



Rendiconti

Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Matematica e di Scienze Fisiche e Naturali
100* (1982), Vol. VI, fasc. 18, pagg. 197-216.

FEDERICO ARCAMONE (*)

La Doxorubicina (Adriamicina) ed i suoi analoghi (**)

Fin dall'inizio della mia attività nella ricerca ebbi modo di rendermi conto (1) dell'affascinante complessità chimica dei fenomeni biologici, (2) dell'importanza del ruolo che la chimica poteva avere nello sviluppo di campi di interesse per la medicina, e (3) della necessità di mantenere una stretta cooperazione tra discipline chimiche e biologiche ai fini del raggiungimento di obiettivi concreti. D'altra parte i grandi successi ottenuti già in quegli anni in diversi laboratori, specialmente inglesi e americani, nel campo degli antibiotici, non potevano che condurre a tale conclusione, ponendo i prodotti naturali (come specie molecolari selezionate dall'evoluzione degli organismi viventi a fini probabilmente correlati con meccanismi di espressione funzionale e di controllo) come appropriati soggetti di uno studio possibile di importanti sviluppi. Questa relazione riporta uno studio di questo tipo e si riferisce ad una linea di ricerca che arriva ormai a coprire 25 anni (1955-1980), e che è tuttora lontana dall'aver esaurito le sue potenzialità.

Dovrei ricordare innanzi tutto che l'isolamento della penicillina nel 1940 da parte di Chain e Abraham dal *Penicillium chrysogenum* e quello della streptomina nel 1944, da parte di Waksman e coll. da colture di *Streptomyces griseus*, avevano dimostrato la capacità dei microorganismi di produrre in adatte condizioni, sostanze terapeuticamente utili. Negli anni successivi alle scoperte sopra menzionate gli attinomiceti apparvero come una sorgente particolarmente versatile di nuovi composti, dalla struttura chimica varia e complessa, provvisti di interessanti attività generalmente riguardanti la inibizione di altri microorganismi.

Una caratteristica di molte specie di attinomiceti, già nota prima della scoperta degli antibiotici, è quella rappresentata dalla capacità di produrre pigmenti. Questa proprietà è così importante da essere stata utilizzata non solo per denominare diverse specie, ma anche per delle classificazioni. Per esempio Waksman [1]

(*) Ricerca e Sviluppo Chimico, Farnitalia Carlo Erba, Milano.

(**) Conferenza tenuta in Roma il 11 febbraio 1982 in occasione del solenne conferimento della Medaglia dei XL per le Scienze fisiche e naturali.

elena i seguenti tipi di pigmenti: 1) antocianine ed idroactinocromi, a tipo indicatore, viranti dal rosso arancio in soluzione acida al blu-violetto in soluzione alcalina; 2) pigmenti verdi (es. feroverdina); 3) lipoactinocromi (es. carotenoidi); 4) pigmenti prodigioso-simili; 5) pigmenti bruni (melanine). Praticamente tutti i pigmenti ora noti e corrispondenti al tipo 1 sono, nonostante la denominazione di antocianine attribuita ad alcuni di essi, dei derivati idrossichinonici, biogeneticamente derivati da acetato propionato, e gli aminoglicosidi denominati antraciline rappresentano il gruppo più importante.

Le antraciline, benché provviste di attività antibatterica, non avevano trovato pratica applicazione a causa della loro tossicità. Queste sostanze erano state originariamente studiate dal punto di vista chimico, tra il 1950 ed il 1960 in vari laboratori, principalmente in quello di Brockmann che riassunse nel 1963, in una monografia, le conoscenze acquisite a quell'epoca [2]. Nel nostro laboratorio, tuttavia erano già state dimostrate le proprietà antitumorali di un pigmento di questo tipo, che però non presentava un indice terapeutico favorevole [3]. Il prodotto grezzo, ottenuto dai liquidi culturali di un streptomicete, presentava una marcata inibizione del tumore ascite di Ehrlich nel topo dopo somministrazione intraperitoneale a dosi giornaliere di 200 mg/Kg di peso corporeo per cinque giorni consecutivi. Tuttavia nelle condizioni sperimentali usate non si osserva alcun aumento del tempo di sopravvivenza degli animali trattati rispetto ai controlli. Lo stesso effetto era presentato da prodotti purificati a dosi molto più basse (0.05-0.5 mg/Kg) anche su altri tipi di tumori come il carcinoma di Ehrlich ed il sarcoma 180 in forma solida.

Tenuto conto di ciò è comprensibile l'interesse del nostro gruppo, diretto dal Prof. Di Marco, per questi composti, interesse che ci indirizzò allo studio di nuovi pigmenti della stessa classe, ottenibili dalle colture di *Streptomyces peucetius* e mostranti una azione antitumorale più selettiva. L'isolamento del principio attivo permise di attribuire l'attività antitumorale di tali preparati alla daunomicina, successivamente indicata anche con la denominazione di daunorubicina [4, 5]. Questo nuovo antibiotico, nello stesso test del tumore ascite di Ehrlich inibiva lo sviluppo del tumore aumentando anche il tempo di sopravvivenza degli animali in maniera addirittura superiore a quella di noti antibiotici antitumorali come mitomicina C e actinomicina C [6]. La elevata attività della daunorubicina nei tumori sperimentali del topo e la sua selettività di azione [7] stimolarono lo studio mirante alla determinazione della struttura chimica anche al fine di accertare la natura di quelle differenze strutturali rispetto alle antraciline classiche responsabili delle menzionate più favorevoli caratteristiche farmacologiche.

L'idrolisi acida della daunorubicina dette luogo all'aglicone, daunomicinone, ed al nuovo amminozucchero daunosammina. La struttura del daunomicinone fu determinata attraverso classiche reazioni di degradazione unitamente a studi di risonanza nucleare magnetica [8]. Nello stesso tempo fu individuata la struttura e la configurazione assoluta della daunosammina [9].

Questi risultati avrebbero però avuto puramente un interesse conoscitivo se non fosse stato riferito, a questo punto della nostra ricerca, prima di tutti in

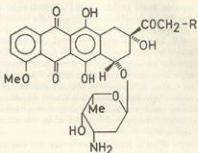
ordine di tempo da Tan e Di Marco [10] e quindi anche da altri [11], sulla efficacia clinica della daunorubicina nel campo delle leucemie acute. Pertanto i nostri studi proseguirono su due linee: 1) la chiarificazione dei dettagli, ancora non definiti, della struttura e della stereochimica di questo antibiotico e 2) la ricerca di analoghi biosintetici in colture di *S. pseudis* e di suoi mutanti. Quest'ultimo approccio, stimolato anche da interferenze brevettuali sulla daunorubicina contemporaneamente isolata e studiata nei laboratori della Rhône-Poulenc [12], era fondato sulla varietà di strutture strettamente correlate che generalmente si trovano nelle singole classi di metaboliti microbici derivanti da acetato e sul fatto che nei grezzi ottenibili dalle colture di ceppi derivanti da *S. pseudis* l'attività antitumorale presentava delle variazioni in relazione alla presenza di altri componenti pigmentati.

Gli obiettivi di cui al punto 1) furono raggiunti attraverso varie trasformazioni chimiche e rilevazioni di risonanza magnetica nucleare [13, 14].

Di particolare interesse, in quanto riferibile per correlazione a tutte le antracicline biosintetiche, la determinazione della configurazione assoluta del daunomicinone. Il lavoro chimico riguardante la daunomicina fu pubblicato per esteso nel 1970 in una memoria dedicata a Remo de Fazi [15]. Questi risultati resero anche possibile l'accertamento della stereochimica assoluta di tutte le altre antracicline a mezzo del confronto di curve di dicroismo circolare [16]. La conoscenza della stereochimica assoluta della daunorubicina, confermata dall'analisi ai raggi X del suo N-bromoacetil derivato [17], fu di notevole importanza anche per i successivi studi concernenti la costruzione di modelli molecolari del complesso dell'antibiotico con il suo principale recettore biologico [18, 19].

Per quanto riguardava la linea 2), furono isolati ed identificati diversi composti di questo gruppo. Il più importante era certamente la doxorubicina (adriamicina), il cui isolamento fu piuttosto laborioso per le piccole quantità presenti nei liquidi colorati (dell'ordine di alcuni $\mu\text{g/ml}$) e per la sua instabilità, nonché per la presenza degli stessi liquidi della 13-didzodaunorubicina che si comportava identicamente alla doxorubicina nei sistemi cromatografici allora impiegati e che era assai più stabile in soluzione di questa. Tuttavia una volta ottenuta e caratterizzata la doxorubicina [20, 21], ne furono rapidamente individuate la struttura chimica (Figura 1) [22] e le promettenti proprietà farmacologiche [23]. Furono anche sviluppati metodi per la trasformazione da daunorubicina in doxorubicina [24, 25].

La doxorubicina mostra un indice terapeutico più favorevole di quello della daunorubicina o di altre antracicline di origine biosintetica in diversi tumori sperimentali di animali di laboratorio, ed un largo spettro di attività su tumori dell'uomo [26]. L'efficacia dell'antibiotico viene ulteriormente esaltata nella pratica clinica attraverso l'uso in combinazione con altri farmaci. Nella rivista «The Medical Letter», edizione italiana, anno X, No. 4 del 15 febbraio 1981 sono elencate 35 malattie tumorali rispondenti alla chemioterapia. In 21 di queste la doxorubicina (o la daunorubicina in alcuni casi) è prescritta, spesso, come farmaco abitualmente preferito (Tabella 1). Risultati favorevoli sono anche ottenibili



DOXORUBICIN : R = OH

DAUNORUBICIN : R = H

Fig. 1. - Struttura di doxorubicina (adramicina) e di daunorubicina.

TABELLA I - Attività di combinazioni contenenti doxorubicina (o daunorubicina) in tumori rispondenti alla chemioterapia (a)

Attività « importante »	Attività « moderata »	Attività « minore »
Leucemia linfatica acuta (a)	Leucemia mieloide acuta (b)	Tumore del pancreas
Morbo di Hodgkin	Leucemia mieloide cron. (b)	Tumore del fegato (d)
Linfoma non Hodgkin	Neuroblastoma	Tumore della prostata
Linfoma di Burkitt	Cancro della vescica	
Tumore di Wilms	Tumore polmonare	
Sarcoma di Ewing	Tumore dell'endometrio	
Rabdomiosarcoma embrio.	Tumore ovarico	
Sarcoma osteogenico	Sarcomi	
Cancro della mammella		
Tumore del testicolo		

(a) Da «The Medical Letter», Ediz. Italiana, anno X, N° 4, del 15-2-1981.

(b) Anche daunorubicina.

(c) È impiegata preferibilmente daunorubicina.

(d) Doxorubicina da sola.

attraverso il « combined modality approach », cioè l'associazione con la chirurgia, la radioterapia e l'immunologia [26]. Tuttavia la presenza di effetti collaterali sfavorevoli pone delle limitazioni all'impiego terapeutico anche in casi in cui lo stesso sarebbe auspicabile. Effetti collaterali importanti sono soppressione midollare, stomatite, disturbi gastro-intestinali, alopecia, fenomeni peraltro correlati alla dose e reversibili, ed una cardiotossicità, questa non reversibile, il cui rischio è presente per dosi cumulative superiori a 450 mg/m² [26].

Una vasta letteratura è oggi disponibile sul meccanismo d'azione della doxorubicina e sulle sue caratteristiche metaboliche e farmacocinetiche. Semplificati, gli schemi riguardanti le interazioni biochimiche a livello cellulare e le trasformazioni metaboliche del composto nell'animale superiore sono riportati nelle Figure 2 e 3 [27].

La doxorubicina ha certamente contribuito ai recenti progressi della chemioterapia tumorale, ed il suo impiego clinico è tuttora in fase di marcata espansione. Tuttavia fu programmato da noi fin dall'inizio degli anni settanta un deciso impegno per lo sviluppo di nuovi agenti antitumorali apparentati alla doxorubicina ed ottenibili per sintesi parziale o totale. L'obiettivo della nostra ricerca, in effetti iniziata intorno al 1972 essenzialmente sulla base di un progetto con finanziamento agevolato dell'I.M.I., era l'ottenimento di nuovi analoghi delle antracicline antitumorali daunorubicina e doxorubicina provvisti di una o più della seguenti caratteristiche [20]:

1. Minore tossicità generale così da permettere dosaggi più elevati con conseguente aumento della efficacia del trattamento.
2. Attività per via orale.
3. Ridotta cardiotossicità cumulativa al da permettere trattamenti più prolungati.
4. Più ampio spettro antineoplastico o efficacia su tumori resistenti alla doxorubicina.

I principi sui quali si fondava il progetto tenevano conto delle informazioni disponibili oltre che sulla struttura e stereochimica delle antracicline antitumorali, anche sulla forma della molecola dedotta dagli studi di diffrazione ai raggi X di Angioli *et al.* già citato [17] e sul possibile modello molecolare della interazione con il DNA recettore. In particolare, dall'esame della disposizione nello spazio degli atomi della N-bromoacetildanorubicina allo stato cristallino si deduceva che vi erano aree periferiche e centrali della molecola stessa. Le prime erano rappresentate dalla catena laterale in C-9, dal residuo dell'amminozucchero daunosammina e dagli atomi di carbonio 1-4 sull'anello D del cromoforo, le seconde dall'anello alifatico A (recante i centri chirali dell'aglicone e responsabile della orientazione relativa delle diverse parti della molecola nello spazio) e dal sistema idrossichinonico comprendente gli anelli B e C (responsabile della intercalazione del DNA a doppia elica, principale modo di interazione biologica a livello molecolare della doxorubicina). Nel nostro approccio al problema considerammo, in primo luogo, di effettuare modificazioni nelle aree periferiche con il proposito di non alterare

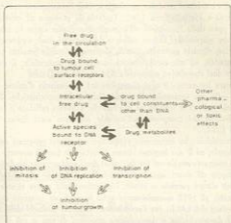


Fig. 2. - Meccanismo di azione di doxorubicina a livello cellulare.

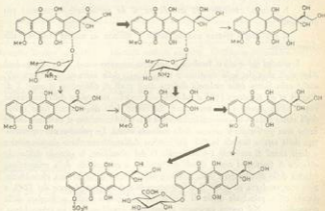


Fig. 3. - Metabolismo di doxorubicina nell'uomo.

i requisiti fondamentali per l'esplicazione dell'attività biologica della molecola, ma di alterarne aspetti quali l'assorbimento, la farmacocinetica, la distribuzione nei diversi tessuti e nelle strutture subcellulari, il metabolismo. Più recentemente furono intrapresi studi riguardanti modificazioni negli anelli A e B, anche sulla base di progetti svolti in collaborazione con il National Cancer Institute degli Stati Uniti (contracts NO1-CM157014 e NO1-CM-57036). In pratica le diverse linee seguite nella realizzazione di nuovi analoghi furono le seguenti:

1. Semplice derivatizzazione degli antibiotici.
2. Sintesi di nuovi aminoglicosidi del daunomicinone e dell'adriamicinone.
3. Sintesi totale di nuovi agliconi e loro glicosidazione.
4. Semisintesi di nuovi composti a partire dagli antibiotici biosintetici.
5. Sintesi parziali a partire dal daunomicinone.
6. Isolamento di composti da culture di nuovi ceppi derivanti per mutazione da *S. peucetius*.

In questa relazione vengono riassunti i risultati più importanti ottenuti seguendo le linee 1) - 3). Altre rassegne su queste ricerche sono state pubblicate [27, 28, 29, 30]. Ad esse si rinvia anche per quanto concerne la bibliografia non citata in questa relazione.

Semplice derivatizzazione degli antibiotici biosintetici

Questa linea di ricerca non è stata considerata prioritaria nei nostri laboratori. L'ottanoato della doxorubicina è un rappresentante della classe degli esteri in 14, caratterizzati da attività antitumorale paragonabile a quella della doxorubicina e la detorubicina (doxorubicina 14-dietossiacetato) è un analogo derivato studiato da ricercatori francesi. Nei laboratori della Rhône-Poulenc era già stato sviluppato il rubidazione (daunorubicina benzoidrazone) mentre ricercatori americani [33] hanno studiato la N-trifluoroacetildoxorubicina 14-esanoato (AD 32). Almeno per due di questi composti (ottanoato e rubidazione) è stata dimostrata una trasformazione « in vivo » nell'antibiotico da cui derivano. Questo approccio registra altri contributi di laboratori stranieri e meritano menzione la N-L-leucil-daunorubicina e la 5-imminodaunorubicina.

Sintesi di nuovi aminoglicosidi

Questa linea di ricerca è stata da noi largamente esplorata ed è tuttora oggetto di indagine. Il suo interesse deriva dall'importanza attribuita al resto aminoglicidico della molecola delle antracicline. Innanzi tutto esso è essenziale per l'espressione dell'attività biologica, in quanto nessun effetto biologico è mai stato riferito agli agliconi (antraciclinoni). È evidente che il resto aminoglicidico è responsabile della solubilità dell'antibiotico dissolvendosi il glucoside in acqua a pH fisiologico in massima parte nella forma cationica protonata.

Inoltre, contenendo il resto glucidico quattro dei sei centri chirali presenti nella molecola delle antracicline antitumorali, lo stesso appariva un probabile determinante delle stereoselettività di interazione di questi composti con i diversi recettori biologici. È ben nota la dipendenza di reazioni enzimatiche e di processi di trasporto dalla struttura e dalla configurazione assoluta nei derivati dei carboidrati. D'altra parte aminozuccheri apparentati con la daunosammina sono noti costituenti di altri antibiotici [27].

I nuovi aminoglicosidi semisintetici sono essenzialmente analoghi configurazionali e/o funzionali preparati secondo uno schema generale comportante la sintesi dell'appropriato derivato dall'aminozucchero corrispondente seguita da glicosidazione del daunosiclidone o di un derivato protetto dell'adriamicinone e deprotezione finale per dare l'aminoglicoside libero desiderato. Nella Figura 4 sono presentate le strutture di alcuni di tali analoghi nei quali l'aminozucchero è stato ottenuto per via sintetica partendo da L-glucosio, L-arabinosio o dalla daunosammina stessa. Un primo gruppo comprende i derivati modificati in C-4' per sostituzione della daunosammina con la acosammina (analoghi 4'-epi), con la 4-desossidaunosammina (analoghi 4'-desossi) e con i 4-O-metil derivati della stessa daunosammina (serie L-lyxo) e della acosammina (serie L-arabino). Un secondo gruppo si riferisce agli altri due analoghi configurazionali della serie L contenenti la ristosammina (serie L-ribo, analoghi 3', 4'-diepi) o il 3-ammino-2, 3,6-tridesossi-L-xilosopiranosio (analoghi 3'-epi) al posto della daunosammina. Un terzo gruppo rappresenta i 6'-idrossi analoghi, preparati in tutte e quattro le configurazioni, cioè L-lyxo, L-arabino, L-ribo ed L-xilo. Vari metodi sono stati usati per la sintesi del legame glicosidico, certamente uno dei punti fondamentali del successo delle sintesi parziali di antracicline. Nella Figura 5 è presentata una sintesi di acosammina e di 4-desossidaunosammina sviluppata nel nostro laboratorio. Nella Figura 6 un originale procedimento secondo il quale un

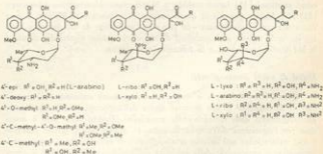


Fig. 4. - Aminoglicosidi semisintetici.

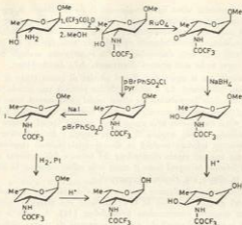


Fig. 5. - Sintesi di 4-epi e 4-deossi-N-trifluoroacetildossammina.

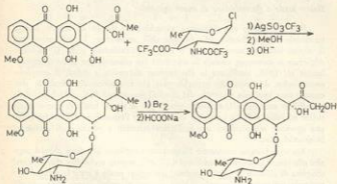


Fig. 6. - Sintesi di 4'-epidoorugicina.

cloroderivato protetto viene fatto reagire con il daunomicinone in presenza di trifluorometansulfonato d'argento (argento triflato). Le rese sono molto buone e la sintesi è marcatamente stereoselettiva per dare il glucoside α . Il derivato della serie doxorubicina è preferibilmente ottenuto per ossidrilazione del corrispondente derivato della serie daunorubicina. Più recentemente analoghi modificati in 3' e 4' sono anche stati ottenuti direttamente dalla daunorubicina.

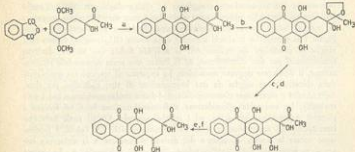
In accordo con le aspettative, diversi membri di questa classe di analoghi sono risultati interessanti. La 4'-epidoxorubicina presenta una attività comparabile con quella della doxorubicina, ma effetti tossici meno marcati, come mostrato dai risultati di esperimenti comparativi su due leucemie sperimentali del topo e su tumori solidi trapiantabili nella stessa specie animale. Questi, insieme con una serie di analoghi risultati ottenuti in altri laboratori, e con indicazioni di una significativamente inferiore tossicità in diverse specie animali (apparentemente connessa con una più rapida eliminazione del farmaco dall'organismo e quindi con livelli inferiori in organi come il cuore e la milza) indussero lo studio del composto in clinica con risultati promettenti.

Un altro analogo di rilevante interesse è la 4'-deossidoxorubicina nella quale l'assenza del gruppo ossidrilico in C-4' determina una maggiore lipofilia e quindi una maggiore concentrazione intracellulare [31]. A parte la rilevante attività in tumori sperimentali del topo accompagnata da ridotta cardiotoxicità, interessanti risultati sono stati ottenuti su tumori umani del colon trapiantati nei topi « nude », un sistema sperimentale la cui predittività per una attività a livello clinico è stata suggerita anche in recenti pubblicazioni [32]. Come si può notare esiste una definita possibilità che la 4'-desossidoxorubicina presenti attività su tumori non rispondenti alla doxorubicina.

Sintesi totale e glicosidazione di nuovi agliconi

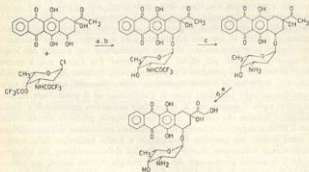
Non v'è dubbio che il sistema antrachinonico sia un importante aspetto strutturale degli antibiotici della famiglia delle antracicline. Le motivazioni per la sintesi totale di nuovi agliconi e relativa glicosidazione erano le seguenti: migliorare o comunque alterare la selettività (se esistente) per i siti di intercalazione sul DNA, modificare la distribuzione elettronica e quindi il comportamento redox del cromoforo antrachinonico (la formazione di radicali in vivo essendo stata ipotizzata come uno dei possibili meccanismi d'azione biologica delle antracicline antitumorali), esplorare metodi per la sintesi totale di nuove antracicline ed infine stabilire i requisiti molecolari per l'espressione dell'attività biologica operando modificazioni non facilmente ottenibili a partire dagli antibiotici biosintetici stessi.

Anche se bisogna riconoscere l'importante contributo di valenti chimici organici alla sintesi totale di antraciclinoni [27, 29], occorre anche dire che la sintesi completa di glicosidi di agliconi ottenuti per sintesi totale è stata in primo luogo realizzata nel nostro laboratorio. Alcuni risultati di questo lavoro sono esemplificati nelle Figure 7 e 8. La prima mostra la sintesi di 4-demetossidaunomicinone



Reagenti: a) AlCl_3 ; b) $\begin{matrix} \text{OH} \\ | \\ \text{OH} \end{matrix}$, TsOH ; c) Br_2 , AIBN ; d) H_2O ; e) CF_3COOH ; f) OH^-

Fig. 7. - Sintesi totale del 4-demossidaumicinsonone.



Reagenti: a) AgSO_3CF_3 ; b) MeOH ; c) OH^- ; d) Br_2 ; e) OH^-

Fig. 8. - Glicosilazione del 4-demossidaumicinsonone e sintesi della 4-demossidaumicina.

otticamente attivo (sintesi anche applicata ad altri analoghi sostituiti nell'anello D). Questo intermedio venne risolto nelle due forme enantiomeriche attraverso la base di Schiff con la (-)-1-feniletanamina. Ambedue gli enantiomeri (nella Figura 7 si esemplifica la sintesi a partire dalla forma (R), levogira) furono fatti reagire in condizioni appropriate con la anidride ftalica (od un suo derivato semisintetico) per dare direttamente, ed in buone rese senza apprezzabile racemizzazione, il desiderato derivato tetraciclico. La sequenza di reazioni era completata dalla chetallizzazione seguita da una bromurazione di tipo radicalico per dare, dopo idrolisi e separazione cromatografica, il 4-demetossidaunomicinone (od i suoi analoghi). La successiva glicosidazione e funzionalizzazione in C-14 forniva i glicosidi 4-demetossidaunomicina, od i relativi analoghi. Questi studi fornirono interessanti dati concernenti le relazioni struttura-attività. Fra l'altro, è interessante notare la elevata «potency» dei derivati 4-demetossi e la stringente esigenza rappresentata dalla configurazione 7(S), 9(S) dell'anello A. In questa classe di analoghi, la 4-demetossidaunorubicina e la 4-demetossidoxorubicina sono attualmente considerati quali promettenti agenti antitumorali. La prima è provvista di considerevole attività antileucemica, anche se somministrata per via orale agli animali di laboratorio, la seconda è importante per la sua attività su tumori solidi sperimentali unitamente ad una ridotta cardiotossicità alle dosi efficaci [33].

Requisiti molecolari per la attività antitumorale

Da quanto è stato esposto appare evidente che, anche se l'attività antitumorale è presente in una varietà di composti biosintetici e di sintesi parziale o totale appartenente alla classe delle antracicline, solo alcuni di essi hanno mostrato efficacia comparabile con quella della daunorubicina o della doxorubicina. Inoltre i nuovi prodotti proposti sono caratterizzati da piccole modificazioni strutturali rispetto ai composti attualmente usati in terapia. Questo certamente non implica la conclusione che ulteriori trasformazioni non possano dar luogo ad agenti antitumorali più efficaci o più selettivi. Fra l'altro, non è ancora possibile stabilire con precisione i requisiti strutturali connessi con l'attività antitumorale, anche per le limitate conoscenze tuttora disponibili concernenti parametri farmacologici importanti come la distribuzione ed il metabolismo mentre, in realtà, anche il meccanismo di azione delle antracicline antitumorali a livello cellulare è tutt'altro che stabilito con certezza. Tuttavia, poiché la complessazione con il DNA a doppia elica attraverso il particolare meccanismo dell'intercalazione è senza dubbio una proprietà fondamentale a livello molecolare delle antracicline, ritengo interessante riferire circa l'analisi della correlazione fra tale proprietà e la attività antitumorale dei nuovi analoghi. Questa analisi, qui presentata in via preliminare, è fondata su dati sperimentali di complessazione in soluzione ottenuti, nel nostro laboratorio, su analoghi di daunorubicina e doxorubicina presentanti le più svariate modificazioni strutturali.

Nella Tabella 2 sono riportati i parametri di legame della reazione di complessazione di doxorubicina e di daunorubicina. Tali parametri sono stati deter-

TABELLA 2 - Costanti apparenti di formazione e numero di siti leganti per il complesso con DNA di timo di vitello in tampone tris · HCl determinati con il metodo della dialisi all'equilibrio.

Composto	DNA	Forza ionica	K_{app} ($M^{-1} \times 10^3$)	n_{app} (Mol/DNA-P)
Doxorubicina	Nativo	0,196	4,5	0,16
Doxorubicina	Nativo	0,012	4,9	0,17
Doxorubicina	Denaturato	0,196	1,6	0,17
Doxorubicina	Nativo	0,196	5,7	0,18
Doxorubicina	Nativo	0,012	6,2	0,20
Doxorubicina	Denaturato	0,196	1,5	0,21

minati anche in altri laboratori e variano a seconda delle condizioni sperimentali usate (tipo del DNA, metodologia, tampone, forza ionica). Nell'indagine di cui si riferisce tutti i dati furono ottenuti con la stessa metodica e si possono considerare, in prima approssimazione ed a questo stadio del nostro studio, confrontabili fra loro [34, 35, 36]. I dati presentati sono indicativi di una considerevole stabilità del complesso in questione, specialmente nel caso del DNA nativo, e della praticamente comparabile affinità dei due antibiotici per il DNA.

Tenendo conto di ciò si possono stabilire dei criteri per suddividere i nuovi analoghi in gruppi a seconda della loro affinità per il DNA (in questo caso sempre il DNA di timo di vitello). La Tabella 3 riporta i criteri adottati per tale suddivisione, in base ai quali si definiscono come ad « alta affinità » quei composti che presentano una costante apparente di formazione dello stesso ordine di grandezza di quella della doxorubicina, ad « affinità intermedia » quei com-

TABELLA 3 - Descrizione della « affinità relativa » per DNA di analoghi sulla base del valore della costante apparente di formazione.

Affinità relativa	DNA	Forza ionica	K_{app} ($M^{-1} \times 10^3$)	$\frac{K_{app} \text{ analogo}}{K_{app} \text{ doxorubicina}}$
Alta	Nativo	0,196	> 3,0	> 0,8
Alta	Nativo	0,012	> 4,9	> 0,8
Alta	Denaturato	0,196	> 1,2	> 0,8
Intermedia	Nativo	0,196	1,9 + 3,0	0,5 + 0,8
Intermedia	Nativo	0,012	3,0 + 4,9	0,5 + 0,8
Intermedia	Denaturato	0,196	0,8 + 1,2	0,5 + 0,8
Bassa	Nativo	0,196	< 1,9	< 0,5
Bassa	Nativo	0,012	< 3,0	< 0,5
Bassa	Denaturato	0,196	< 0,8	< 0,5

posti che presentano una costante di formazione sempre elevata ma verosimilmente inferiore a quella dell'antibiotico di confronto, fino a circa la metà del valore corrispondente a quest'ultimo, ed infine a «bassa affinità» quei composti presentanti valori della costante suddetta chiaramente più bassi [37].

La Tabella 4 riporta i composti studiati classificati nei tre gruppi sopra menzionati. Come si nota sette dei 27 analoghi esaminati appartengono al primo, 11 al secondo e 9 al terzo gruppo. I composti ad «alta affinità» presentano modifiche limitatamente alle posizioni 4', 4 e nella catena laterale in C-9, che in un caso viene ridotta ad un solo atomo di carbonio (9-deacetil-9-idrossimetildanorubicina) ed in un altro ridotta in C-13 da chetone ad alcool. Per quanto concerne il secondo gruppo, caratterizzato da una costante di stabilità abbastanza elevata seppur inferiore a quella degli antibiotici di riferimento, esso annovera, come il precedente, composti modificati nella catena laterale e nel resto glucidico. Questi ultimi sono i 4'-O-metileteri ed i derivati della serie L-lixo 6-ossidrilata o della serie L-ribo. Inoltre sono compresi in questo gruppo i derivati 9-desossi, ed un 9, 10-deidro il che suggerirebbe l'importanza dell'ossidrilico in C-9 per una più elevata affinità al DNA. I composti la cui affinità per il DNA è sensibilmente ridotta rispetto a quelle degli antibiotici di riferimento sono, nell'ordine, 3'-epidaunorubicina (configurazione L-xilo), il β -anomero della 4'-epidaunorubicina, il 4'-O-metil etere della 4'-epidaunorubicina e due analoghi modificati nella stereochimica dell'anello A per quanto riguarda i composti della serie correlata alla daunorubicina, ed il 14-ottanosato, il β -anomero, il derivato

TABELLA 4 - *Classificazione di analoghi sulla base della «affinità relativa» per il DNA.*

Alta	Intermedia	Bassa
Danorubicina, 4'-epi	Danorubicina, 14-oxofulvico	Danorubicina, 3'-epi
Danorubicina, 4'-desossi	Danorubicina, 9-desossi	Danorubicina, 4'-epi- β anomero
Danorubicina, 4-demetossi	Danorubicina, 9, 10-anidro	Danorubicina, 4'-epi-4'-O-metil
Danorubicina, 9-deacetil-9-idrossimetil	Danorubicina, 9-deacetil	Danorubicina, 9-deacetil-9-epi
	Danorubicina, 3', 4'-diepi	Danorubicina, 4-demetossi-7, 9-diepi, β anomero
	Danorubicina, 4'-O-metil	
	Danorubicina, 6'-idrossi	
	Danorubicina, 3', 4'-diepi-6-idrossi	
Doxorubicina, 4'-epi	Doxorubicina, 14-glicolato	Doxorubicina, 14-ottanosato
Doxorubicina, 4'-desossi	Doxorubicina, 9-desossi	Doxorubicina, β -anomero
Doxorubicina, 13-didro (adriamicinolo)	Doxorubicina, 4'-O-metil	Doxorubicina, 4'-diepi-6'-idrossi
		Doxorubicina, N-acetil

6'-idrossi della serie L-ribo e quello N-acetilato per quanto riguarda i composti della serie correlata alla doxorubicina.

Il confronto delle attività dei diversi gruppi di analoghi con i composti di riferimento sulle leucemie sperimentali del topo è riportato nelle Tabelle 5, 6, 7. Gli analoghi classificati nel gruppo ad alta affinità presentano valori delle dosi ottimali e dell'effetto sulla sopravvivenza degli animali vicini a quelli degli antibiotici da cui derivano. Con l'importante eccezione dei derivati 4'-O-metil, i composti classificati nel gruppo ad « affinità intermedia » presentano attività comparabile agli antibiotici di riferimento ma a dosi sensibilmente superiori. Ancora con l'eccezione della 4'-epi-4'-O-metil-daunorubicina, i composti del terzo gruppo o non presentano attività antitumorale alle dosi massime saggiate, oppure presentano attività a dosi chiaramente superiori. Il risultato riportato per doxorubicina ottanoso è da interpretare sulla base della rapida idrolisi dello stesso ad opera di enzimi (verosimilmente appartenenti alla classe delle esterasi) presenti, ad esempio, nel plasma e nel fegato delle specie animali sperimentate.

Le deduzioni che si possono trarre da questa esposizione dei dati relativi alla complessazione con il DNA e le sue correlazioni con l'attività biologica sono le seguenti. Primo, le diverse antracicline apparentate con la daunorubicina e la doxorubicina qui esaminate presentano una diversificata affinità verso il DNA, che va da valori paragonabili a quelli degli antibiotici di attuale applicazione clinica a valori fino a dieci volte inferiori. Secondo, si possono intravedere definite correlazioni fra le modificazioni chimiche apportate e la variazione conseguente della affinità per il DNA. Tali correlazioni sono potenzialmente utilizza-

TABELLA 5 - Confronto della attività antitumorale di analoghi ad « alta affinità relativa » con i capostipiti nella leucemia sperimentale del topo.

Analogo	Tumore	D.O. ^a	T/C ^b	Capostipite (daunorubicina o doxorubicina)	
				D.O. ^a	T/C ^b
Daunorubicina, 4'-epi	L 1210 ^c	5	137	4	150
Daunorubicina, 4'-desossi	L 1210 ^c	4	162	2	162
Daunorubicina, 4'-desossosi	P 388 ^d	2,4	163	12	144
Daunorubicina, 9'-desacetil-9'-idrossimetil	P 388 ^d	10,5	136	6	136
Dosorubicina, 4'-epi	P 388 ^d	5	166	8	150
Dosorubicina, 4'-desossi	P 388 ^d	3,13	167	8	172

^a Dose ottimale (mg/Kg) ^b Tempo medio di sopravvivenza degli animali trattati espresso come percentuale rispetto ai controlli. ^c Trattamento i.p. al giorno 1 (Istituto Nazionale Tumori, Milano). ^d Trattamento i.p. ai giorni 5, 9, 13 dall'inoculo del tumore (dati di NCI, Bethesda, Md., USA).

TABELLA 6 - Confronto della attività antitumorale di analoghi ad « affinità relativa intermedia » con i capostipiti nella leucemia sperimentale del topo.

Analogo	Tumore	D.O.*	T/C ^b	Capostipite	
				D.O.*	T/C ^b
Dauorubicina, 14-morfolino	P 388 ^a	8,33	162	1 ^f	192 ^f
Dauorubicina, 9-desossi	P 388 ^a	18,8	128	3	129
Dauorubicina, 9, 10-anidro	L 1210 ^c	tossico	—	—	—
Dauorubicina, 9-deacetil	P 388 ^a	75	156	13,3 (8 ^f)	132 (169 ^f)
Dauorubicina, 3', 4'-diepi	P 388 ^a	25	251	0,5	165
Dauorubicina, 4'-O-metil	P 388 ^a	2,9	156	2,9	169
Doxorubicina, 9-desossi	P 388 ^d	37,5	128	9,3	154
Doxorubicina, 4'-O-metil	P 388 ^a	6,6	270	4,4	254

*+d Cifra Tabella 6. * Come (d) ma QD1:9. ^f Doxorubicina.

TABELLA 7 - Confronto della attività antitumorale di analoghi a « bassa affinità relativa » con i capostipiti nella leucemia sperimentale del topo.

Analogo	Tumore	D.O.*	T/C ^b	Capostipite	
				D.O.*	T/C ^b
Dauorubicina, 3'-epi	L 1210 ^c	50 ^f	100	4	150
Dauorubicina, 4'-epi (β-anomero)	Gross ^a	3 ^f	114	3,5	200
Dauorubicina, 4'-epi-4'-O-metil	L 1210 ^c	20	174	2,9	169
Dauorubicina, 9-deacetil-9-epi	P 388 ^a	6,25	171	1	171
Dauorubicina, 4-demetossi-7,9-diepi (β-anomero)	L 1210 ^c	10 ^f	100	4	150
Doxorubicina, 14-ottanosato	P 388 ^a	10	176	8	185
Doxorubicina, N-acetil	P 388 ^a	100	201	0,78	233

*+d Cifra Tabella 6. ^f Dose massima saggiata. * Trattamento iv QD 1-5 (Istituto Nazionale Tumori, Milano).

bili per la direzione degli studi chimici relativi a questa classe di composti. Terzo, esiste una diretta relazione fra la costante di stabilità e l'attività biologica in quanto una sensibile riduzione della prima comporta, fatte alcune interessanti eccezioni meritevoli di approfondimenti, o una riduzione della «potency» o dell'attività antitumorale o di ambedue queste proprietà.

Conclusioni

È indubbio che la scoperta della doxorubicina ha grandemente contribuito ai recenti progressi della chemioterapia antitumorale. Tuttavia noi abbiamo considerato questo risultato, di per sé notevole, come un punto di partenza per ulteriori sviluppi ricercando, attraverso lo studio della chimica delle antracicline antitumorali, nuovi composti dotati di aumentata sicurezza di impiego e di più elevata efficacia.

La modificazione del residuo glucidico ha già fornito la 4'-epidoxorubicina e la 4'-desossidoxorubicina, due composti selezionati a livello preclinico per una più bassa incidenza di effetti collaterali sfavorevoli e per uno spettro di attività antitumorale potenzialmente allargato rispetto alla doxorubicina stessa. Anche positivi risultati ha dato l'approccio totalmente sintetico a nuovi agliconi che ha condotto a due nuovi promettenti agenti antitumorali, la 4-demetossidaurorubicina e la 4-demetossidoxorubicina.

Gli studi connessi con le correlazioni struttura-attività, con particolare riferimento alle interazioni a livello molecolare con il DNA ed alla relativa corrispondenza con l'attività biologica, appaiono capaci di fornire ulteriori elementi altamente informativi riguardo i requisiti molecolari per l'ottimizzazione delle proprietà farmacologiche utilizzabili per lo sviluppo di nuovi prodotti caratterizzati da maggiore selettività di azione e più ampio spettro di attività. Avendo riferito su quello che credo rappresenti un importante contributo della ricerca chimica al progresso della medicina ritengo utile sottolineare la necessità di una stretta e qualificata integrazione interdisciplinare per il raggiungimento di risultati utili. Le ricerche di cui ho trattato in questa relazione ne rappresentano certamente una dimostrazione.

Ringraziamenti

L'Autore ringrazia tutti i collaboratori che hanno contribuito allo svolgimento delle ricerche sulle antracicline antitumorali, in particolare i Dr. G. Cassinelli, G. Franceschi, P. Orezzi, S. Penco strettamente legati agli sviluppi chimici di questo progetto per oltre un ventennio. L'Autore esprime anche la propria gratitudine al Prof. G. Montalenti, S. Ranzi e G.B. Marini-Bettolo, nonché al Prof. A. Ballo per il conferimento della medaglia per le Scienze Fisiche e Naturali della Società Italiana delle Scienze detta del XI. Un riconoscimento postumo è dovuto al Dr. Giulio Bertini, Amministratore Delegato e direttore scientifico della Farmitalia negli anni della scoperta e dello sviluppo dell'Adriamicina.

BIBLIOGRAFIA

- [1] WARREN S. A. (1959) - *The Actinomycetes*, The William & Wilkins Co., Baltimore, vol. I, p. 198.
- [2] BROCKMANN H. (1963) - *Fortschr. der Chemie Organischer Naturstoffe*, Springer Verlag, Vienna, vol. 21, p. 121.
- [3] ARCAMONE F., DI MARCO A., GAETANI M. and SCOTTI T. (1961) - «Giorn. Microbiol.», 9, 83.
- [4] CASSINELLI G. and OREZZI P. (1963) - «Giorn. Microbiol.», 11, 167.
- [5] DI MARCO A., GAETANI M., OREZZI P., SCARFINATO B. M., SILVESTRINI R., SOLDATI M., DADDA T. and VALENTINI L. (1964) - «Natura», 201, 706.
- [6] DI MARCO A. (1967) - «Path. Biol.», 15, 897.
- [7] DI MARCO A., GAETANI M., DORRIGOTTI L., SOLDATI M. and BELLINI O. (1963) - «Tumori», 49, 203.
- [8] ARCAMONE F., FRANCESCHI G., OREZZI P., CASSINELLI G., BARBIERI W. and MONDELLI R. (1964) - «J. Am. Chem. Soc.», 86, 5334.
- [9] ARCAMONE F., CASSINELLI G., OREZZI P., FRANCESCHI G. and MONDELLI R. (1964) - «J. Am. Chem. Soc.», 86, 5335.
- [10] TAN C. and DI MARCO A. (1965) - «Proc. Amer. Ass. Cancer Res.», 6, 64, abstr. 253.
- [11] BERNARD J. et al. (1969) - *Recent Results in Cancer Research*, «Rabbinomyca», 20, Springer Verlag, Berlino.
- [12] DESPOTS R., DUBOIS M., NANCY D., MARAL R., NINET L., PINNEY S., PRUD'HOMME J., CHARPENTIER Y., BELLOC A., DE CHEZELLE N., LUNEL J. and REINAUT J. (1967) - «Anticancer. Forsch.», 17, 934.
- [13] ARCAMONE F., FRANCESCHI G., OREZZI P., PINCO S. and MONDELLI R. (1968) - «Tetrahedron Letters», 3349.
- [14] ARCAMONE F., CASSINELLI G., FRANCESCHI G., OREZZI P. and MONDELLI R. (1968) - «Tetrahedron Letters», 3353.
- [15] ARCAMONE F., CASSINELLI G., FRANCESCHI G., MONDELLI R., OREZZI P. and PINCO S. (1970) - «Gazz. Chim. Ital.», 100, 949.
- [16] BROCKMANN H., BROCKMANN Jr. and NIEMEYER J. (1968) - «Tetrahedron Letters», 4719.
- [17] ANGIOLI R., FURETTI E., RIVA DE SANSEVERINO L., ISALCI N., KENNARD O., MOTHERWELL W. D. S., WAMPLU D. L. and ARCAMONE F. (1971) - «Nature New Biology», 234, 78.
- [18] PIGRAM W. J., FULLER W. and HAMILTON I. D. (1972) - «Nature New Biol.», 235, 17.
- [19] DI MARCO A. and ARCAMONE F. (1973) - «Anticancer. Forsch.», 25, 368.
- [20] ARCAMONE F., CASSINELLI G., DI MARCO A. and GAETANI M. (1971) - «US Patent 3 590 028» (June 29).
- [21] ARCAMONE F., CASSINELLI G., FRANCESCHI G., PINCO S., FUL C., REDAELLI S. and SILVA A. (1972) - *Int. Symp. on Adriamycin*, Springer Verlag, Berlino, p. 9.
- [22] ARCAMONE F., FRANCESCHI G., PINCO S. and SILVA A. (1969) - «Tetrahedron Letters», 11, 1007.
- [23] DI MARCO A., GAETANI M. and SCARFINATO B. M. (1969) - «Cancer Chemother. Rep.», 53, 33.
- [24] ARCAMONE F., BARBIERI W., FRANCESCHI G. and PINCO S. (1969) - «La Chimica e l'Industria», 51, 834.

- [25] ARCAMONE F., FRANCESCHI G. and PINCO S. (1974) - « US Patent 3 805 124 » (Apr. 9).
- [26] CARTER S. K. (1975) - « J. Nat. Cancer Inst. », 55, 1265.
- [27] ARCAMONE F. (1981) - *Doxorubicin*, Medicinal Chemistry Series, Vol. 17, Academic Press, New York.
- [28] ARCAMONE F. (1977) - « *Lloyd's* », 40, 45.
- [29] ARCAMONE F. (1978) - *Daunomycin and related Antibiotics*, in *Topics in Antibiotic Chemistry*, Vol. 2, P. G. Sammis Ed., Ellis Horwood Ltd., Publ., Chichester, p. 100.
- [30] ARCAMONE F. (1980) - *The Development of New Antitumor Anthracyclines*, Medicinal Chemistry Series, Vol. 16, Academic Press, New York, p. 1-40.
- [31] FORMELLI F., POLLINI C., CARAZZA A. M., DI MARCO A. and MARIANI A. (1981) - « *Cancer Chemother. Pharmacol.* », 5, 139.
- [32] GIULIANI F. C., ZIRVI K. A., KAPLAN N. O. and GOLDIN A. (1981) - « *Int. J. Cancer* », 27, 5.
- [33] CARAZZA A. M. (1981) - *Antitumor Activity and Cardiac Toxicity of 4'-Deoxydaunorubicin in Mice*, paper presented at the Symposium on Anthracycline, Parigi, 24-25 giugno.
- [34] ARLANDINI E., VIGEVANI A. and ARCAMONE F. (1977) - « *Il Farmaco*, Ed. Sci. », 32, 315.
- [35] ARLANDINI E., VIGEVANI A. and ARCAMONE F. (1980) - « *Il Farmaco*, Ed. Sci. », 35, 67.
- [36] PINCO S., ANGELUCCI P., VIGEVANI A., ARLANDINI E. and ARCAMONE F. (1977) - « *J. Antibiot.* », 30, 764.
- [37] ARCAMONE F. (1981) - *Structure-Activity Relationships*, paper presented at the Symposium on Anthracyclines, Parigi, 24-25 giugno.