Ambrosio E. Increased sensitivity and reproducibility of TRAP assay by avoiding direct primers interaction. *Nucleic Acids Res.* **1998** Feb 1;26(3):862-3.

Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax.* **2003** Oct;58(10):892-900.

-
- Fujita Y**, Fujikane T, Fujiuchi S, Nishigaki Y, Yamazaki Y, Nagase A, Shimizu T, Ohsaki Y, Kikuchi K. The diagnostic and prognostic relevance of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression detected in situ in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. **2003 Sep 1**;98(5):1008-13.
- Giorgetti A**, Volterrani D, Mariani G. : "Clinical oncological applications of Positron Emission Tomography (PET) using fluorine-18-fluoro-2-deoxy-D-glucose" . *Radiologia Medica (Torino)* **2002** ;103(4): 293-318.
- Gomez-Roman JJ**, Romero AF, Castro LS, Nieto EH, Fernandez-Luna JL, Val-Bernal JF. Telomerase activity in pulmonary neuroendocrine tumors: correlation with histologic subtype (MS-0060). *Am J Surg Pathol*. **2000 Mar**;24(3):417-21.
- Gonzalez-Quevedo R**, Iniesta P, Moran A, de Juan C, Sanchez-Pernaute A, Fernandez C, Torres A, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Cooperative role of telomerase activity and p16 expression in the prognosis of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. **2002 Jan 1**;20(1):254-62.
- Hara H**, Yamashita K, Shinada J, Yoshimura H, Kameya T. Clinicopathologic significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. **2001 Nov**;34(2):219-26.
- Hess LJ** and Highsmith WE Jr. Telomerase detection in body fluids. *Clinical Chemistry* **48:1**; 18-24 ,**2002**.
- Hiyama E**, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett*. **2003 May 15**;194(2):221-33.
- Hiyama E**, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* **2002**, 21:643-649.
- Hiyama K**, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA and Shay JW. *Journal of immunol*, **1995**, 155: 3711-3715.
- Hiyama K**; Hiyama E; Ishioka S; Yamakido M; Inai K; Gazdar AF; Piatyszek MA; Shay JW .Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* **1995**, 87(12):895-902.
- Humphrey LL**, Teutsch S, Johnson M. Lung cancer Screening with Sputum Cytologic Examination, Chest Radiography, and Computed Tomography: An Update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*, 4 May **2004**, vol 140. Number 89: 740-755.
- Iniesta P**, Gonzalez-Quevedo R, Moran A, Garcia-Aranda C, de Juan C, Sanchez-Pernaute A, Torres A, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Relationship between 3p deletions and telomerase activity in non-small-cell lung cancer: prognostic implications. *Br J Cancer*. **2004 May 17**;90(10):1983-8.
- Junker K**. Prognostic factors in stage I/II non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. **2001 Sep**;33 Suppl 1:S17-24.
- Kaye FJ**. Molecular biology of lung cancer. *Lung Cancer* **34 (2001)** S35-S41.
- Keith WN**. In situ analysis of telomerase RNA gene expression as a marker for tumor progression. *Methods Mol Med*. **2003**;75:163-76.
- Kijima T**, Maulik G, Salgia R. Molecular alterations in lung cancer. Impact on prognosis. *Methods Mol Med*. **2003**;75:29-38.
- Kim NW**. Clinical implication of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* **1997**, 33: 781-786.
- Kim NW**, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **1994**, 266(5193):2011-5.
- Kiyohara C**, Yoshimasu K, Shirakawa T, Hopkin JM. Genetic polymorphisms and environmental risk of lung cancer: a review. *Rev Environ Health*. **2004 Jan-Mar**;19(1):15-38.

-
- Komiya T**, Kawase I, Nitta T, Yasumitsu T, Kikui M, Fukuoka M, Nakagawa K, Hirashima T. Prognostic significance of hTERT expression in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* **2000 Jun**;16(6):1173-7.
- Kumaki F**, Kawai T, Hiroi S, Shinomiya N, Ozeki Y, Ferrans VJ, Torikata C. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Hum Pathol.* **2001 Feb**;32(2):188-95.
- Lantuejoul S**, Soria JC, Moro-Sibilot D, Morat L, Veyrenc S, Lorimier P, Brichon PY, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E. Differential expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in lung tumours. *Br J Cancer.* **2004 Mar 22**;90(6):1222-9.
- Marchetti A**, Pellegrini C, Buttitta F, Falleni M, Romagnoli S, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, Angeletti CA, Roncalli M, Coggi G, Bosari S. Prediction of survival in stage I lung carcinoma patients by telomerase function evaluation. *Lab Invest.* **2002 Jun**;82(6):729-36.
- Marchetti A**, Bertacca G, Buttitta F, Chella A, Quattrocchio G, Angeletti CA, Bevilacqua G. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* **1999 Aug**;5(8):2077-81.
- Massion PP**, Carbone DP. From clinical and pathologic to molecular staging of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* **2003 Jun 15**;167(12):1587-8.
- Masutimi K**, Hahn C. Telomerase and tumorigenesis *Cancer Letters* **2003**, 194:163-172.
- Matakidou A**, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer.* **2005 Oct 3**;93(7):825-33.
- Meert anne-Pascale**, Martin B, Verdebout JM et al. Correlation of different markers (p53, EGF-R, c-erbB-2, Ki-67) expression in the diagnostic biopsies and the corresponding resected tumors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* (**2004**) 44, 295-301.
- Micke P**, Faldum A, Metz T, Beeh KM, Bittinger F, Hengstler JG, Buhl R. Staging small cell lung cancer: Veterans Administration Lung Study Group versus International Association for the Study of Lung Cancer--what limits limited disease? *Lung Cancer.* **2002 Sep**;37(3):271-6.
- Miura N**, Onuki N, Rathi A, Virmani A, Nakamoto S, Kishimoto Y, Murawaki Y, Kawasaki H, Hasegawa J, Oshimura M, Travis WD, Gazdar AF. hTERT repressor-related gene on human chromosome 10p15.1. *Br J Cancer.* **2001 Nov 16**;85(10):1510-4.
- Mountain CF**. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.* **1997 Jun**;111(6):1710-7.
- Nosenzo M., Tassi G**. "Percorsi Diagnostico-Terapeutici in Pneumologia"- EdiAipo **2000**.
- Osaki T**, Nagashima A, Yoshimatsu T, Tashima Y, Yasumoto K. Survival and characteristics of lymph node involvement in patients with N1 non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* **2004 Feb**;43(2):151-7.
- Osaki T**, Oyama T, Inoue M, Gu CD, Kodate M, Aikawa M, So T, Mizukami M, Mitsudomi T, Yasumoto K. Molecular biological markers and micrometastasis in resected non-small-cell lung cancer. Prognostic implications. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg.* **2001 Sep**;49(9):545-51.
- Papi A**, Casoni G, Caramori G, Guzzinati I, Boschetto P, Ravenna F, Calia N, Petruzzelli S, Corbetta L, Cavallesco G, Forini E, Saetta M, Ciaccia A, Fabbri LM. COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax.* **2004 Aug**;59(8):679-81.
- Pasini F**, Pelosi G, Valduga F, Durante E, de Manzoni G, Zaninelli M, Terzi A. Late events and clinical prognostic factors in stage I non small cell lung cancer. *Lung Cancer.* **2002 Aug**;37(2):171-7.

-
- Pastorino U**, M. Bellomi, C. Landoni et al. : "Early lung cancer detection with spiral CT and positron emission tomography in heavy smokers: 2 years results". *Lancet* **2003**; 362: 593-97.
- Patz EF**, S. Rossi, D.H. Harpole Correlation of tumor size and survival in patients with stage Ia non small lung cancer. *Chest* **2000**, 117: 1568-71.
- Rachtan J**. Smoking, passive smoking and lung cancer cell types among women in Poland. *Lung Cancer*. **2002 Feb**;35(2):129-36.
- Richiardi L**, Boffetta P, Simonato L, Forastiere F, Zambon P, Fortes C, Gaborieau V, Merletti F. Occupational risk factors for lung cancer in men and women: a population-based case-control study in Italy. *Cancer Causes Control*. **2004 Apr**;15(3):285-94.
- Sarvesvaran J**, Going JJ, Milroy R, Kaye SB, Keith WN. Is small cell lung cancer the perfect target for anti-telomerase treatment? *Carcinogenesis*. **1999 Aug**;20(8):1649-51.
- Sattler M**, Salgia R. Molecular and cellular biology of small cell lung cancer. *Semin Oncol*. **2003 Feb**;30(1):57-71
- Sekine Y**, Fujisawa T. [Prognostic factors on surgical treatment for lung cancer] *Kyobu Geka*. **2003 Jul**;56(8 Suppl):722-7. Abstract.
- Sen S**, Reddy VG, Guleria R, Jain SK, Kapila K, Singh N. Telomerase--a potential molecular marker of lung and cervical cancer. *Clin Chem Lab Med*. **2002 Oct**;40(10):994-1001.
- Sen, S.**, Reddy, V.G., Khanna, N., Guleria, R., Kapila, K. Singh. A comparative study of telomerase activity in sputum, bronchial washing and biopsy specimens of lung cancer *Lung Cancer* **2001**, 33: 41-49.
- Sobin LH**, Wittekind Ch eds - UICC: "TNM Classification of Malignant Tumors, 5th. ed." *John Wiley*, 1997, New York.
- Soria JC**, Brisgand D, Le Chevalier T. Do all patients with advanced non-small-cell lung cancer benefit from cisplatin-based combination therapy? *Ann Oncol*. **2001 Dec**;12(12):1667-70.
- Soria JC**, Morat L, Durdux C, Housset M, Cortez A, Blaise R, Sabatier L. The molecular detection of circulating tumor cells in bladder cancer using telomerase activity. *J Urol*. **2002 Jan**;167(1):352-6.
- Sozzi G**, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. **2003 Nov** 1;21(21):3902-8. *Epub* **2003 Sep 24**.
- Spyratos F**, Ferrero-Pous M, Trassard M, Hacene K, Phillips E, Tubiana-Hulin M, Le Doussal V. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer*. **2002 Apr** 15;94(8):2151-2159.
- Svobodnik A**, Yang P, Novotny PJ, Bass E, Garces YI, Jett JR, Bonner JA, Sloan JA. Quality of life in 650 lung cancer survivors 6 months to 4 years after diagnosis. *Mayo Clin Proc*. **2004 Aug**;79(8):1024-30.
- Taga S**, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yasumoto K. Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers. *Ann Surg*. **1999 Nov**;230(5):715-20.
- Taneja TK** and Sharma SK. Markers of small cell lung cancer. *World Journal of Surgical Oncology* **2004**, 2:10.
- Tomida S**, Koshikawa K, Yatabe Y et al. Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. *Oncogene* (**2004**), 1-11.

-
- Toomey D**, Smyth G, Condrón C, Kay E, Conroy R, Foley D, Hong C, Hogan B, Toner S, McCormick P, Broe P, Kelly C, Bouchier-Hayes D. Immune function, telomerase, and angiogenesis in patients with primary, operable nonsmall cell lung carcinoma: tumor size and lymph node status remain the most important prognostic features. *Cancer*. **2001** Nov 15;92(10):2648-57.
- Tyczynski JE**, Bray F, Parkin DM. Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol*. **2003** Jan;4(1):45-55. Review. Erratum in: *Lancet Oncol*. **2003** Jul;4(7):396.
- Volm M**, Rittgen W. Cellular predictive factors for the drug response of lung cancer. *Anticancer Res*. **2000** Sep- Oct;20(5B):3449-58.
- Wallace MB**, Block M, Hoffman BJ, Hawes RH, Silvestri G, Reed CE, Mitas M, Ravenel J, Fraig M, Miller S, Jones ET, Boylan A. Detection of telomerase expression in mediastinal lymph nodes of patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. **2003** Jun 15;167(12):1670-5. Epub **2003** Feb 20.
- Wang L**, Soria JC, Kemp BL, Liu DD, Mao L, Khuri FR. hTERT expression is a prognostic factor of survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. **2002** Sep;8(9):2883-9.
- Wang J**, Liu X, Jiang W, Liang L. Telomerase activity and expression of the telomerase catalytic subunit gene in non-small cell lung cancer: correlation with decreased apoptosis and clinical prognosis. *Chin Med J (Engl)*. **2000** Nov;113(11):985-90.
- Wang L**, Soria JC, Chang YS, Lee HY, Wei Q, Mao L. Association of a functional tandem repeats in the downstream of human telomerase gene and lung cancer. *Oncogene*. **2003** Oct 16;22(46):7123-9.
- Wang L**, Lin SH, Wu WG, Kemp BL, Walsh GL, Hong WK, Mao L. CAM1, a candidate tumor suppressor gene, is abnormally expressed in primary lung cancers. *Clin Cancer Res*. **2000** Aug;6(8):2988-93.
- Wege H**, Chui MS, Le HT, Tran JM, Zern MA. SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucleic Acids Res*. **2003** Jan 15;31(2):E3-3.
- Wood ME**, Kelly K, Mullineaux LG, Bunn PA Jr. The inherited nature of lung cancer: a pilot study. *Lung Cancer*. **2000** Nov;30(2):135-44.
- Wu TC**, Lin P, Hsu CP, Huang YJ, Chen CY, Chung WC, Lee H, Ko JL. Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas. *Lung Cancer*. **2003** Aug;41(2):163-9.
- Wu X**, Kemp B, Amos CI, Honn SE, Zhang W, Walsh GL, Spitz MR. Associations among telomerase activity, p53 protein overexpression, and genetic instability in lung cancer. *Br J Cancer*. **1999** May;80(3-4):453-7.
- Yahata N**, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Ando K, Hirano T, Tsuchida T, Kato H, Shay JW, Toyama K. Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst*. **1998** May 6;90(9):684-90.
- Yashima K**, Litzky LA, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistuba II, Milchgrub S, Srivastava S, Piatyszek MA, Shay JW, Gazdar AF. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res*. **1997** Jun 15;57(12):2373-7.
- Yokota J** and Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci*, March **2004**, vol.95, n°3: 197-204.
- Zaffaroni N**, De Polo D, Villa R, Della Porta C, Collini P, Fabbri A, Pilotti S, Daidone MG. Differential expression of telomerase activity in neuroendocrine lung tumours: correlation with gene product immunophenotyping. *J Pathol*. **2003** Sep;201(1):127-33.
- Zhu CQ**, Cutz JC, Liu N, Lau D, Shepherd FA, Squire JA, Tsao MS. Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. **2006** Apr 25; [Epub ahead of print].