

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dipartimento di Patologia Sperimentale

DOTTORATO DI RICERCA IN

Oncologia e Patologia sperimentale:

Progetto 2 “Patologia sperimentale”

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare: BIO 15

**Doxorubicina coniugata alla albumina
umana lattosaminata: azione antineoplastica
sui carcinomi epatocellulari indotti nel ratto
dalla dietilnitrosammina.**

Presentata da: Dott. Michele Baglioni

Coordinatore Dottorato

Prof. SANDRO GRILLI

Relatore

Prof. LUIGI FIUME

Esame finale anno 2008

INDICE:

INDICE:	1
Introduzione	3
Il carcinoma epatocellulare.....	6
Doxorubicina.....	10
Coniugazione della DOXO alla L-HSA.....	14
Modello sperimentale degli HCCs umani.....	16
Parte sperimentale	17
<i>Materiali e metodi</i>	18
Preparazione della L-HSA.....	19
Marcatura della HSA.....	19
Coniugazione della DOXO alla L-HSA.....	20
Animali ed induzione dei carcinomi epatocellulari.....	21
Determinazione della DOXO negli HCCs e negli organi del ratto.....	21
Adsorbimento della L-[¹⁴ C]HSA e della L- [¹⁴ C]HSA-DOXO alle cellule coltivate in vitro.....	22
Valutazione dell'accrescimento degli HCCs mediante ecografia.....	23
<i>Risultati</i>	24
Concentrazioni di DOXO negli HCCs e negli organi di ratti iniettati con il farmaco libero o coniugato alla L-HSA.....	25
Adsorbimento in vitro della L-HSA-DOXO a linee cellulari provenienti da HCCs e da altri tumori.....	31
Effetto della L-HSA-DOXO sulla funzionalità del fegato di ratti con danno epatico cronico.....	34
Ruolo dei residui di lattosio nella tollerabilità della L-HSA-DOXO.....	36
Attività antineoplastica della L-HSA-DOXO sugli HCCs dei ratti.....	40
Conclusioni ed esperimenti futuri	44
Bibliografia.	46

**Doxorubicina coniugata alla albumina
umana lattosaminata:**

**Azione antineoplastica sui carcinomi
epatocellulari indotti nel ratto dalla
dietilnitrosammina.**

Introduzione

L'argomento della mia tesi è stato lo studio della attività antineoplastica esercitata sui carcinomi epatocellulari (HCCs) del ratto da un coniugato della doxorubicina con l'albumina umana lattosaminata. Il razionale della preparazione di questo coniugato si basa sulla possibilità che nel trattamento degli HCCs che mantengono il recettore per le asialoglicoproteine (ASGP-R), l'indice chemioterapico dei farmaci che causano i principali effetti collaterali nei tessuti extra-epatici possa essere aumentato dalla coniugazione con macromolecole internalizzate attraverso questo recettore (1-3). L'ASGP-R è una glicoproteina presente solamente sulla superficie degli epatociti; esso causa la penetrazione intracellulare e la conseguente degradazione lisosomiale dei peptidi che terminano con residui di galattosio(4,5), i quali possono essere usati come carrier per trasportare i farmaci selettivamente nelle cellule parenchimali(6,7). In uno studio condotto su sessanta biopsie consecutive epatiche di HCCs umani l'ASGP-R è stato istochimicamente evidenziato sulla superficie di tutte le cellule di 28 su 35 (80%) forme ben differenziate del tumore, e di 5 su 25 (20%) forme poco differenziate (8). Questo risultato ha incoraggiato il tentativo di sviluppare una chemioterapia degli HCCs basata sulla presenza dell'ASGP-R. In linea con questo approccio, nel laboratorio dove ho svolto il mio dottorato, la doxorubicina (DOXO) è stata coniugata alla albumina umana lattosaminata (L-HSA), la quale è una neoglicoproteina con residui di galattosio che entra selettivamente negli epatociti dopo essersi legata all'ASGP-R(9) e che è stata usata con successo come carrier della adenina arabinoside in pazienti con epatite cronica B(10-12).

Prima di esporre gli esperimenti compiuti durante il mio dottorato darò una breve descrizione del carcinoma epatocellulare, della DOXO, della procedura di preparazione del coniugato L-HSA-DOXO e del modello animale utilizzato per studiare l'effetto del coniugato sugli HCCs.

Il carcinoma epatocellulare

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è il più comune tumore maligno primario del fegato e uno dei più frequenti tumori nel mondo(13). I fattori di rischio per la comparsa di questo tumore sono l'epatite cronica di tipo B o C, l'esposizione all'aflatossina, il consumo di alcool ed elevati livelli di ferro nel fegato. Nei Paesi Occidentali l'HCC è comunemente associato all'epatite cronica e alla cirrosi. Gli HCCs iniziano da lesioni precancerose che portano a HCCs ben differenziati (WD HCCs), i quali riproducono la morfologia degli epatociti e l'architettura del parenchima epatico, e possono progredire a forme non differenziate (PD HCCs), costituite da cellule anaplastiche, voluminose, spesso multinucleate, addossate le une alle altre. I PD HCCs possono però iniziare come tali senza originarsi da tumori ben differenziati. Gli esami ecografici hanno un ruolo chiave nella diagnosi dell'HCC, e sempre più spesso questo tumore viene diagnosticato quando è ancora asintomatico, in pazienti portatori di cirrosi epatica e soggetti a controlli frequenti (14). L'uso della tomografia computerizzata e apparecchiature per la risonanza magnetica sempre più sofisticate hanno portato ad una maggiore sensibilità e specificità delle tecniche diagnostiche dell'HCC. La diagnosi precoce rimane un punto chiave per migliorare la prognosi di questo tumore. Identificare la patologia quando sono presenti tumori ancora piccoli e asintomatici comporta migliori possibilità di trattamento. Determinare accuratamente lo stadio dell'HCC è importante per formulare le prognosi e per decidere la terapia migliore. Fattori importanti da considerare per il trattamento del tumore sono la grandezza, la multifocalità, la gravità di altre patologie epatiche presenti e lo stato di salute generale del paziente.

Da un punto di vista clinico, lo stadio del tumore considerato precoce è caratterizzato dalla presenza di un'unica massa inferiore ai 5 cm di diametro, oppure 3 noduli minori di 3 cm di diametro e dalla assenza di invasione vascolare e di metastatizzazione. Questi sono i requisiti necessari per poter ricevere trattamenti curativi con discrete possibilità di successo. Per questo motivo i pazienti a rischio sono sottoposti a programmi di sorveglianza, che hanno lo scopo di diagnosticare il tumore a questo stadio.

I trattamenti curativi per l'HCC comprendono la resezione chirurgica, l'ablazione percutanea e il trapianto di fegato. Perché sia possibile una resezione chirurgica il paziente deve avere una buona funzionalità epatica; in caso questa condizione non sia soddisfatta, il miglior trattamento per gli HCCs precoci non resecabili è l'ablazione percutanea con la quale si ottiene la necrosi del tumore tramite l'iniezione di agenti chimici, come l'alcool o l'acido acetico, o mediante l'uso di mezzi fisici come la radiofrequenza. Il trapianto è indicato quando le funzioni epatiche sono danneggiate, e il tumore non ha raggiunto i vasi sanguigni con probabilità di aver dato metastasi extraepatiche. Teoricamente il trapianto è il miglior trattamento per l'HCC poiché permette la rimozione, non solo del tratto epatico invaso, ma anche del tessuto circostante che è a rischio di sviluppare un altro cancro. Purtroppo il numero di trapianti possibili è limitato dall'alta frequenza degli HCCs e dalla mancanza di un sufficiente numero di donatori, il che allunga notevolmente i tempi di attesa. Durante questi ritardi, la progressione del tumore spesso fa sì che si esca dai parametri richiesti per il trattamento rendendo il paziente non più idoneo per il trapianto. La possibilità di trapianto ex-vivo potrà far aumentare il numero dei pazienti che possono essere sottoposti a questo trattamento terapeutico.

Attualmente il numero dei trapianti ex-vivo è limitato dalla complessità dell'intervento chirurgico che richiede "equipes" specificamente preparate e dal rischio di decesso per il donatore. Quando lo stadio del tumore è troppo avanzato perché gli interventi curativi siano efficaci si ricorre a trattamenti palliativi, come la chemoembolizzazione delle masse neoplastiche. L'ostruzione dell'arteria che nutre la zona del fegato sede della massa tumorale, ottenuta con l'iniezione di agenti come la gelatina, arresta il flusso ematico nei capillari del tumore, portandolo a necrosi. L'associazione a questi agenti di chemioterapici, quali la doxorubicina, aumenta l'azione antitumorale.

La chemioterapia sistemica è risultata poco efficace e causa pesanti effetti tossici collaterali. L'unico farmaco approvato dalla FDA per una terapia sistemica degli HCCs è il sorafenib tosilato (15), la cui formula di struttura è riportata nella fig.1

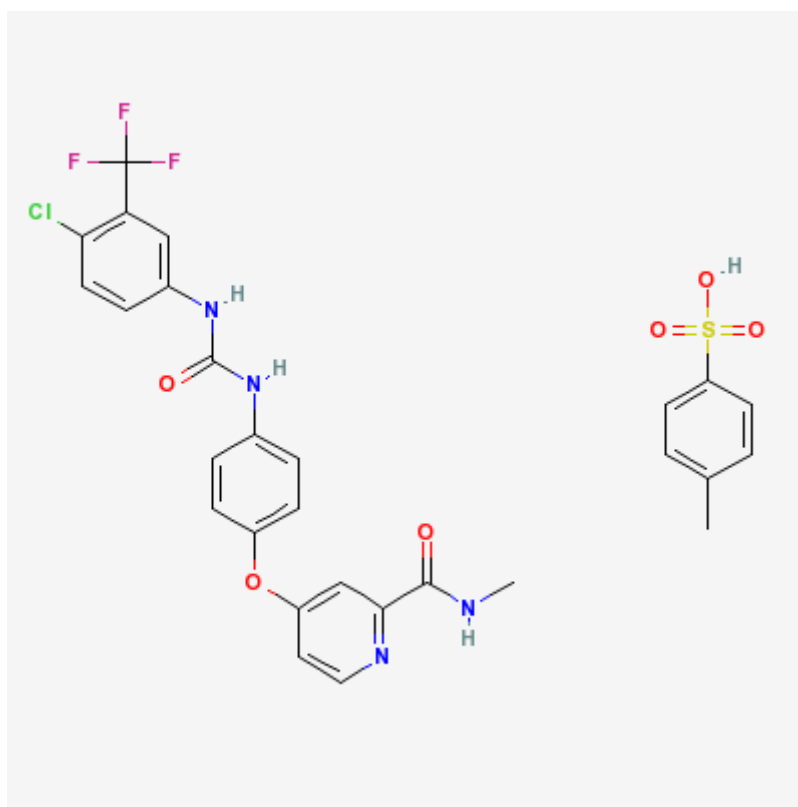


Fig. 1: Sorafenib tosilato.

Questo composto inibisce la proliferazione delle cellule neoplastiche e l'angiogenesi tumorale in un ampio spettro di modelli di tumori. Agisce inibendo le chinasi Raf1 e B-Raf, le chinasi dei recettori 1,2,3 del fattore di accrescimento endoteliale (VEGF) e la chinasi del recettore del fattore di crescita di origine piastrinica (PDGF). In studi clinici di fase III il sorafenib ha prodotto in pazienti con HCCs in stadio avanzato un assai modesto aumento del tempo di sopravvivenza (3 mesi) rispetto ai pazienti trattati con placebo. La scarsa efficacia della chemioterapia sistemica degli HCCs con i farmaci attualmente a disposizione sprona un'attiva ricerca di nuovi agenti più efficaci.

Doxorubicina

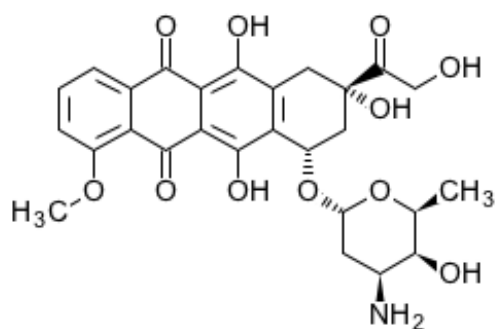


Fig. 2: Doxorubicina

La DOXO (fig 2) appartiene alla famiglia delle antracicline, la cui storia comincia negli anni 50, quando i ricercatori dell'industria Farmitalia cominciarono a cercare composti antineoplastici prodotti dai microbi; essi prelevarono campioni di terreno dall'area circostante Castel del Monte (Apulia) e isolarono alcuni batteri scoprendo che uno di essi, lo *Streptomyces Peucetius* produceva un pigmento rosso vivo che si mostrò molto attivo sui tumori murini. Questo composto fu chiamato daunomicina, dai Dauni, popolazione pre-romana che occupò la zona dove il composto era stato isolato. Quasi nello stesso tempo, un gruppo di ricercatori francesi isolò un antitumorale che chiamarono rubidomicina. Si trovò che la daunomicina e la rubidomicina erano la stessa molecola che fu chiamata daunorubicina. I trials clinici (16) con il nuovo farmaco cominciarono negli anni 60 per il trattamento delle leucemie acute e dei linfomi. Nel '67 si osservò che il farmaco causava tossicità cardiaca, che poteva risultare fatale al paziente. I ricercatori della Farmitalia scoprirono dopo poco che si poteva modificare l'attività biologica della daunorubicina introducendo piccole modifiche alla sua struttura.

Lo *Streptomyces peucetius* fu mutato usando lo N-metil N-nitroso uretano, ottenendo una nuova sottospecie di *S.Peucetius* che produceva un altro antibiotico di colore rosso, nominato “adriamicina” per la vicinanza al mare Adriatico, che dista solo pochi chilometri dal luogo dove era stato raccolto l’originale campione di terreno. Il composto fu ribattezzato successivamente doxorubicina, che chimicamente è il 14 idrossi derivato della daunorubicina (17).

La doxorubicina dimostrò subito avere un’attività maggiore verso i tumori solidi rispetto alla daunorubicina e mostrò anche un più alto indice chemioterapeutico, sebbene conservasse anch’essa la cardiotossicità della daunorubicina. La nuova sottospecie batterica non produceva però abbastanza doxorubicina (soprattutto in previsione di una produzione di massa). Un altro ricercatore (Hutchinson) dimostrò che altre specie di *Streptomyces*, fatte crescere in particolari condizioni o opportunamente modificate geneticamente potevano produrre doxorubicina. Furono clonati molti geni implicati nella produzione della Doxorubicina e Strohl e il suo gruppo riuscì ad isolare il gene Dox A, il quale codificava l’enzima responsabile della modificazione della daunorubicina in doxorubicina (18). In seguito Hutchinson, creò un metodo di fermentazione, per la produzione su larga scala della doxorubicina, non solo introducendo un plasmide che conteneva il Dox A, ma anche spegnendo i geni responsabili di vie metaboliche secondarie che riducevano la resa della doxorubicina, aumentando così la produzione del farmaco (19). Nel 1999 si produssero nel mondo 225 kg di doxorubicina al costo di 1,3 milioni di dollari /kg (19).

Prendendo come capostipiti la daunorubicina e la doxorubicina, col passare del tempo furono creati molti composti analoghi di questa famiglia, sfruttando la facilità con cui si possono introdurre modifiche chimiche alla loro struttura. Si calcola che fino a oggi siano stati sviluppati circa 2000 analoghi. Al 1991, 553 analoghi erano stati già valutati in programmi di screening del National Cancer Institute (USA) (16).

Nonostante molteplici studi, il meccanismo d'azione della doxorubicina non è stato ancora completamente chiarito (20). Il primo meccanismo d'azione proposto prendeva in considerazione la capacità della doxorubicina di intercalare il DNA. A livello del nucleo cellulare, dove si raccoglie la maggior parte della doxorubicina entrata nella cellula, l'antibiotico si inserisce nella doppia elica di DNA parallelamente alle coppie di basi. Questa inserzione impedisce la sintesi degli acidi nucleici. Tuttavia questo effetto si osserva a concentrazioni molto maggiori di quelle che si possono raggiungere con le dosi terapeuticamente attive. Attualmente la opinione più accreditata, è che l'azione antitumorale della doxorubicina e delle altre antracicline, sia da attribuire alla inibizione della topoisomerasi II e/o alla formazione di radicali liberi. È stato osservato che, alle concentrazioni che si raggiungono con le dosi farmacologicamente attive, le antracicline inibendo la topoisomerasi II, determinano rotture della doppia elica di DNA. Alcune peculiarità della citotossicità della doxorubicina, ed in particolare modo della cardiotoxicità, hanno fatto pensare ad ipotesi alternative che si basano su proprietà biologiche delle antracicline riconosciute negli ultimi anni. Numerosi composti di questa classe di antibiotici, compresa la doxorubicina, vengono ridotti metabolicamente a livello microsomiale e nucleare da alcuni sistemi enzimatici.

L'aggiunta di un elettrone converte i chinoni della doxorubicina in radicali semichinonici che possono danneggiare direttamente il DNA o, interagendo con l'ossigeno molecolare, possono produrre superossidi, radicali idrossilici, e perossidi. Le antracicline inoltre, interagiscono direttamente con le strutture di membrana causando alterazioni sia della membrana citoplasmatica che di quella mitocondriale. Le conseguenti alterazioni della permeabilità cellulare possono causare o almeno concorrere a causare la citotossicità.

In conclusione, allo stato attuale si pensa (20) che l'azione della doxorubicina sull'accrescimento dei tumori e quella tossica sulle cellule che si dividono sia dovuta soprattutto alla inibizione della topoisomerasi II, mentre la cardiotoxicità sarebbe dovuta principalmente alla formazione di radicali ossidanti e a modificazioni delle membrane cellulari.

Coniugazione della DOXO alla L-HSA

Il lattosio è coniugato ai gruppi ϵ -amminici dei residui lisinici della HSA mediante amminazione riduttiva(9). Il lattosio è un disaccaride costituito da galattosio e glucosio. Il gruppo aldeidico del glucosio forma una base di Schiff con i gruppi ϵ -amminici che è stabilizzata mediante l'uso di un riducente (sodio cianoboroidruro). Il galattosio non è così modificato e può legare l'ASGP-R. Quando 20-25 moli di lattosio sono legate ad una mole di HSA, la L-HSA entra selettivamente negli epatociti. In laboratorio, per preparare i coniugati della DOXO usiamo preparazioni di L-HSA con un rapporto molare zucchero/proteina che va da 24 a 26 (la HSA possiede 59 residui di lisina). La DOXO è coniugata alla L-HSA usando il suo derivato (6-maleimidocaproil)idrazone (DOXO-EMCH) (fig 3)

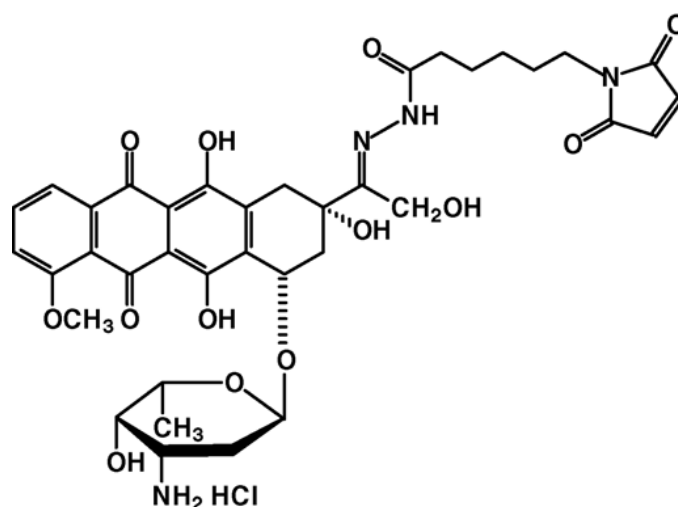


Fig. 3: Derivato (6-Maleimidocaproil)idrazone della doxorubicina

per la prima volta sintetizzato nei laboratori della Bristol-Myers Squibb dove è stato usato per legare la DOXO ad anticorpi monoclonali specifici per antigeni associati ad alcuni tumori(21). Perché un coniugato farmaco-macromolecola sia farmacologicamente attivo è necessario che il legame tra il farmaco e il carrier sia rapidamente rotto all'interno delle cellule

bersaglio. Il legame idrazonico della DOXO-EMCH ha questa proprietà: infatti esso è stabile al pH neutro del plasma, ma è rapidamente idrolizzato nei compartimenti acidi degli endosomi e dei lisosomi(22). Nella coniugazione mediante DOXO-EMCH il gruppo maleimidico forma un legame tioetereo stabile con i gruppi -SH della proteina resi disponibili da reagenti riducenti. La reazione di coniugazione con la L-HSA è stata semplificata sostituendo gli agenti tiolici con la tris(2-carboxietil) fosfina, che elimina la necessità di una atmosfera inerte e permette una coniugazione “one-step” eliminando la necessità di una purificazione della proteina ridotta(23) (fig. 4).

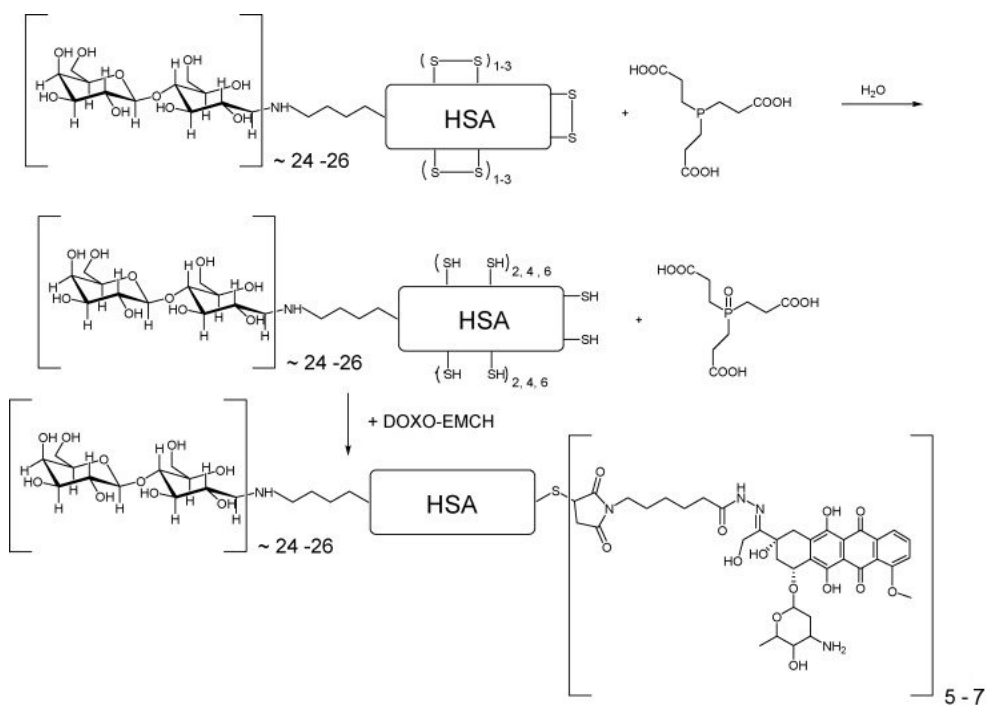


Fig. 4: Reazione di coniugazione e struttura del coniugato L-HSA-DOXO.

Il rapporto molare DOXO/L-HSA delle preparazioni del coniugato varia da 5 a 7 (1 mg di coniugato contiene 36-50 µg di DOXO).

Modello sperimentale degli HCCs umani

Come modello sperimentale dei pazienti con HCCs, usiamo ratti con tumori epatici indotti dalla dietilnitrosammina (DENA) (24). La DENA viene somministrata nell'acqua da bere (100 mg/ml) per due mesi. Un mese dopo l'ultimo giorno di somministrazione della DENA si possono osservare sulla superficie epatica, noduli grossolanamente sferici con un diametro variabile dai 2 ai 10 mm. Tutti i noduli analizzati istologicamente si sono rivelati essere HCCs con un aspetto istologico trabecolare (ben differenziati, WD), solido (poco differenziati, PD) (Fig. 5) o intermedio (mediamente differenziati, MD).

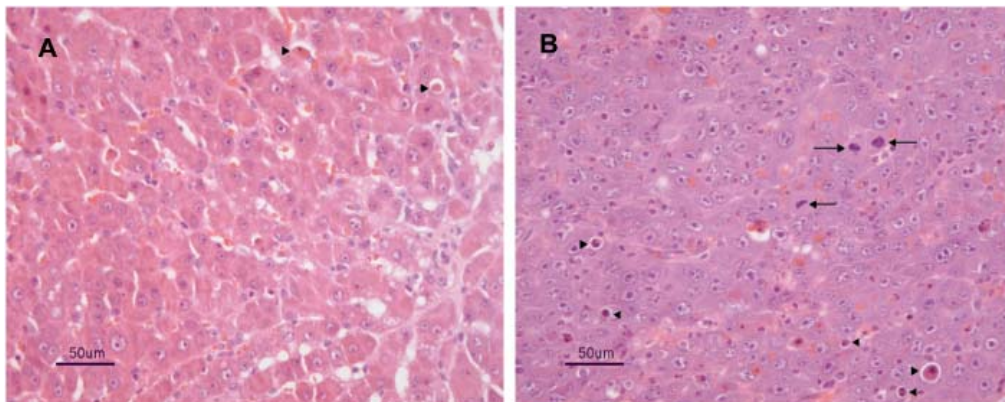


Fig 5: Carcinomi epatocellulari ben differenziati (A) e poco differenziati (B). (A): epatociti isomorfici con citoplasma eosinofilo e nucleoli prominenti sono disposti in trabecole separate da capillari; il grado di atipia cellulare è basso. Solo pochi corpi apoptotici sono presenti (indicati dalle punte di freccia). (B): Epatociti con nuclei polimorfici, nucleoli ingranditi e citoplasma basofilo sono addossati l'uno all'altro conferendo al tessuto un aspetto solido. Si osservano parecchie figure mitotiche (freccie) e corpi apoptotici (punte di freccia).

I WD HCCs accumulano il carrier L-HSA radiotattivo (marcato con [^{14}C]-formaldeide) mediante l'ASGP-R al contrario dei PD HCCs, la maggioranza dei quali internalizza la L- ^{14}C -HSA in quantità non superiori a quelle dei tessuti extra-epatici(25).

Parte sperimentale

Materiali e metodi

Preparazione della L-HSA

L'albumina umana (HSA) (Kedrion Italia) è gel filtrata su una colonna Sephacryl S-200 (Sigma) equilibrata ed eluita con bicarbonato d'ammonio 0,1 M, e la frazione corrispondente al monomero dell'albumina è liofilizzata. In una reazione tipica di lattosaminazione, 200 mg di HSA monomero sono sciolti in 10 ml tampone fosfato 0,4 M pH 7. Si aggiungono 800 mg di α -lattosio e successivamente 500 mg di sodiocianoboroidruro (NaBH_3CN). La miscela di reazione è incubata a 37 °C per 40 ore e successivamente è dializzata contro H_2O . La L-HSA è liofilizzata ed il rapporto molare lattosio/proteina, viene calcolato misurando il lattosio con il metodo di Dubois (26) usando uno standard di galattosio, e la proteina con il metodo di Lowry(27)

Marcatura della HSA

Il monomero di HSA ottenuto per gel filtrazione (vedi sopra) è stato marcato con [^{14}C] formaldeide (Perkin Elmer) ($56\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) mediante reazione di alchilazione riduttiva secondo Jentoft e Dearborn (28). In ciascuna preparazione, 200 mg di HSA vengono sciolti in 6 ml di tampone K/PO_4 0,2 M pH 8 a cui sono aggiunti 900 μl di tampone contenenti $250\mu\text{Ci}$ di [^{14}C] formaldeide. Dopo 15 minuti a temperatura ambiente vengono aggiunti 10 mg di sodiocianoboroidruro. La miscela di reazione è incubata a 37 °C per 30 minuti e successivamente dializzata contro H_2O . La [^{14}C]-HSA è liofilizzata e la sua attività specifica è calcolata misurando la radioattività con l'uso di un beta-counter (Perkin Elmer), e la concentrazione della proteina con il metodo di Lowry (27).

L'attività specifica delle differenti preparazioni è risultata essere compresa tra $1,4$ e $1,6 \times 10^3$ dpm/ μg che corrisponde ad un residuo di [^{14}C] formaldeide per molecola di HSA.

Coniugazione della DOXO alla L-HSA

La DOXO-EMCH impiegata nella coniugazione è stata sintetizzata secondo il metodo di Willner(21), dal Dr. Kratz del Centro di Biologia dei Tumori di Friburgo, che collabora con il laboratorio in cui ho svolto il dottorato. In una reazione tipica di coniugazione(23) 100 mg di L-HSA ($1,25\mu\text{mol}$) sono sciolti in 8 ml di tampone sodio carbonato $0,1$ M pH 9 ai quali si aggiungono 10 mg di tris (2-carbossietil) fosfina (TCEP) ($35\mu\text{mol}$) sciolti in 2 ml dello stesso tampone. La DOXO-EMCH (28mg/ml in N,N dimetilformamide) è aggiunta in 12 aliquote ciascuna di $75\mu\text{l}$ separate da un intervallo di $2,5$ min (quantità totale impiegata = 25 mg corrispondenti a $32\mu\text{mol}$). La miscela di reazione è mantenuta a $24\text{ }^\circ\text{C}$ e termina $2,5$ minuti dopo l'ultima aggiunta di DOXO-EMCH. Il coniugato è quindi purificato per gel filtrazione su colonna di Sephadex G.25 (Sigma) equilibrata ed eluita con bicarbonato d'ammonio $0,1$ M e successivamente liofilizzato. Il rapporto molare (moli di DOXO / moli di L-HSA) è calcolato misurando la proteina con il metodo di Lowry (27), e la DOXO mediante la misura dell'assorbimento della DOXO-EMCH a lunghezza d'onda di 495 nm, [$\epsilon_{495}(\text{pH } 7,4) = 9250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

Animali ed induzione dei carcinomi epatocellulari

Ratti Wistar maschi (150-200 g) sono stati ottenuti dalla Harlan Italia, e mantenuti nello stabulario del Dipartimento di Patologia sperimentale dell'Università di Bologna. Gli animali hanno ricevuto una dieta standard a base di pellets ed acqua ad libitum. Tutti gli esperimenti sono stati svolti nel rispetto delle norme legislative della comunità europea sulla sperimentazione animale, e i protocolli degli esperimenti sono stati approvati dalla commissione etica dell'Università di Bologna. Per l'induzione degli HCCs vedi pag 16

Determinazione della DOXO negli HCCs e negli organi del ratto

Sono stati usati 80 ratti trattati con DENA (vedi pag 16). Quattro o cinque settimane dopo la fine della somministrazione della DENA, gli animali hanno ricevuto nella vena peniena in anestesia da isofluorano, soluzione fisiologica o DOXO non coniugata (F-DOXO (Free-DOXO)) o DOXO coniugata alla L-HSA. La dose di DOXO somministrata o come farmaco libero o come farmaco coniugato era di 1µg/g.

Ai tempi indicati nelle figure e nelle tabelle gli animali sono stati uccisi mediante inalazione di isofluorano. Gli organi sono stati rapidamente rimossi, pesati e congelati per la successiva determinazione della DOXO (il midollo osseo è stato raccolto in una provetta pre-pesata insufflando aria con una siringa nei due femori). I noduli neoplastici sono stati accuratamente dissecati dal fegato circostante, pesati e divisi in due metà.

Una parte era pesata e congelata per la successiva determinazione della DOXO; l'altra parte era fissata per l'esame istologico.

Il peso dei noduli variava da 10 a 50 mg. La DOXO è stata misurata con il metodo di Bots(29) con le modifiche descritte in (30). Negli animali iniettati con i coniugati marcati con [¹⁴C] formaldeide si è determinata la radioattività totale dei noduli neoplastici e degli organi.

Adsorbimento della L-[¹⁴C]HSA e della L-[¹⁴C]HSA-DOXO alle cellule coltivate in vitro

Le cellule sono state seminate in piastre per colture cellulari da 6 pozzetti di 35 mm di diametro (Falcon) (0,2-05 x 10⁶ cellule per pozzetto). L'adsorbimento è stato misurato quando le cellule avevano raggiunto la completa confluenza e la superficie della plastica era completamente coperta dal monostrato cellulare. Questo richiedeva dai 2 ai 4 giorni di coltura. Il mezzo di coltura (variabile a seconda della linea coltivata) era sostituito con con 900µl di tampone Tris-HCl (TB) 0,15 M pH 7,2 e le cellule erano incubate per 5 minuti a 0-4 °C. Per iniziare l'adsorbimento erano aggiunti 100µl di TB contenenti la L-[¹⁴C]HSA o la L-[¹⁴C]HSA-DOXO (750 µg/ml) e le cellule erano incubate a 0-4°C. Dopo 30 minuti il sopranatante era aspirato e i pozzetti erano lavati 3 volte con 1 ml di TB. Successivamente veniva aggiunto 1 ml di KOH 1N e dopo 5 minuti veniva contata la radioattività di un aliquota di 900µl del lisato cellulare.

Valutazione dell'accrescimento degli HCCs mediante ecografia

Tutte le osservazioni ecografiche sono state eseguite dallo stesso operatore (Dott. G. Rubini) che possiede esperienza nel campo dell'ultrasonografia dei piccoli animali.

L'operatore esaminava i ratti senza conoscerne il trattamento. È stato usato un ecografo Esaote MyLab 25 (Esaote, Italia) impiegando una frequenza di 15 MHz. Durante le osservazioni i ratti erano mantenuti in anestesia ottenuta con isofluorano. L'addome dei ratti era depilato con un rasoio elettrico, bagnato con alcool e spalmato con l'usuale gel impiegato per facilitare la trasmissione degli ultrasuoni. La sonografia è stata eseguita per piani longitudinali e trasversali. Per ciascun nodulo è stato marcato il contorno della sezione che presentava i diametri maggiori ed era successivamente calcolata la corrispondente area. La procedura aveva una sensibilità che permetteva la misura di noduli con un area di soli 3mm² (per la validazione della procedura vedi pag 40). Nelle successive sessioni ecografiche i singoli noduli venivano riconosciuti sulla base della loro particolare collocazione nel lobo e della vicinanza a strutture di riferimento, quali i maggiori vasi sanguigni e i margini del fegato.

Risultati

Concentrazioni di DOXO negli HCCs e negli organi di ratti iniettati con il farmaco libero o coniugato alla L-HSA.

Con i primi esperimenti del mio dottorato, ho misurato nel ratto le concentrazioni di DOXO negli HCCs e negli organi bersaglio della tossicità del farmaco (cuore, midollo osseo ed intestino) dopo somministrazione di uguali dosi del farmaco non coniugato (F-DOXO) o coniugato alla L-HSA (L-HSA-DOXO). Lo scopo di questi esperimenti era di ottenere una stima del potenziale incremento dell'indice chemioterapeutico della DOXO dopo coniugazione. In alcuni di questi esperimenti è stato anche usato un coniugato preparato con albumina lattosaminata di ratto (L-RSA-DOXO) ed un coniugato preparato con la albumina non lattosaminata (HSA-DOXO).

In ratti con tumori indotti con la DENA, la F-DOXO e la L-HSA-DOXO sono state iniettate endovena alla dose di 1mg DOXO/kg che è il doppio della dose somministrata settimanalmente ai pazienti (20 mg/m² corrispondenti approssimativamente a 0,5 mg/Kg). A diversi tempi dopo l'iniezione si sono misurate le concentrazioni di DOXO nelle diverse forme di HCCs. Anche negli animali iniettati con il coniugato è stato determinato il farmaco libero (cioè la DOXO liberata dal carrier dopo penetrazione intracellulare del coniugato). La Fig. 6 mostra le concentrazioni di DOXO nelle 24 hr seguenti le somministrazioni. Le aree sotto la curva ($AUC_{(0-24h)}$) delle concentrazioni sono riportate nella Tab.1.

Tab 1. AUC_(0-24h) delle concentrazioni di DOXO nei WD, MD e PD HCCs in ratti iniettati con la stessa dose (1 µg/g) di F-DOXO o di DOXO coniugata alla L-HSA

Composto	nmol x h / g tessuto		
	WD HCCs	MD HCCs	PD HCCs
F- DOXO	42.2	52.9	43.9
L-HSA-DOXO	132.6	98.5	84.7

Le AUCs sono state calcolate dai dati della fig 6. usando il software Graphpad Prism 3.02

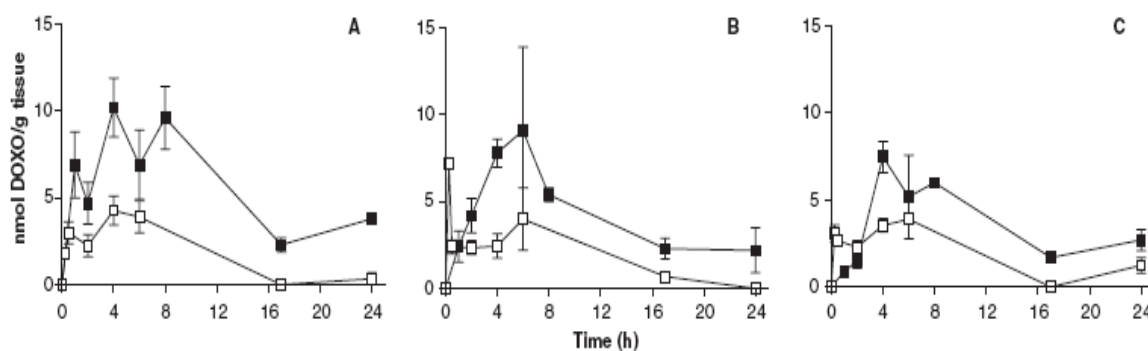


Fig. 6: Concentrazioni di DOXO nei carcinomi bene (A), moderatamente (B) e poco (C) differenziati dopo l'iniezione endovena di 1 µg/g di F-DOXO (□) e di DOXO coniugata alla L-HSA (■). Per ciascun composto, intervallo di tempo e grado di differenziazione di HCC (WD,MD,PD) sono stati studiati 3-15 noduli neoplastici. Essi sono stati ottenuti da 3-6 animali; lo studio è stato eseguito su un totale di 310 noduli HCCs. Sia nel gruppo di ratti trattati con F-DOXO sia in quello trattato con DOXO coniugata, alcune determinazioni della DOXO sono state eseguite agli stessi intervalli (2,4,6,17 e 24 h) Per ciascuna forma di differenziazione del tumore le differenze fra i valori misurati a questi tempi nei due gruppi di animali sono stati valutate statisticamente mediante test ANOVA a due vie, usando come fattori l'intervallo di tempo e la forma del farmaco (libero o coniugato). Per tutti gli intervalli di tempo una differenza statisticamente significativa è stata trovata fra le due forme di farmaco ($P < 0,0001$ per i WD HCCs; $P < 0,05$ per gli MD e PD HCCs).

Inaspettatamente le concentrazioni del farmaco negli animali iniettati con il coniugato sono risultate due volte più elevate di quelle determinate nei ratti iniettati con la F-DOXO non solo nei WD HCCs ma anche nei tumori a media e bassa differenziazione, i quali nonostante l'assenza del ASGP-R(25) hanno internalizzato elevate quantità di coniugato.

Questo è stato dimostrato dai valori di radioattività misurati nei tumori PD che nei ratti iniettati con un coniugato latosaminato radioattivo, sono risultati quattro volte superiori a quelli determinati negli animali che avevano ricevuto una egual dose del carrier L- 14 C]-HSA (Fig 7).

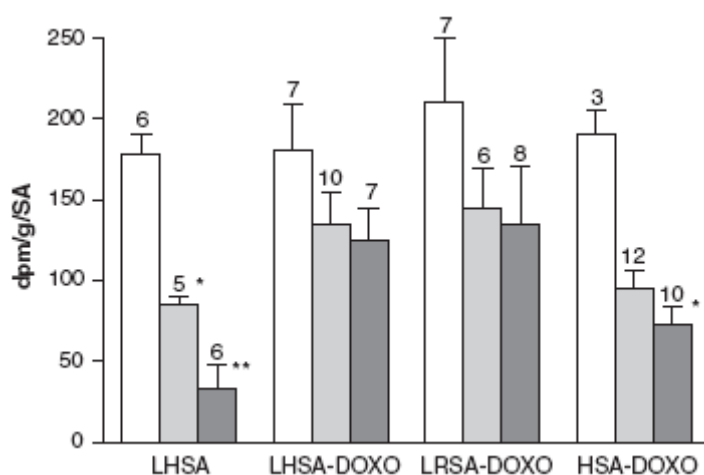


Fig. 7: Distribuzione della L- 14 C]-HSA, L- 14 C]-HSA-DOXO, L- 14 C]-RSA-DOXO, e 14 C]-HSA-DOXO negli HCCs WD (colonne bianche) MD (colonne grigie) PD (colonne grigio scure). I ratti sono stati uccisi 4 h dopo la somministrazione i.v dei composti. La L- 14 C]-HSA è stata iniettata alla dose di 22,5 μ g/g, la L- 14 C]-HSA-DOXO e L- 14 C]-RSA-DOXO sono state iniettate alla dose di 24 μ g/g (24 μ g di coniugato contenevano 1 μ g di DOXO e 23 μ g di albumina lattosaminata). La 14 C]-HSA-DOXO è stata iniettata alla dose di 21,4 μ g/g corrispondenti a 1 μ g/g di DOXO. Sono stati utilizzati 4 animali per ciascun composto. È stata misurata la radioattività totale (acido solubile + insolubile). I dati sono valori medi \pm ES. Il numero dei noduli esaminati è indicato sopra le colonne. Per ciascun composto le differenze fra i livelli di radioattività nelle tre forme di differenziazione degli HCCs, sono state valutate statisticamente mediante l'analisi delle varianze usando il post test di Bonferroni (è stato considerato significativo un $p < 0,05$). * Differenza significativa rispetto ai WD. ** Differenza significativa rispetto ai WD e MD.

L'elevata penetrazione della L-HSA-DOXO nei PD HCCs è conseguente ad un adsorbimento non specifico del coniugato alle cellule neoplastiche che è mediato dalle molecole di DOXO. Questo è stato dimostrato con esperimenti in vitro nel corso dei quali abbiamo osservato che la coniugazione con la DOXO aumenta parecchie volte le quantità di L-[¹⁴C]-HSA adsorbite alle cellule di linee cellulari derivate sia da HCCs sia da altri tumori (Tab. 4) (vedi sez. seguente). Le più elevate concentrazioni di DOXO prodotte dalla L-HSA-DOXO nei WD HCCs in confronto a quelle misurate nelle forme MD, e PD del tumore (Tab 1) possono essere spiegate tenendo presente che nei WD HCCs l'internalizzazione del coniugato può avvenire oltre che con il meccanismo della endocitosi per adsorbimento aspecifico anche con quello della endocitosi mediata dall'ASGP-R. Le differenti vie seguite dalla L-HSA-DOXO e dalla F- DOXO nell'entrare nelle cellule possono concorrere a spiegare i più alti livelli di farmaco prodotti dal primo composto negli HCCs. Infatti dopo internalizzazione del coniugato, la DOXO rilasciata dal carrier negli endosomi/lisosomi, può in parte sfuggire all'efflusso del farmaco causato dalle molecole (glicoproteina P) con funzione di pompa localizzate a livello della membrana esterna come è stato suggerito da altri esperimenti in cui sono stati usati farmaci macromolecolari(31). La glicoproteina P, è una proteina transmembrana che lega ed espelle dalle cellule le molecole idrofobiche con carica positiva, quale è la DOXO(32).

In accordo con il razionale che è alla base della coniugazione della DOXO con la L-HSA, le concentrazioni del farmaco nel cuore e nell'intestino dei ratti iniettati con la L-HSA-DOXO sono risultate circa 3 volte più basse di quelle degli animali che avevano ricevuto la F-DOXO (Tab 2, Fig.8).

Tab 2. $AUC_{(0-24h)}$ delle concentrazioni di DOXO negli organi di ratto dopo la somministrazione della stessa dose ($1 \mu\text{g/g}$) della F-DOXO o della DOXO coniugata alla L-HSA.

Composto	nmol x h / g tessuto				
	Fegato	Cuore	Intestino	Rene	Milza
F- DOXO	60.5	100.0	109.0	145.6	169.4
L-HSA-DOXO	360.0	28.8	33.2	48.3	119.6

Le AUCs sono state calcolate dai dati della Fig. 8 usando il software Graphpad Prism 3.02

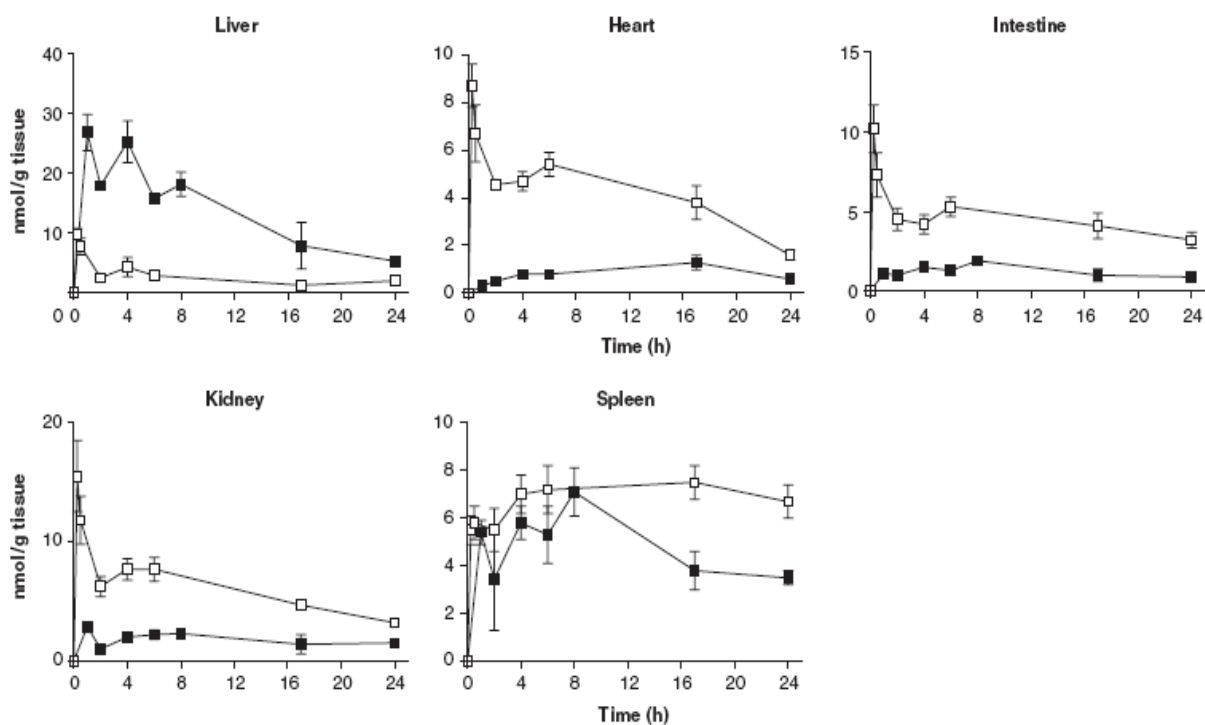


Fig. 8: Concentrazioni di DOXO negli organi di ratto dopo iniezione di $1 \mu\text{g/g}$ di F-DOXO (\square) o di DOXO coniugata alla L-HSA(\blacksquare).

I dati sono stati ottenuti dagli stessi animali degli esperimenti della fig 6. Le differenze fra i valori delle concentrazioni di DOXO misurate negli animali trattati con F-DOXO e in quelli trattati con DOXO coniugata agli stessi intervalli di tempo (2,4,6,17 e 24 h) sono state valutate con test ANOVA a due vie (vedi leggenda Fig 6). Nel fegato, cuore, intestino e rene le differenze sono risultate statisticamente significative ($p < 0.001$). Non si è riscontrata una differenza statisticamente significativa per la milza.

Come previsto il coniugato ha prodotto un accumulo di DOXO nel fegato. Nel corso di questi esperimenti abbiamo anche osservato che nel ratto, la albumina plasmatica non interferisce con la penetrazione nei tumori e nei tessuti di un coniugato preparato con albumina omologa. Il coniugato ottenuto con albumina di ratto (L-RSA-DOXO) ha prodotto negli HCCs e negli organi concentrazioni di farmaco molto simili a quelle causate dal coniugato L-HSA-DOXO (Tab 3).

Tab 3. Concentrazioni di DOXO negli organi dei ratti iniettati con F-DOXO, L-HSA-DOXO, L-RSA-DOXO e HSA-DOXO.

		nmol DOXO / g					
	Tempo ^{a)}	Fegato	Cuore	Intestino	Rene	Milza	Midollo Osseo
F-DOXO^{b)}	4	4.3 ± 1.6	4.7 ± 0.3	4.2 ± 0.6	7.7 ± 0.9	7.0 ± 0.8	2.5 ± 0.2
L-HSA-DOXO^{c)}	4	25.3 ± 3.5	0.8 ± 0.1	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.2	5.8 ± 0.7	1.5 ± 0.2
	6	15.8 ± 0.9	0.8 ± 0.0	1.3 ± 0.3	2.2 ± 0.4	5.3 ± 1.2	---
	17	7.9 ± 3.9	1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.4 ± 0.8	3.8 ± 0.8	1.4 ± 0.1
L-RSA-DOXO^{d)}	4	19.6 ± 5.8	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.2	2.1 ± 0.2	3.3 ± 0.6	1.5 ± 0.1
HSA-DOXO^{e)}	4	22.5 ± 0.1	2.0 ± 0.8	1.8 ± 0.3	3.7 ± 1.2	37.5 ± 7.2	9.9 ± 0.4
	6	26.1 ± 1.6	1.8 ± 0.6	3.1 ± 0.8	3.6 ± 0.2	28.3 ± 4.7	---
	17	11.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.7 ± 0.2	15.3 ± 0.2	9.0 ± 0.6

Sia la DOXO libera che quella coniugata sono state iniettate a dose di (1 µg/g). I dati (valori medi ± ES) sono stati ottenuti da almeno 3 animali. a) Ore fra l'iniezione dei composti e il sacrificio degli animali. Per ciascun organo le differenze fra le concentrazioni di DOXO 4h dopo la somministrazione dei composti, sono state valutate statisticamente. Fegato, cuore, intestino e rene: b) statisticamente differente da c) d) e). Milza e midollo osseo: e) statisticamente differente da b) c) d).

Adsorbimento in vitro della L-HSA-DOXO a linee cellulari provenienti da HCCs e da altri tumori

Negli esperimenti descritti nella sezione precedente, la L-HSA-DOXO è penetrata in elevate quantità anche nei PD HCCs che non esprimono l'ASGP-R. Usualmente si pensa che la penetrazione dei coniugati albumina-farmaco nelle cellule neoplastiche sia mediata dalla molecola della albumina, tuttavia l'osservazione che la L-HSA-DOXO è penetrata nei PD HCCs in quantità 4 volte superiori al carrier L-HSA, ha suggerito che la penetrazione del coniugato sia soprattutto conseguente a un adsorbimento alla superficie delle cellule mediato dalle molecole di DOXO. Per verificare questa ipotesi in esperimenti in-vitro abbiamo studiato se la coniugazione con la DOXO aumenta le quantità di L-¹⁴C-HSA che sono adsorbite dalle cellule di linee derivate da HCCs e da altri tumori.

I risultati riportati nella tabella 4, mostrano che il coniugato si lega alle cellule di tutte le linee tumorali studiate in quantità parecchie volte superiori a quelle della L-[¹⁴C]-HSA e dell'albumina non lattosaminata ([¹⁴C]-HSA) (esperimento no. 7).

Tab 4. Aumentato adsorbimento della L-[¹⁴C]HSA a differenti linee cellulari dopo coniugazione con la DOXO

Esp (num)	Linea Cellulare	Composto	ng / pozzetto	L-[¹⁴ C]HSA- DOXO
				L-[¹⁴ C]HSA ^a
1	PLC/PRF/5 (da PD HCC umano)	L-[¹⁴ C]HSA	206.0 ± 15.9 (6) ^b	6.3
		L-[¹⁴ C]HSA- DOXO ₈ ^c	1295.1 ± 31.6 (6)	
2	PLC/PRF/5	L-[¹⁴ C]HSA- DOXO ₃	522.7 ± 54.6 (3)	
		L-[¹⁴ C]HSA- DOXO ₈	1392.7 ± 91.4 (3)	
3	SNU 449 (da PD HCC umano)	L-[¹⁴ C]HSA	176.3 ± 4.3 (3)	7.8
		L-[¹⁴ C]HSA- DOXO ₈	1379.7 ± 53.5 (3)	
4	Hep 3B (da WD HCC umano)	L-[¹⁴ C]HSA	169.7 ± 1.2 (3)	5.5
		L-[¹⁴ C]HSA- DOXO ₈	933.7 ± 55.8 (3)	
5	C-26 (carcinoma del colon di topo)	L-[¹⁴ C]HSA	443.7 ± 60.9 (3)	5.9
		L-[¹⁴ C]HSA- DOXO ₈	2610.6 ± 194.2 (3)	
6	U2OS (osteosarcoma umano)	L-[¹⁴ C]HSA	258.0 ± 17.8 (3)	5.1
		L-[¹⁴ C]HSA- DOXO ₆	1310.6 ± 56.6 (3)	
7	PLC/PRF/5	L-[¹⁴ C]HSA	276.0 ± 19.8 (3)	5.9
		[¹⁴ C]HSA	134.3 ± 3.8 (4)	
		L-[¹⁴ C]HSA- DOXO ₆	1618.7 ± 126.7 (3)	
8	B16-F10 (Melanoma di topo)	L-[¹⁴ C]HSA	275.7 ± 32.1 (3)	4.0
		L-[¹⁴ C]HSA- DOXO ₆	1117.3 ± 76.7 (3)	
9	MCF-7 (carc. polmonare umano)	L-[¹⁴ C]HSA	108.6 ± 13.7 (4)	6.7
		L-[¹⁴ C]HSA- DOXO ₈	724.6 ± 30.9 (4)	

- a) *Rapporto fra le quantità di L-[¹⁴C]HSA-DOXO e quelle di L-[¹⁴C]HSA adsorbite alle cellule.*
- b) *I dati sono valori medi ± ES; in parentesi il numero dei pozzetti. I risultati sono stati valutati con il t-test di Student. In tutti gli esperimenti il valore del p è risultato ≤0.001.*
- c) *Il numero sottoscritto indica il rapporto molare DOXO/L-[¹⁴C]HSA nelle diverse preparazioni di coniugato.*

Questo risultato conferma che la elevata penetrazione della L-HSA-DOXO nei PD HCCs dei ratti è soprattutto dovuta ai residui di DOXO. L'elevato adsorbimento delle molecole della DOXO è spiegato dal fatto che al pH fisiologico il gruppo amminico della DOXO essendo protonato è carico positivamente e si lega ai fosfolipidi anionici delle membrane cellulari.

Effetto della L-HSA-DOXO sulla funzionalità del fegato di ratti con danno epatico cronico.

Le elevate concentrazioni di farmaco prodotte dalla L-HSA-DOXO nel fegato potrebbero causare un danno epatico in un uso clinico del coniugato, soprattutto considerando che nei paesi occidentali la maggioranza degli HCCs insorge in fegati cirrotici. Per studiare l'effetto dell'accumulo di DOXO su fegati con un danno cronico, abbiamo somministrato per via endovenosa la F-DOXO e la L-HSA-DOXO, per quattro settimane (due iniezioni di 1 µg DOXO / g alla settimana) a ratti che avevano terminato da un mese il trattamento con DENA. Il fegato di questi animali oltre agli HCCs presenta necrosi cellulare e fibrosi(25). Una settimana dopo la fine del trattamento con la L-HSA-DOXO o la F- DOXO, abbiamo misurato i parametri ematici della funzionalità epatica confrontandoli con quelli degli animali di controllo iniettati con soluzione fisiologica. (Tab 5). Sia la F-DOXO sia la L-HSA-DOXO non hanno modificato i livelli ematici della bilirubina e delle transaminasi. La F-DOXO ha prodotto una diminuzione dell'albumina plasmatica, probabilmente conseguente al danno renale e alla proteinuria causate dalla DOXO nei ratti(33). L'assenza della ipoalbuminemia negli animali trattati con L-HSA-DOXO è spiegata dalle più basse concentrazioni di farmaco nel rene degli animali iniettati con questo composto (Tab 2). La L-HSA-DOXO ha causato un aumento della fosfatasi alcalina (ALP) che non è dovuta a colestasi come indicato dai valori della gamma-glutamyl transferasi, che non sono risultati modificati.

L'aumento della ALP è stato probabilmente causato dal carrier L-HSA perché esso è stato osservato anche in pazienti con epatite cronica da virus B che hanno ricevuto un coniugato della L-HSA con adenina arabinoside e in Cynomogus monkeys trattati con L-HSA non coniugata(11).

Tab 5. Parametri ematici della funzionalità e vitalità del fegato.

	Ratti normali ^{a)} (6) ^{b)}	Ratti trattati con DENA		
		Sol. Fisologica (4)	F-DOXO (5)	C-DOXO (7)
Albumina (g/dl)	3.90 ± 0.11	4.05 ± 0.13	3.26 ^{c)} ± 0.27	4.36 ± 0.03
Bilirubina tot. (mg/dl)	0.30 ± 0.00	0.37 ± 0.04	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00
GOT (IU/l)	113.50 ± 13.20	184.75 ± 44.30	166.00 ± 26.29	186.86 ± 33.16
GPT (IU/l)	35.80 ± 1.90	78.00 ± 16.25	90.80 ± 24.53	105.86 ± 15.76
ALP (IU/l)	317.30 ± 41.70	266.00 ± 17.14	335.60 ± 46.40	465.28 ^{d)} ± 44.14
γ-GT (IU/l)		24.00 ± 5.05	41.80 ± 15.82	25.43 ± 8.56

I dati sono valori medi ± ES. I parametri ematici dei tre gruppi di ratti trattati con la DENA sono stati valutati mediante ANOVA seguita dal post test di Bonferroni.

a) i valori dei ratti normali (non trattati con DENA) sono stati ottenuti da animali che avevano ricevuto 4 iniezioni settimanali i.v di soluzione fisiologica. Essi sono stati riprodotti da (Di Stefano et al Dig. Liv. Dis. 2006; 38: 404-408).

b) In parentesi il numero degli animali

c) differenza statisticamente significativa ($p < 0,005$) rispetto ai valori misurati nei ratti trattati con soluzione fisiologica e in quelli trattati con la C-DOXO.

d) Differenza statisticamente significativa ($p < 0,005$) rispetto ai valori misurati nei ratti trattati con soluzione fisiologica.

Ruolo dei residui di lattosio nella tollerabilità della L-HSA-DOXO

Abbiamo confrontato le concentrazioni di DOXO che si raggiungono negli HCCs e negli organi di ratto 4 ore dopo la somministrazione di L-HSA-DOXO con quelle che si raggiungono 4 ore dopo la somministrazione di un coniugato preparato con albumina non lattosaminata (HSA-DOXO).

Rispetto alle concentrazioni prodotte dal coniugato lattosaminato, la HSA-DOXO ha causato concentrazioni di farmaco simili negli HCCs ma sei volte più elevate nella milza e nel midollo osseo (Tab 3) (pag 30). Queste più elevate concentrazioni sono conseguenti ad una maggior penetrazione della HSA-DOXO in questi organi come abbiamo dimostrato usando coniugati marcati con [14 C] formaldeide nella proteina (Fig 9).

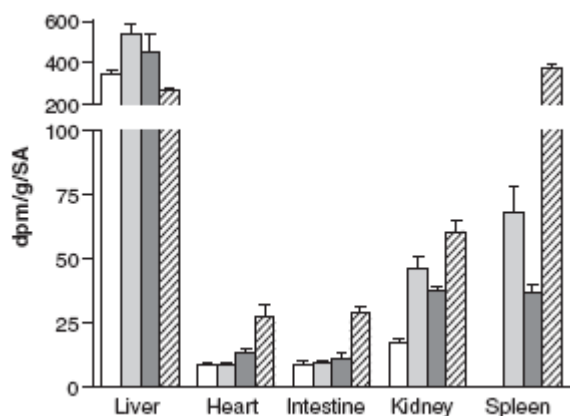
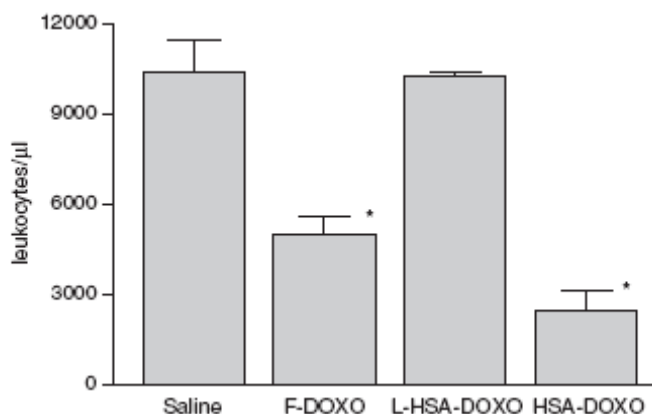


Fig 9 Distribuzione negli organi di ratto della la L-[14 C]-HSA (colonne bianche), L-[14 C]-HSA-DOXO (colonne grigio chiare), L-[14 C]-RSA-DOXO (colonne grigio scure), [14 C]-HSA-DOXO (colonne rigate). I dati (valori medi +- ES) sono stati ottenuti dagli stessi animali dell'esperimento Fig 7. Per ciascun organo le differenze fra i livelli di radioattività dopo la somministrazione dei differenti composti, sono state valutate statisticamente. Fegato: HSA-DOXO statisticamente differente dall'L-HSA-DOXO. Cuore, intestino e milza: HSA-DOXO statisticamente differente da tutti gli altri composti. Rene: L-HSA statisticamente differente da tutti gli altri composti; HSA-DOXO statisticamente differente dalla L-RSA-DOXO.

L'accumulo della DOXO prodotto dalla HSA-DOXO nel midollo osseo causa una leucopenia che non è invece causata dalla L-HSA-DOXO (Fig.10).



*Fig 10. Numero dei leucociti periferici del ratto contati dopo la somministrazione i.v. di DOXO libera o coniugata. I composti sono stati somministrati per tre giorni consecutivi alla dose singola di 1 μ g/g. Una settimana dopo l'ultima somministrazione i ratti sono stati salassati dalla vena cava inferiore e uccisi in anestesia da isofluorano. Ciascun dato è il valore medio \pm ES ottenuto da quattro animali *Differenze statisticamente significative rispetto ai gruppi trattati con soluzione fisiologica o con L-HSA-DOXO ($p < 0,001$)*

Poiché la L-HSA-DOXO scompare dal sangue più velocemente del coniugato non lattosaminato, abbiamo verificato se le minori concentrazioni del farmaco nella milza e nel midollo osseo nei ratti iniettati con la L-HSA-DOXO, fossero una conseguenza della meno lunga esposizione di questi organi al coniugato o fossero dovuti ad un impedimento della sua penetrazione nelle cellule della milza e del midollo osseo, causato dai residui di lattosio. In ratti e topi le concentrazioni plasmatiche della L-HSA-DOXO ad 1h sono state mantenute a livelli più alti di quelli della HSA-DOXO iniettando più elevate quantità del primo coniugato o somministrando simultaneamente alla L-HSA-DOXO una quantità 10 volte più elevata del "carrier" L-HSA che compete con il coniugato nella sua eliminazione plasmatica mediata dall'ASGP-R.

Nonostante le più alte concentrazioni della L-HSA-DOXO nel plasma, i livelli di DOXO nella milza e nel midollo osseo sono risultati più bassi negli animali iniettati con questo coniugato (Fig 11).

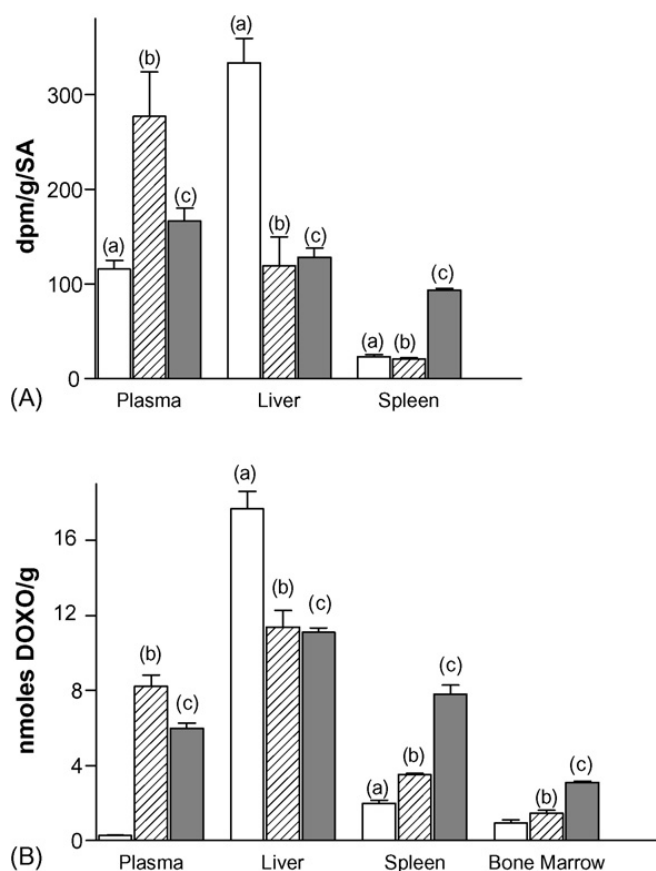


Fig. 11: Livelli di radioattività (A) e di DOXO (B) un ora dopo la somministrazione i.v a ratti di L-[¹⁴C]-HSA-DOXO (colonne bianche), e di [¹⁴C]-HSA-DOXO (colonne scure). La DOXO coniugata è stata iniettata alla dose di 1 µg/g corrispondente a 25 o 23 µg/g rispettivamente di L-[¹⁴C]-HSA-DOXO e di [¹⁴C]-HSA-DOXO. Le colonne rigate, indicano i dati ottenuti nei ratti che insieme con la L-[¹⁴C]-HSA-DOXO hanno ricevuto una dose 10 volte maggiore di L-HSA (250 µg/g). I dati sono valori medi ± ES ottenuti da 4 animali. Nel riquadro B le misure negli organi si riferiscono alla DOXO libera (cioè a quella liberata dal carrier dopo la penetrazione intracellulare del coniugato); quelle nel plasma si riferiscono alla DOXO coniugata. I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA; quando si trovava ne test ANOVA una significatività con $p < 0,05$ si è usata la correzione post-test di Bonferroni. I valori p riportati sono quelli corretti. Riquadro A: Plasma (a) vs. (b), $p < 0,01$; Fegato (a) vs. (b) e (c), $p < 0,01$; Milza (c) vs. (a) e (b) $p < 0,01$. Riquadro B: Plasma (a) vs. (b) e (c) $p < 0,001$ / (b) vs. (c) $p < 0,05$; Fegato (a) vs. (b) e (c) $p < 0,001$; Milza (a) vs. (b) $p < 0,05$ / (a) vs. (c) $p < 0,001$ / (b) vs (c) $p < 0,001$; Midollo osseo (a) vs (c) $p < 0,001$ / (b) vs (c) $p < 0,001$

Il meccanismo mediante il quale i residui di lattosio impediscono l'accumulo di L-HSA-DOXO nella milza e nel midollo osseo non è stato finora chiarito. È possibile che nel produrre questo effetto il lattosio possa essere sostituito da altre molecole. Tuttavia le molecole di lattosio, interagendo con l'ASGP-R dei WD HCCs, producono l'effetto vantaggioso di incrementare ulteriormente la penetrazione del coniugato in questi tumori (Tab 1). Inoltre la L-HSA si è dimostrato un carrier di farmaci sicuro ed efficace nell'uomo: un coniugato della L-HSA con adenina arabinoside somministrato per 28 giorni consecutivi a pazienti con epatite cronica da virus B, ha determinato una forte diminuzione della viremia senza produrre i gravi effetti collaterali del farmaco libero, né altre reazioni avverse(11,12).

Attività antineoplastica della L-HSA-DOXO sugli HCCs dei ratti.

Precedentemente al mio dottorato, era stata studiata nei ratti trattati con la DENA, la capacità della F-DOXO e della L-HSA-DOXO di inibire la trasformazione delle lesioni preneoplastiche in HCCs(34). La F-DOXO e la L-HSA-DOXO erano state iniettate per quattro settimane a partire dalla prima settimana dalla fine del trattamento con la DENA, quando nel fegato sono presenti solo lesioni preneoplastiche. Nei ratti trattati con L-HSA-DOXO il numero di tumori era risultato statisticamente minore di quello degli animali controllo iniettati con soluzione fisiologica. Al contrario la F-DOXO somministrata alle stesse dosi e con lo stesso schema della L-HSA-DOXO, non aveva esercitato alcuna attività antineoplastica. La L-HSA-DOXO non aveva causato una diminuzione del peso degli animali che invece era stato marcatamente ridotto dalla F-DOXO. La riduzione del peso corporeo è un segno di tossicità sistemica.

Successivamente a questi esperimenti abbiamo controllato se la L-HSA-DOXO possedeva anche la capacità di inibire l'accrescimento degli HCCs i quali quattro - cinque settimane dopo la somministrazione con la DENA sono già formati. Sulla base dei risultati di Graham et al. (35) che hanno studiato la progressione di metastasi epatiche nel topo servendosi della ecografia ad alta frequenza, abbiamo adottato questa modalità di immagine per rilevare e misurare gli HCCs del ratto seguendone l'accrescimento nel tempo. Per validare questa modalità di immagine, otto tumori di otto animali localizzati con un appropriato ago inserito nel fegato durante l'osservazione ecografica sono stati dissecati dal parenchima epatico circostante, misurati con un calibro e fissati in formalina per l'esame istologico.

Le misure sui noduli isolati hanno confermato quelle ottenute con l'esame con gli ultrasuoni; l'esame istologico ha successivamente confermato che tutti gli otto noduli erano HCCs (fig 12).

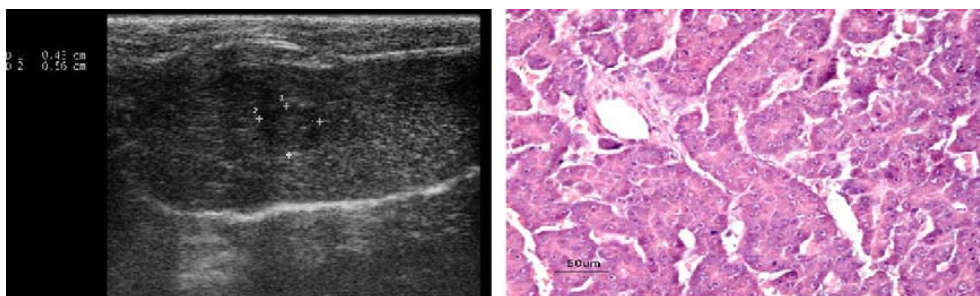


Fig. 12: A sinistra un nodulo epatico ipoecoico rivelato mediante ultrasonografia. Esso è stato isolato dal parenchima, esaminato istologicamente e classificato come MD HCC (parte destra della figura).

Dopo questa validazione della procedura, abbiamo diviso “random” i ratti con HCCs in tre gruppi. Essi hanno ricevuto per quattro settimane due iniezioni i.v. settimanali di soluzione fisiologica, o di F-DOXO o di L-HSA-DOXO (1 μ g DOXO/g). Identificando e misurando i tumori in tre successive sessioni di ultrasonografia abbiamo osservato che la DOXO coniugata alla L-HSA (C-DOXO) non solo impedisce lo sviluppo di nuovi tumori (fig 13) in accordo con i dati precedenti, ma ha anche la capacità di inibire l'accrescimento dei tumori già formati (fig 14).

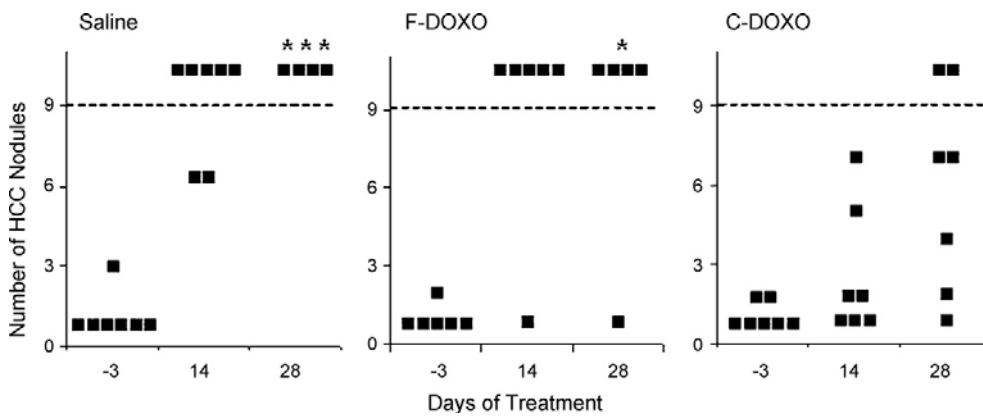


Fig. 13 Numero dei noduli neoplastici rilevati mediante ultrasonografia. Quando gli HCCs erano numerosi i noduli sono stati contati fino a un massimo di nove. ■ Indica un singolo ratto. * Indica un animale morto. Nei tre gruppi sperimentali il numero dei ratti con più di 9 noduli neoplastici è stato confrontato usando l'exact test di Fisher. Giorno 14: DOXO coniugata (C-DOXO) vs. soluzione fisiologica (saline) $p=0,021$; C-DOXO vs F-DOXO $p=0,0047$; F-DOXO vs soluzione fisiologica N.S. Giorno 28: C-DOXO vs soluzione fisiologica $p=0,0278$; C-DOXO vs. F-DOXO N.S; F-DOXO vs. soluzione fisiologica N.S

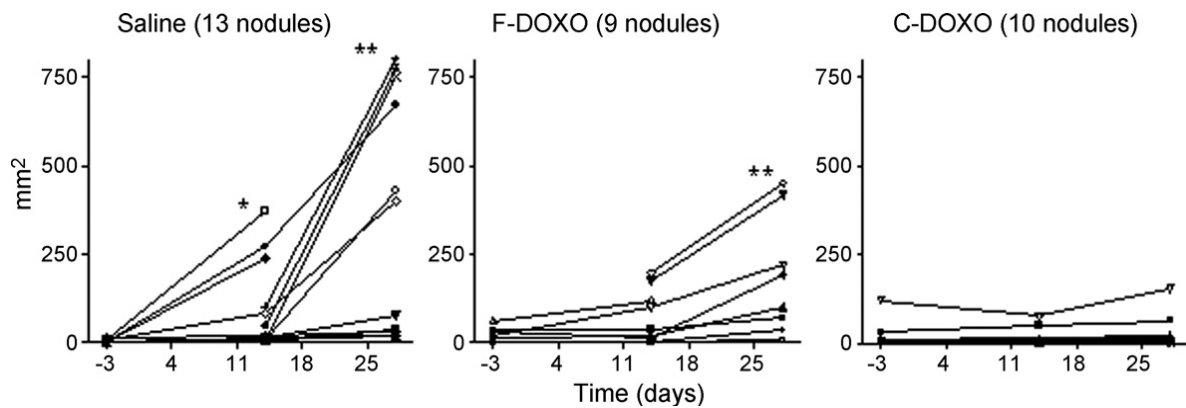


Fig 14 Accrescimento degli HCCs esaminati in sessioni successive di immagini ultrasonografiche. I dati sono valutati mediante il paired t-test. * e ** indicano differenze statisticamente significative con rispettivamente $p<0,005$ e $p<0,001$ rispetto ai valori della precedente sessione ultrasonografica

Al contrario la F-DOXO ha inibito l'accrescimento dei tumori solo nel primo periodo di somministrazione e non ha impedito la comparsa di nuovi tumori. Come era stato precedentemente osservato (34) la F-DOXO ha causato una marcata diminuzione del peso corporeo che non è stata causata dalla L-HSA-DOXO.

La maggior attività antineoplastica della L-HSA-DOXO è spiegata dalle maggiori concentrazioni di farmaco negli HCCs dei ratti iniettati con questo composto. Al tempo stesso la ridotta tossicità sistemica della L-HSA-DOXO può essere spiegata dai minori livelli di DOXO prodotti negli organi bersaglio della tossicità del farmaco.

Conclusioni ed esperimenti futuri

Nei ratti con HCCs la coniugazione con la L-HSA ha aumentato sia l'efficacia antineoplastica sia la tollerabilità della DOXO. Ammesso che i risultati ottenuti nel ratto siano validi anche nell'uomo la L-HSA-DOXO potrebbe aumentare le concentrazioni del farmaco negli HCCs umani con due meccanismi addittivi: 1) causando livelli di farmaco nei tumori più elevati di quelli prodotti da una egual dose di farmaco non coniugato; 2) diminuendo le concentrazioni di DOXO negli organi bersaglio della sua tossicità, e così permettendo la somministrazione di maggiori dosi di farmaco. I più elevati livelli di farmaco prodotti nei tumori dovrebbero fare della L-HSA-DOXO un efficace farmaco antineoplastico per una chemioterapia sistemica di quei HCCs che non possono essere rimossi chirurgicamente. Il coniugato potrebbe anche essere somministrato per prevenire le recidive del tumore dopo intervento di resezione chirurgica, e per ritardare la progressione degli HCCs nei pazienti in attesa di trapianto del fegato. L'osservazione che la L-HSA-DOXO si lega in elevate quantità anche alle cellule di linee derivate da tumori differenti dagli HCCs suggerisce di studiare se un selettivo trasporto della DOXO nelle cellule neoplastiche, come quello ottenuto nei ratti con HCCs, può essere realizzato anche in animali portatori di tumori differenti. La L-HSA-DOXO per essere attiva, richiede che i capillari del tumore siano sufficientemente permeabili da permettere il contatto del coniugato con le cellule neoplastiche. Poiché alcuni risultati hanno dimostrato una permeabilità particolarmente elevata nei tumori che crescono nel fegato(36) le prossime ricerche saranno indirizzate a verificare l'attività della L-HSA-DOXO su metastasi sperimentali epatiche.

Bibliografia.

1. Schneider Y, Abarca J, Aboud-Pirak E, Baurain R, Ceulemans F, Deprez-De Campeneere D. Drug targeting in human cancer chemotherapy. In: Gregoriadis G, Poste G, Senior J, Trouet A, editors. Receptor-mediated targeting of drugs. NATO ASI series A: life sciences, 82. New York: Plenum Press; 1984. p. 1–25.
2. O'Hare KB, Hume IC, Scarlett L, Chytry V, Kopeckova P, Kopecek J, et al. Effect of galactose on interaction of N-(2-hydroxypropyl) metacrylamide copolymers with hepatoma cells in culture: preliminary applications to anticancer agents, daunomycin. *Hepatology* 1989;10:207–214.
3. Di Stefano G, Busi C, Mattioli A, Derenzini M, Trere` D, Fiume L. Inhibition of [3H]thymidine incorporation into DNA of rat regenerating liver by 20,20-difluorodeoxycytidine coupled to lactosaminated poly-L-lysine. *Biochem Pharmacol* 1999;57:793–799.
4. Morell AG, Irvine RA, Sternlieb I, Scheinberg IH, Ashwell G. Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo. *J Biol Chem* 1968;243: 155–159.
5. Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 1982;51:531–534.
6. Fiume L, Mattioli A, Balboni PG, Tognon M, Barbanti Brodano G, de Vries J, et al. Enhanced inhibition of virus DNA synthesis in hepatocytes by trifluorothymidine coupled to asialofetuin. *FEBS Lett* 1979;103:47–51.
7. Fiume L, Busi C, Mattioli A, Barbanti-Brodano G. Hepatocyte targeting of adenine-9-b-D-arabinofuranoside 5-monophosphate (ara-AMP) coupled to lactosaminated albumin. *FEBS Lett* 1981;129:261–264.
8. Trere` D, Fiume L, Badiali De Giorgi L, Di Stefano G, Migaldi M, et al. The asialoglycoprotein receptor in human hepatocellular carcinomas: its expression on proliferating cells. *Br J Cancer* 1999; 81:404–408.
9. Wilson G. Effect of reductive lactosamination on the hepatic uptake of bovine pancreatic ribonuclease A dimer. *J Biol Chem* 1978; 253: 2070-2.
10. Fiume L, Bonino F, Mattioli A, Chiaberghe E, Torrani Cerenzia MR, Busi C, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by vidarabine monophosphate conjugated with lactosaminated serum albumin. *Lancet* 1988;2:13–15.

11. Torrani Cerenzia MR, Fiume L, De Bernardi Venon W, Lavezzo B, Brunetto MR, Ponzetto A. Adenine arabinoside monophosphate coupled to lactosaminated albumin, administered for 4 weeks to patients with chronic type B hepatitis, decreased viremia without producing significant side effects. *Hepatology* 1996;23:657–661.
12. Zarski JP, Barange K, Souvignet C, Bertini M, Marcellin P, Tran A, et al. Efficacy and safety of L-HSA-ara-AMP in chronic hepatitis B patients non responder to interferon therapy: a randomised clinical trial. *J Hepatol* 2001;34:487–488.
13. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907–1917.
14. Befeler AS, Di Bisceglie AM. “Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment“. *Gastroenterology* 2002; 122(6): 1609-1619
15. Josep M. Llovet, Sergio Ricci, Vincenzo Mazzaferro, Philp Hilgard, Edward Gane, Jean-Luc Raul. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl. Med* 2008; 359(4): 378-90
16. Weiss Raymond B. The Anthracyclines: Will We Ever Find a Better Doxorubicin?. *Seminars in Oncology* 1992; 19 (6): 670–686.
17. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Orezzi P, Pol C, et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, A New Antitumor Antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng* 1969; 11: 1101 – 1110.
18. Lomovskaya N, Otten SL, Doi-Katayama Y, Fonstein L, Liu XC, Hutchinson CR. et al. Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. *J. Bacteriol* 1999; 181(1): 305–18.
19. Hutchinson CR, Colombo AL. Genetic engineering of doxorubicin production in *Streptomyces peucetius*: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1999; 23 (1): 647–52.
20. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57(7): 727-41.
21. Willner D, Trail P.A, Hofstead S.J, King H.D, Lasch S.J., Braslawsky G.R. et al. (6-Maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin—a new derivative for the preparation of immunoconjugates of doxorubicin. *Bioconjugate Chem.* 1993; 4:521–527.
22. Greenfield RS, Kaneko T, Daves A, Edson MA, Fitzgerald KA, Olech LJ, et al. Evaluation in vitro of adriamycin immunoconjugates synthesized using an acid-sensitive hydrazone linker. *Cancer Res* 1990; 50: 6600–6607.

23. Di Stefano G, Lanza M, Kratz F, Merina L, Fiume L. A novel method for coupling doxorubicin to lactosaminated human albumin by an acid sensitive hydrazone bond: synthesis, characterization and preliminary biological properties of the conjugate. *Eur J Pharm Sci* 2004; 23: 393–397.
24. Rajewsky MF, Dauber W, Frankenberg H. Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat. *Science* 1966; 152: 83–85.
25. Di Stefano G, Fiume L, Bolondi L, Lanza M, Pariali M, Chieco P. Enhanced uptake of lactosaminated human albumin by rat hepatocarcinomas: implications for an improved chemotherapy of primary liver tumours. *Liver Int* 2005; 25: 854–60.
26. Dubois M, Gilles K.A, Hamilton J.K, Rebers T.A, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem* 1956; 28: 350–356.
27. Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall L.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265–275.
28. Jentoft N, Dearborn D.G. Protein labelling by reductive alkylation. *Methods Enzymol.* 1983; 91: 570–579
29. Bots A.M, Van Oort W.J, Noordoek J, Van Dijk A, Klein S.W, Van Hoesel Q.G. Analysis of adriamycin and adriamycinol in micro volumes of rat plasma. *J. Chromatogr.* 1983; 72: 421–427.
30. Di Stefano G, Kratz F, Lanza M, Fiume L. Doxorubicin coupled to lactosaminated human albumin remains confined within mouse liver cells after the intracellular release from the carrier. *Dig Liver Dis.* 2003; 35(6): 428-33.
31. Miyamoto Y, Oda T, Maeda H. Comparison of the cytotoxic effects of the high- and low-molecular-weight anticancer agents on multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells in vitro. *Cancer Res.* 1990; 50(5): 1571-5.
32. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002; 53: 615-27.
33. G Mazuè, M Iatropoulos, A Imondi, S Castellino, M Brughera and A Podestà *et al.*, Anthracyclines: a review of general and special toxicity studies. *Int J Oncol* 1995; 7: 713–726.
34. L. Fiume, L. Bolondi, C. Busi, P. Chieco, F. Kratz and M. Lanza et al., Doxorubicin coupled to lactosaminated albumin inhibits the growth of hepatocellular carcinomas induced in rats by diethylnitrosamine, *J Hepatol.* 2005; 47: 645–652

35. K.C. Graham, L.A. Wirtzfeld, L.T. MacKenzie, C.O. Postenka, A.C. Groom and I.C. MacDonald et al., Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of liver metastases in preclinical models. *Cancer Res* 2005; 65: 5231–5237.
36. Fukumura D, Yuan F, Monsky WL, Chen Y, Jain RK. Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 1997;151(3): 679-88.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la mia famiglia per il sostegno datomi ad arrivare fin qui.

Un ringraziamento importante al prof. Fiume per il nitido svolgimento scientifico del suo lavoro per la pazienza e per l'opportunità datami.

Un ringraziamento alla prof.ssa Di Stefano per l'aiuto e pazienza.

Un ringraziamento al prof. Busi e il prof. Mattioli.

Un ringraziamento al CRBA per tutto e per le collaborazioni.

Un ringraziamento dovuto a tutte le persone che nella ricerca passano e vanno lasciando qualcosa di sé, come nella vita.

Per ultimo ma non meno importante, agli amici che col loro affetto hanno reso possibile vivere.