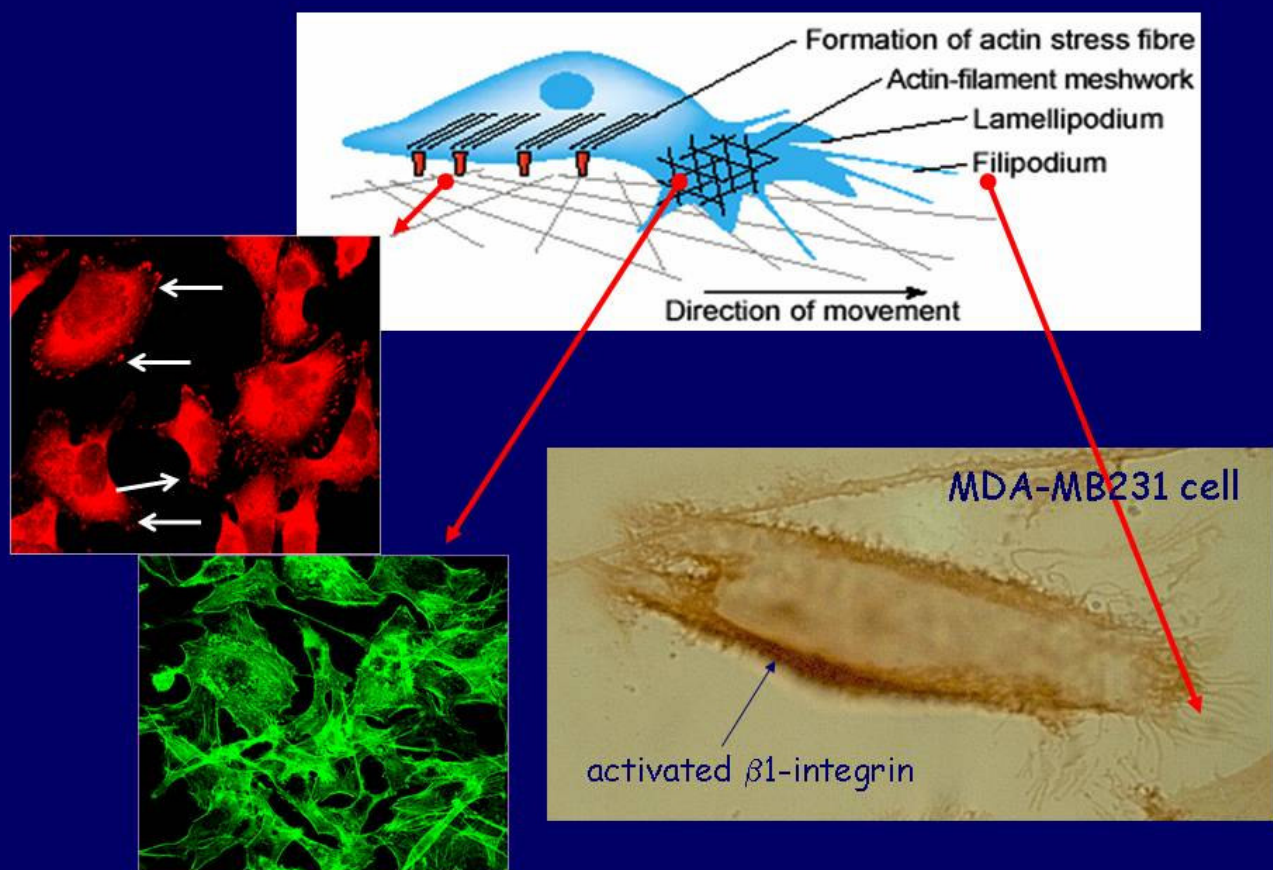


RELAZIONE SCIENTIFICA 2007

drug induced $\beta 1$ -integrin activation



Direttore Scientifico: Prof. Gianni Sava

CON IL SOSTEGNO ECONOMICO DI:

Fondazione - CRTrieste

Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica



INFORMAZIONI GENERALI

L'attività di ricerca riportata nella presente relazione è stata svolta nei laboratori della Fondazione Callerio Onlus e nell'ambito delle collaborazioni esistenti con ricercatori di altri Enti e di Atenei italiani e stranieri nel periodo 1 gennaio 2007 – 31 dicembre 2007.

Oltre ai ricercatori dipendenti, al tecnico di laboratorio ed al personale amministrativo, nel 2007 la Fondazione Callerio Onlus ha potuto contare su giovani laureati, per i quali ha investito risorse per sostenere la loro formazione nella ricerca e favorendo la loro partecipazione a corsi di dottorato, attivati in diversi atenei italiani. Globalmente sono state investite risorse per 9,5 anni/uomo (1 anno/uomo= 11 mesi). Nel dettaglio, sono intervenuti, in aggiunta al tecnico di laboratorio ed ai 2 ricercatori in servizio permanente, 7 ricercatori inseriti attraverso lo strumento della borsa di studio e/o contratti occasionali di varia durata nelle attività ricerca programmate e svolte.

Composizione del gruppo di ricerca

Prof. Gianni Sava	Direttore Scientifico
<u>Dott. Moreno Cocchietto</u>	Biologo, ricercatore
<u>Dott. Alberta Bergamo</u>	Chimico e Tecnologo Farmaceutico, ricercatore
Dott. Alessia Masi	Biologo, dottoranda
Dott. Laura Zorzin	Chimico e Tecnologo Farmaceutico, borsista e collaboratore occasionale
Dott. Ilaria Crucil	Chimico e Tecnologo Farmaceutico, dottoranda
Prof. Sonia Zorzet	Professore associato BIO/14, collaboratore occasionale
Chiara Garrovo	Chimico e Tecnologo Farmaceutico, borsista e collaboratore occasionale
Barbara Toffoli	Chimico e Tecnologo Farmaceutico, collaboratore occasionale
Rita Abbate	Biologo, collaboratore occasionale
<u>Sig. M. Zabucchi</u>	Diploma maturità scientifica ad indirizzo sanitario, tecnico di laboratorio

La sottolineatura indica le persone con contratto a tempo indeterminato.

La dott. Ilaria Crucil ha svolto attività di ricerca sulla bioconiugazione di farmaci antitumorali con l'acido ialuronico presso l'Università degli Studi di Trieste.



RICERCA SCIENTIFICA

Temi di Ricerca della Fondazione Callerio

Modulazione delle integrine con composti basati sui metalli e controllo della malignità tumorale

Il progetto prevede lo studio del meccanismo d'azione di complessi e di organometallici del rutenio con particolare riferimento alle attività di controllo dei processi di invasione e metastasi, utilizzando linee cellulari di tumori umani a diverso grado di malignità.

L'attività di ricerca è stata condotta nell'ambito del ruolo assegnato ai ricercatori della Fondazione Callerio in due progetti principali quali:

MADE – Metalli Anticancro dell'Era Postgenomica, progetto che nell'anno 2007 è stato totalmente a carico della Fondazione Callerio.

“Nuove terapie e Farmaci Antitumorali – antimetastatici inorganici, terapia genica e nanobioteconologie”, progetto finanziato dalla Regione Friuli Venezia Giulia, con capofila l'Università di Trieste e con altri partner quali, Elettra, CRO di Aviano, Burlo Garofolo, SISSA.

Inoltre, la Fondazione Callerio è la sede principale del Working Group 003 dell'Azione COST D39, un progetto di cooperazione europea nel campo dei farmaci basati sui metalli per la terapia dei tumori. Il WG3 si occupa del tema “New Targets for Metal-Based Drugs: Beyond DNA” ed è coordinato dal prof. G. Sava. Al WG3 partecipano altri 6 laboratori, rispettivamente nell'Università di Sassari (prof. G. Pintus), nell'Università di Sheffield (prof. N. Bird), nell'Università di Muenster (prof. J. Eble), nell'Università di Valencia (prof. J. Estrela), nell'Istituto Nazionale di Biologia di Lubiana (prof. T. Lah) e nel Centro Olandese del Cancro (prof. J. Schellens).

Studio delle proprietà antitumorali ed antileucemiche di derivati dell'acido ialuronico

Il progetto è focalizzato sull'uso dell'acido ialuronico per veicolare in vivo composti poco maneggevoli dal punto di vista farmacocinetico quali il modulatore delle istone deacetilasi sodio butirrato e l'agente antiossidante acido retinico. Lo studio, che prevede l'uso di modelli di tumori e di leucemie in vitro ed in vivo, è supportato dall'attività di un dottorando e dell'attività tutoriale della prof. Sonia Zorzet del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Trieste.

Messa a punto di una microsfera contenente lisozima per la somministrazione orale di farmaci e vaccini

Il progetto prevede il completamento degli studi *in vivo* per la valutazione dell'attività anti-aging dei microsistemi contenenti lisozima, lo sviluppo di un impianto produttivo avanzato e l'approfondimento dei campi applicativi finora individuati (il diabete, la nutraceutica, la vaccinazione dei pesci di allevamento e il miglioramento delle performances di vita dei pesci ornamentali), per individuare operatori ed esperti del settore con cui cooperare e per comprendere meglio l'obiettivo possibilità di impiego della nostra tecnologia sul mercato. Inoltre, è stato messa a punto un prototipo per la produzione di quantità utili a studi di validazione su ampia scala.

L'attività di ricerca è stata condotta in collaborazione con Innovation Factory di AREA Science Park con il quale è stata stipulata in data 30 marzo 2007 una convenzione per l'avvio e la gestione di un gruppo di sviluppo pre-impresa e con il quale sono stati anche condivisi i costi della ricerca.

Collaborazioni in atto

Nel corso del 2007 sono state attivate e mantenute numerose collaborazioni di ricerca con ricercatori di vari Enti italiani e stranieri.

- Ricercatori di Dipartimenti di Atenei Italiani (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Trieste, prof. Enzo Alessio; Dipartimento di Fisiologia e Patologia, Università di Trieste, prof. G. Zabucchi; Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Trieste, dott. S. Pacor, S. Zorzet, V. Scarcia, prof. A. Furlani; Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole, Università di Trieste, prof. Attilio Cesàro; Dipartimento di Scienze Animali, Università di Udine, dott. Raffaele Ballestrazzi,



- Dipartimento di Patologia e Oncologia, Università di Bari, prof. M. Coluccia; Dipartimento di Farmacologia, Università di Siena, prof. M. Ziche).
- Prof. B. Fabris e dott.ssa B. Toffoli, Clinica Medica Ospedale di Cattinara, Trieste.
 - Dott.ssa. A. Paolini, dott.ssa D. Zezza, dott.ssa V. Ridolfi, prof. G. Giorgetti, Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo.
 - Dott. R. Candido, Centro Diabete A.S.S.1 Triestina, Trieste.
 - Dr. Paolo Blasi e Dr. Stefano Giovagnoli, ricercatori presso il Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco dell'Università di Perugia
 - , Facoltà di Scienze matematiche, fisiche e naturali
 - (DIAN), Fac di Medicina Veterinaria – Udine
 - Ricercatori di Dipartimenti stranieri (Royal College of Surgeons in Ireland, Department of Chemistry, Dublin, dott. Celine Marmion; Institut de Chimie Moléculaire et Biologique, Laboratoire de Chimie Organometallique EPFL-BCH, Lausanne, prof. Paul Dyson; Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, dott. Iztok Turel; Leiden Institute of Chemistry, Gorleaus Laboratories, Leiden University, Leiden, The Netherlands; prof. Ian Reedijk. NCFS "Demokritos", Institute of Physical Chemistry, Athens, prof. Nikos Katsaros).
 - Prof.ssa J. Filipović-Grčić Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Ante Kovačića 1, HR-10000 Zagreb, Croazia

Sintesi dei risultati

I risultati di seguito sintetizzati si riferiscono alle ricerche svolte nei laboratori della Fondazione Callerio Onlus e/o nei laboratori di ricercatori di altri Enti con i quali esistono collaborazioni e che riguardano i temi di ricerca prioritari che la Fondazione Callerio Onlus ha attivato per l'anno 2007.

Proprietà antineoplastiche di composti basati sui metalli

Attività di ricerca di LINFA (http://www.callerio.org/Linfa_i.htm)

L'attività di ricerca scientifica svolta in LINFA nel periodo 01 gennaio – 31 dicembre 2007, compresa nell'ambito del progetto MADE (Metalli Anticancro Dell'Era Postgenomica), ha riguardato due aspetti principali: **a)** l'azione del complesso di rutenio antimetastatico NAMI-A sui determinanti molecolari specifici di cellule invasive, e **b)** uno studio di relazione struttura-attività di composti metallici di rutenio.

a) attività del NAMI-A sui determinanti molecolari specifici di cellule invasive

Nel corso del 2006 sono state svolte ricerche che avevano come scopo la determinazione dell'attività del NAMI-A sulle principali fasi della metastatizzazione. Questo studio ha messo in luce la peculiare attività di NAMI-A nei confronti di cellule con caratteristiche di malignità, non condivise da altri tipi cellulari, e ha permesso di indirizzare le ricerche del 2007 sulla ricerca di uno specifico bersaglio presente solo su di esse. In base ai dati in nostro possesso il bersaglio molecolare in questione potrebbe essere rappresentato dalle integrine, una famiglia di molecole nei confronti della quale il NAMI-A ha mostrato di poter interagire. Le novità più rilevanti in questo argomento riguardano la scoperta della capacità di NAMI-A di interagire con le integrine nelle diverse conformazioni che esse possono assumere, e che corrispondono a differenti stati di attivazione della molecola. A livello di trasduzione del segnale le modificazioni indotte da NAMI-A sono duplici: quando l'integrina è impegnata nell'interazione con componenti della matrice extracellulare, come la fibronectina, il complesso di rutenio la attiva e, a valle, aumenta l'attivazione di RhoA, uno dei mediatori intracellulari attraverso cui le integrine intervengono nel rimodellamento del citoscheletro. Al contrario, se l'integrina non sta svolgendo la sua attività di molecola di adesione, NAMI-A è ancora capace di interagire con essa ma l'effetto finale è di riduzione della attivazione di RhoA. Possiamo traslare queste due situazioni alle diverse condizioni in cui si trova una cellula tumorale in vivo. Il primo caso rappresenta una cellula del tumore primario, che a seguito del trattamento con NAMI-A, attiva le sue integrine, rimodella il citoscheletro generando un consistente numero di fibre tese di actina, che la mantengono come paralizzata e le impediscono di "scappare" dalla massa primaria. La seconda situazione corrisponde ad una cellula tumorale in circolo, sulla quale la ridotta attivazione della piccola GTPasi RhoA può spiegare la ridotta capacità di metastatizzazione.

b) studio di relazione struttura-attività.

Lo scopo di questa parte del lavoro è confrontare il complesso di rutenio NAMI-A con altri composti di rutenio, che si differenziano per i ligandi sulla sfera di coordinazione del metallo centrale, in una serie di test che mimano in vitro le tappe della metastatizzazione. Usando molecole che mantengono una parte della struttura



simile al NAMI-A ma che differiscono per uno o più ligandi vogliamo determinare quale sia la minima struttura base ancora capace di avere proprietà antimetastatiche. I composti scelti per operare questo paragone differiscono anche per le loro proprietà antitumorali ed antimetastatiche in modo da poter tracciare il profilo delle relazioni struttura-attività. I composti scelti per questo studio sono due derivati eterocicli KP418 e KP1019 (sintetizzati dal prof. BK. Keppler, Università di Vienna, Austria), e tre organometallici, RAPTA-T (sintetizzato dal prof. P.J. Dyson, EPFL, Lausanne, Switzerland), RM175 e AFAP51 (sintetizzati dal prof. P. Sadler, Università di Edimburgo, UK) due congeneri che si differenziano solo per il metallo, rutenio in RM175 e osmio in AFAP51, mantenendo inalterati tutti gli altri leganti. I risultati di questo studio indicano che KP1019 e RM175 agiscono come citotossici classici, ovvero tutte le azioni a loro carico possono essere ricondotte alla inibizione della proliferazione cellulare da essi indotta. Degno di nota è il fatto che la sostituzione del rutenio presente in RM175 con un atomo di osmio in AFAP51 causa la perdita di ogni attività. Mentre KP418 è risultato scarsamente attivo in tutti i test eseguiti, RAPTA-T è emerso come l'unico composto della serie che mostra una certa selettività nei confronti delle cellule più invasive e maligne. In particolare ha dimostrato una spiccata azione in tutti quegli esperimenti in cui è importante il contatto della cellula tumorale con i componenti della matrice extracellulare, come i test di migrazione e di adesione.

Il confronto di questi risultati con l'attività antimetastatica in vivo ci permette anche di affermare che per poter "prevedere" tale selettiva attività mediante dei semplici test in vitro, sembrano essere particolarmente rilevanti gli esperimenti volti a determinare le capacità migratorie delle cellule tumorali e la loro abilità a ri-aderire ad un substrato di crescita.

Attività antitumorale di derivati dell'acido ialuronico con desametasone e acido butirrico

La citotossicità dei bioconiugati D3 (acido ialuronico con desametasone) o BD2 (acido ialuronico con desametasone e acido butirrico) cambia a seconda della linea tumorale usata: è bassa per la leucemia P388 ed è alta per la leucemia promielocitica NB4. L'impiego di un anticorpo bloccante il recettore di superficie CD44 (recettore per l'acido ialuronico) diminuisce la citotossicità dei composti suggerendo che l'ingresso nella cellula dei principi attivi è mediato da questi recettori. Il fatto che BD3 è molto più attivo di D2 (acido ialuronico contenente acido butirrico) e di D3 indica che la combinazione è in grado di dare un risultato sinergico. Per quel che riguarda il peso molecolare dell'acido ialuronico, quelli superiori a 160 kDa sono in grado di produrre una certa inibizione dell'invasione e dell'angiogenesi delle cellule Mia-PaCa2. In vivo, in animali portatori della leucemia NB4, il desametasone legato all'acido ialuronico, al contrario del desametasone libero, è in grado di prolungare significativamente l'aspettativa di vita degli animali con tumore. Questi dati suggeriscono che l'acido ialuronico rappresenta un ottimo strumento per veicolare un farmaco differenziante e antileucemico come il desametasone per il trattamento della leucemia promielocitica.

Microsistemi contenenti lisozima

Attività del gruppo Microsfera (<http://www.callerio.org/micro1-i.htm>)

Nel corso del 2007 i microsistemi di alginato e chitosano, contenenti lisozima, precedentemente ingegnerizzati presso la Fondazione Callerio-Onlus, sono stati oggetti di studi *in vivo* nei seguenti campi applicativi: a) azione anti-invecchiamento e b) vaccinazione orale in acquacoltura. Inoltre, ha avuto luogo la: c) progettazione e costruzione di un impianto pilota per la produzione di microsistemi con tecnologia "coaxial driven".

a) azione anti-invecchiamento

I risultati conseguiti nella convalida delle proprietà scavenger anti-AGE (advanced glycation end-products o prodotti finali della glicosilazione avanzata) dei MS contenenti LZ hanno aperto delle prospettive di utilizzo dei MS come prodotto anti-invecchiamento. Per la validazione sperimentale dell'attività anti-invecchiamento del prodotto è stato condotto un test pre-clinico sul modello murino C57BL/6J. Accanto all'efficacia anti-invecchiamento in se, è stata verificata la dose-risposta del LZ microincapsulato ed il rapporto tra dimensioni ed efficacia dei MS in un modello preclinico.

Gli animali hanno subito un processo di invecchiamento accelerato mediante somministrazione giornaliera sottocutanea, per 7 settimane consecutive, di 50 mg/kg/die di D-galattosio. I trattamenti anti-aging sono stati condotti quotidianamente, mescolando al mangime in polvere i MS contenenti LZ, preparati mediante il processo di emulsione (3 µm), ME, e di nebulizzazione (30 µm), MN, alla dose di LZ di 50, 100 e 200 mg/kg/die. Dopo 7 settimane di trattamento, sui campioni di cute e siero sono state effettuate le seguenti analisi: a) livello di RAGE cutanei quantificato mediante tecniche di RT-PCR; b) quantificazione degli antiossidanti (total antioxidant status, TAS) a livello serico, che fornisce un quadro sistemico istantaneo dello stress da specie ossidanti, ed è, quindi,



correlabile al processo di invecchiamento. L'analisi a) ha dimostrato che: 1) gli animali sottoposti ad invecchiamento precoce mediante il D-galattosio (gruppo Gal) presentano livelli dell'espressione dei RAGE cutanei superiori rispetto agli animali sani; 2) i trattamenti con MS contenenti LZ, con entrambe le tipologie dimensionali (3 e 30 µm), sono in grado di ridurre i livelli di espressione dei RAGE rispetto al gruppo del controllo positivo (Gal); 3) l'induzione dell'invecchiamento accelerato ha avuto un riscontro positivo nell'aumento dei livelli di espressione di RAGE; 4) tale aumento di espressione dei RAGE viene prevenuto in 3 dei 5 gruppi di trattamento analizzati. L'analisi b) ha dimostrato che: 1) gli animali sottoposti ad invecchiamento precoce mediante il D-galattosio (gruppo Gal) presentano valori di TAS significativamente superiori rispetto agli animali sani ($p < 0,01$); 2) i trattamenti con i MS contenenti LZ sono in grado di ridurre significativamente i valori di TAS rispetto al gruppo del controllo positivo (Gal); 3) i trattamenti con i dosaggi di LZ medi ed alti, di entrambe le tipologie dimensionali di MS, sono in grado di controllare bene lo sviluppo di un lieve o moderato stress ossidativo nel modello pre-clinico utilizzato; 4) è possibile ridurre significativamente i valori di TAS rispetto al gruppo del controllo positivo (Gal) con entrambe le tipologie dimensionali di MS (3 e 30 µm)

b) vaccinazione orale in piscicoltura

E' in fase di svolgimento una prova di campo (200.000 pesci), effettuata dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (Teramo), che prevede l'utilizzo del nostro microsistema caricato con *Yersinia ruckeri* (batteri inattivati in formalina), una specie patogena che causa rilevanti perdite economiche alla piscicoltura. La vaccinazione viene effettuata sulla trota, il principale prodotto della piscicoltura italiana. Per effettuare questo studio, il gruppo Microsfera ha prodotto, con il prototipo artigianale del sistema produttivo del tipo "coaxial-air-driven", 120 g di MS.

c) progettazione e costruzione di un impianto produttivo per la produzione di microsistemi con tecnologia "airless spray-gun".

Per by-passare alcune problematiche riscontrate nel vecchio prototipo, si è reso necessario individuare dei sistemi produttivi alternativi. A tal scopo, sono state collaudate due tipologie di sistema produttivo primario: a) Spray-dryer; b) Spruzzatore airless. Le prove effettuate hanno evidenziato che il sistema di tipo airless, nell'ambito dei sistemi produttivi basati sulla spinta propulsiva dell'aria compressa, appare essere una tecnologia adeguata per aumentare la produttività e ridurre il numero di ore/uomo. Una volta individuato ed acquistato il core del sistema produttivo, si è proceduto con il completamento dell'impianto con opportuni sistemi complementari allo spruzzatore airless. La progettazione e la realizzazione dell'impianto produttivo completamente accessorizzato è stato un processo impegnativo, che si è articolato in più fasi e che ha richiesto la cooperazione di varie realtà commerciali e scientifiche del settore. L'impianto produttivo è stato completato con opportuni accessori per la produzione di microsistemi conformi al brevetto WO 2005/013941. Le prime prove effettuate hanno confermato che il sistema airless messo a punto è in grado di by-passare diverse problematiche produttive evidenziate con il prototipo del sistema coaxial air driven (ostruzione degli aghi attraverso cui viene nebulizzato il prodotto; flusso irregolare; scarsa portata del sistema; disagiata sistema di caricamento della feed solution). Ciò ha determinato una riduzione del numero di ore/uomo a parità di quantità di semilavorato, aumentando, allo stato delle cose, la produttività giornaliera effettiva da 12 g di prodotto a 80 g.

ATTIVITÀ DI RICERCA IN CONTO TERZI

Bioconiugati con acido ialuronico

Sono stati condotti studi, per conto dell'azienda EURAND, nell'ambito di una richiesta specifica di valutazione delle proprietà farmacologiche di bioconiugati con acido ialuronico e farmaci antitumorali in modelli di tumori sperimentali dei roditori, valutando l'efficacia e la tossicità di una serie di farmaci con HA di diverso peso molecolare e con diverso grado di sostituzione. I risultati hanno permesso di identificare le condizioni di base della natura molecolare dotata delle migliori proprietà antitumorali in modelli di tumori solidi murini e di xenotrapianti di tumori umani.

Biomateriali

Sono stati condotti studi, per conto dell'azienda SIGEA, nell'ambito di una richiesta specifica di valutazione delle proprietà infiammatorie di biomateriali impiantabili e impiegabili in medicina estetica e/o riparativa. Lo studio ha permesso di mettere a punto un sistema veloce e predittivo del potenziale infiammatorio acuto e cronico, impiegabile anche in futuro per selezionare i prodotti più adatti allo sviluppo.



Complessi di rutenio

Sono stati condotti studi, per conto dell'azienda ECLOSION, nell'ambito di una richiesta specifica di valutazione delle proprietà antitumorali in vitro ed in vivo di una piccola serie di complessi organometallici di rutenio contenenti acido etacrinico. Lo studio, condotto con l'obiettivo di valutare la possibilità di superare la resistenza ai farmaci di platino dovuta alla sovraespressione di GST delle cellule tumorali, ha mostrato che uno dei composti preparati è in grado di esercitare attività citotossica uguale o maggiore del cisplatino indipendentemente dalla condizione di resistenza o meno.

Pubblicazioni Scientifiche (copia in appendice)

I risultati riportati brevemente nel paragrafo precedente, sono stati organizzati in lavori scientifici pubblicati su riviste specialistiche a carattere internazionale e dotate di *Impact Factor*. I lavori sono il risultato dello svolgimento dei progetti di ricerca della Fondazione Callerio che, come si può dedurre dagli autori degli stessi, sono state condotte nell'ambito di strette collaborazioni con ricercatori di altre istituzioni.

- 1) Zorzin L, Cocchietto M, Voinovich D, Marcuzzi A, Filipovic-Grcic J, Mulloni C, Grembiale G, Casarsa C, Bulla R, Sava G. Lysozyme-containing chitosan-coated arginate microspheres for oral immunisation. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 16:413-420, 2006.
- 2) Grabnar I, Maggi L, Cocchietto M, Conte U, Voinovich D. Bioavailability of metoclopramide from a new chewing gum device. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 17:173-176, 2007.
- 3) Bergamo A, Sava G. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton Transactions*, 7:1267-1272, 2007.
- 4) Vock CA, Ang WH, Scolaro C, Phillips AD, Lagopoulos L, Juillerat-Jeanerret L, Sava G, Scopelliti R, Dyson PJ. Development of ruthenium antitumor drugs that overcome multidrug resistance mechanisms. *J. Med. Chem.* 50:2166-2175, 2007.
- 5) Griffith D, Bergamo A, Pin S, Vadori M, Muller-Bunz H, Sava G, Marmion CJ. Novel platinum pyridinehydroxamic acid complexes: synthesis, characterisation, X-ray crystallographic study and nitric oxide related properties. *Polyhedron* 26:4697-4706, 2007.
- 6) Scolaro C, Chaplin AB, Hartinger CG, Bergamo A, Cocchietto M, Keppler BK, Sava G, Dyson PJ. Tuning the hydrophobicity of ruthenium(ii)-arene (RAPTA) drugs to modify uptake, biomolecular interactions and efficacy. *Dalton Transactions*. 2007 Nov 14;(43):5065-72. Epub 2007 Sep 26.
- 7) Bratsos I, Bergamo A, Sava G, Gianferrara T, Zangrando E, Alessio E. Influence of the anionic ligands on the anticancer activity of Ru(II)-dmsO complexes: Kinetics of aquation and in vitro cytotoxicity of new dicarboxylate compounds in comparison with their chloride precursors. *J Inorg Biochem.* 2007 Oct 24 [Epub ahead of print].

Total Impact Factor: 15.636

Mean Impact Factor: 3.127

Min-Max Impact Factor: 1.843-5.115

Presentazioni orali e/o posters a convegni e congressi

1. **Research Workshop of the Israel Science Foundation and COST Working Group Meeting D39/0004/06.** Jerusalem, 14-17 April 2007. «Ruthenium complexes and tumour metastases» G. Sava.
2. **International Conference on Biological Inorganic Chemistry 13.** Vienna, 15-20 luglio 2007. «Ruthenium-based drugs and the selective control of solid tumour metastases» G. Sava.
3. **16th International Symposium on Microencapsulation.** Lexington, KY-USA. «Orally administered microencapsulated lysozyme in the early stage of diabetic nephropathy» L. Zorzin, M. Cocchietto, R. Candido, B. Fabris, B. Toffoli, and G. Sava.
4. **XI Seminario per Dottorandi in Farmacologia e Scienze Affini.** Siena, Certosa di Pontignano (Italia), 24-27 settembre 2007. «Effects of metal-based drugs on an in vitro simulation of the metastatic progression and in vivo in mice with mammary cancer» A. Masi.



5. **XI Seminario per Dottorandi in Farmacologia e Scienze Affini.** Siena, Certosa di Pontignano (Italia), 24-27 settembre 2007. «Dexamethasone hialuronan esters as novel bioconjugates in leukemia's pharmacological treatment» I. Crucil.
6. **COST Action D39 WG1-WG3 joint meeting.** Villars-sur-Ollon (Switzerland) 28-30 settembre 2007. «RhoA modulation with ruthenium drugs in mammary carcinoma cells» A. Bergamo.
7. **COST Action D39 WG1-WG3 joint meeting.** Villars-sur-Ollon (Switzerland) 28-30 settembre 2007. «Inappropriateness of DNA as target for metal-based drug selectivity» G. Sava.
8. **24° Congresso Nazionale della Società Italiana di Chemioterapia.** Verona, 25-28 novembre 2007. «RhoA modulation with ruthenium drugs in mammary carcinoma cells» G. Sava, A. Bergamo.
9. **X International Symposium on Platinum Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy.** Verona, 30 novembre – 3 dicembre. «Comparison of innovative metal-based drugs on the metastatic progression of breast cancer cells» A. Masi, A. Bergamo, L. Brescacin, G. Sava.
10. **X International Symposium on Platinum Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy.** Verona, 30 novembre – 3 dicembre. «Heavy metal compounds in cancer chemotherapy: are we going somewhere? Yes» G. Sava.

HIGHLIGHTS DELLE PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

Nel corso del 2007, alcune riviste sulle quali sono stati pubblicati articoli con i risultati delle ricerche svolte in toto o in parte nella Fondazione Callerio Onlus, hanno segnalato alcuni di questi come quelli tra i più letti o tra i più citati. Le citazioni specifiche vengono riportate di seguito.

Claudine Scolaro, Adrian B. Chaplin, Christian G. Hartinger, Alberta Bergamo, Moreno Cocchietto, Bernhard K. Keppler, Gianni Sava and Paul J. Dyson. Tuning the hydrophobicity of ruthenium(II)-arene (RAPTA) drugs to modify uptake, biomolecular interactions and efficacy. *Dalton Transactions*; 5065 - 5072; 2007. **Il 5° tra i dieci articoli più letti online nel mese di settembre 2007.**

Bergamo A, Sava G. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton Transactions*; (13): 1267-72; 7 Apr 2007; Epub 28 Feb 2007. **Il più popolare articolo di Dalton Transactions in marzo 2007 (778 accessi) e uno dei primi 10 nel mese di aprile 2007.**

Scolaro C, Geldbach TJ, Rochat S, Dorcier A, Gossens C, Bergamo A, Cocchietto M, Tavernelli I, Sava G, Rothlisberger U, Dyson PJ. Influence of Hydrogen-Bonding Substituents on the Cytotoxicity of RAPTA Compounds. *Organometallics*; 25:756-65; 2006. **Il primo tra i "Most-Cited Articles" nei mesi di Agosto-Settembre 2007 e il terzo articolo più citato tra quelli pubblicati su Organometallics nel 2006.**

Scolaro C, Bergamo A, Brescacin L, Delfino R, Cocchietto M, Laurency G, Geldbach TJ, Sava G, Dyson PJ. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. *J. Med. Chem.*; 48(12):4161-71, Jun 16 2005. **Secondo nei mesi di agosto-settembre 2007 tra gli articoli più citati di quelli pubblicati dalla rivista Journal of Medicinal Chemistry nel 2007.**



ATTIVITA' FORMATIVA

Sostegno per la frequenza a Dottorati di Ricerca

Nell'ambito di collaborazioni di ricerca, la Fondazione Callerio ha sostenuto l'onere di contribuire borse di studio a giovani neolaureati, risultati idonei per la frequenza della Scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche, Scuola di Dottorato interuniversitaria con sede amministrativa presso l'Università di Padova.

In particolare, nel corso del 2007 è stata data una borsa a:

Dott. Ilaria Crucil (Attività antitumorale di bioconiugati di acido ialuronico) per il 2° anno di corso del XXI ciclo del corso Dottorato in dottorato in Farmacologia, Tossicologia e Terapia.

Discussione di tesi di dottorato.

La **dott. Federica Finetti** ha conseguito il titolo di Dottore di Ricerca in Medicina Molecolare, Scuola di dottorata attivata presso l'Università di Siena (tutore la prof. M. Ziche del Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Siena) discutendo la tesi "Infiammazione, progressione tumorale e angiogenesi: ruolo della ciclo-ossigenasi", una ricerca svolta con il contributo della Fondazione Callerio Onlus che, nell'ambito del progetto "MADE", ha sostenuto i costi della borsa di studio per la frequenza al dottorato.

La **dott. Chiara Garrovo** ha conseguito il titolo di Dottore di Ricerca in Farmacologia, Chemioterapia e Microbiologia, presso l'Università di Trieste (tutore il prof. G. Sava e co-tutore la prof. S. Zorzet del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Trieste) discutendo la tesi "Targeting selettivo di chemioterapici antitumorali diretti specificatamente verso recettori di membrana", una ricerca svolta con risorse messe a disposizione dalla Fondazione Callerio Onlus e derivanti da contratti di ricerca riportati nelle relazioni degli anni 2004-2006 sotto il tema "HA-But" oppure "Bioconiugati con acido ialuronico".

La **dott. Laura Brescacin** ha conseguito il titolo di Dottore di Ricerca in Farmacologia e Tossicologia, Terapia Intensiva e Rianimativa, presso l'Università di Padova (tutore il prof. G. Sava del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Trieste e co-tutore la dott. A. Bergamo della Fondazione Callerio) discutendo la tesi "Modulazione di mediatori determinanti per la progressione metastatica con il complesso di rutenio NAMI-A", una ricerca svolta interamente nella Fondazione Callerio Onlus e che sta alla base del progetto "MADE".

La **dott. Claudine Scolaro** ha conseguito il titolo di PhD in Chimica presso il Dipartimento di C dell'EPFL, di Losanna, Svizzera, il giorno 09 agosto 2007, presente il prof. Sava in qualità di esaminatore, discutendo con il relatore prof. PJ Dyson la tesi "Structure-activity relationships for ruthenium(II)-arene drugs. In vitro and in vivo antitumour evaluation" la cui parte biologica è stata svolta interamente presso i laboratori della Fondazione Callerio in occasione di numerosi soggiorni di studio..

Organizzazione di convegni-congressi

E' stato organizzato il Working Group meeting del WG3 (COST D39), in associazione con il WG1, a Villars-sur-Ollon in Svizzera nei giorni 28-30 settembre 2007. Al meeting congiunto, sponsorizzato interamente dal COST, hanno partecipato globalmente 27 ricercatori di 11 diverse nazioni (si veda la foto più avanti).

Il programma delle giornate è stato il seguente:

COST D39/ Working Group Meeting

Villars, September 28th to 30th 2007

Eurotel Victoria, Villars-sur-Ollon

Local Organiser: Prof. Paul J. Dyson

PROGRAMME

Guest arrival: evening Sept. 28



Friday, September 28th 2007

19.00 – 20.00 Opening and Welcome by Roger Alberto and Gianni Sava

Saturday, September 29th 2007

Chair: Roger Alberto

09.00 - 09.20 **Jose Estrela** (Uni-Valencia, Spain): “Tumoricidal activity of the vascular endothelium and the survival of metastatic cells with high glutathione content”

09.20 - 09.40 **Nigel Bird** (Uni-Sheffield, UK) “Harvesting of cells from Human Liver for studies into Colorectal Liver Metastasis”

09.40 - 10.00 **Ciriaco Carru** (Uni-Sassari, Italy) “Influence of NAMI-A on reduced and oxidized glutathione levels in human transformed endothelial cells”

10.00 - 10.20 **Tamara Lah** (NIB, Slovenia) “Proteases and their role in cell-matrix interaction”

Chair: Tamara Lah

11.00 - 11.20 **Alberta Bergamo** (Callerio, Italy) “RhoA modulation with ruthenium drugs in mammary carcinoma cells”

11:20 - 11.40 **Anne E. Lykkesfeldt** (Institute of Cancer Biology, Denmark) “Reduced expression of Bcl-2 in antistrogen resistant breast cancer cells plays a role in sensitizing the cells to cisplatin treatment”

11.40 - 12.00 **Matthias Tacke**, (The UCD School of Chemistry and Chemical Biology, Ireland) “Novel Titanocene Anticancer Drugs”

12.00 - 12.20 **Gianni Sava** (Callerio, Italy) “Inappropriateness of DNA as target for metal-based drug selectivity”

Chair: Nils Metzler-Nolte

14.00 – 14.20 **Johannes Eble** (Uni-Muenster, Germany) “Integrins as targets to manipulate cell-matrix interactions”

14.20 – 14.40 **Julian Carretero** (Uni-Valencia, Spain) “Gene expression adaptations in surviving metastatic melanoma cells during their interaction with the vascular endothelium”

14.40 – 15.00 **Thomas Huhn** (Fachbereich Chemie der Universitaet Konstanz Germany) “Fluoro vs. Chloro Titanocenes – Studied of Cytotoxicity in Different Cell-Lines”

15.00 – 15.20 **João Galamba** (Instituto Tecnológico e Nuclear, Portugal) “New Re/Tc Organometallic Complexes with Pyrazoly-Based chelators for nuclear targeting”

15.20 – 15.40 **Christian Hartinger** (University of Vienna, Austria) “MS of Ub-anticancer Pt complexes: a top-down approach for characterization of the protein binding site”

Chair: Michael McGlinchey

16.00 – 16.20 **David Mangnall** (Uni-Sheffield, UK) “Metastatic Human Colorectal Cancer cells adhere preferentially to Human Endothelial Cells from the Liver”

16.20 – 16.40 **Anna Maria Posadino** (Uni-Sassari, Italy) “Effect of NAMI-A on intracellular signalling pathways in human transformed endothelial cells”

16.40 – 17.00 **Bastiaan Nuijen** (NKI, The Netherlands) “open”

17.00 – 17.20 **Thomas R. Ward** (University of Neuchâtel, Switzerland) “Artificial Metalloenzymes: From small molecule to DNA- or protein recognition”

17.20 – 17.40 **Judy Caddy** (Mintek, South Africa) “AuTEK Biomed - Finding Novel Biomedical Applications for Gold”

Sunday, September 30th 2007



Chair: David Mangnall

09.00 – 09.20 **Domenico Osella** (Uni- Alessandria, Italy) "Might Metal-Based Drugs Have a Role in the Anti-Telomerase Pharmacological Approach?"

09.20 – 09.40 **Gerard Jaouen** (ENSCP, France) "A new generation of efficient organometallic polyphenols for therapeutic purposes."

09.40 – 10.00 **Anne Vessieres** (ENSCP, France) "Latest investigation in the mechanism of action of ferrocifens and related compounds"

10.00 – 10.20 **Lucienne Cicurel** (Debiopharm Group, Lausanne, Switzerland) "Key issues in therapeutic uses of metal compounds"

10:20 – 10.40 **Lucienne Juillerat** (University Institute of Pathology, Lausanne, Switzerland) "Approaches to drug targeting and combination therapy"

Chair: Alberta Bergamo

11.00 – 11.20 **Guy Leclercq** (Institut Jules Bordet, Brussels) "Heavy metal-conjugated estrogens. Interaction modalities with estrogen receptor alpha"

11:20 – 11.40 **Roger Alberto** (University of Zürich) "New approaches to Tc- and Re-cyclopentadienyl complexes of amino acids"

11.40 – 12.00 **Mauro Ravera** (Uni- Alessandria, Italy) "Platinum(IV) Complexes as Hypoxia-Selective Cytotoxic Agents"

12.00 – 12.20 **Nils Metzler-Nolte** (Bochum, Germany) "Applications of metal-peptide bioconjugates to investigate the mechanism of metal-based drugs"

12.20 – 12.40 **Michael McGlinchey** (Dublin, Ireland) "Towards cobaltifens: the cyclobutadiene-cobalt analogues of ferrocifens"

12.40 – 13.00 **Paul J. Dyson** (EPF, Lausanne, Switzerland) "Organometallic Glutathione S-transferase inhibitors"

Chair: Roger Alberto and Gianni Sava

14.30 – 15.30 **Round table discussions + concluding remarks**



Villars-sur-Ollon

28-30 September 2007

Joint meeting COST D39, WG1 and WG3



1: Domenico Osella (I), 2: Marc Creus (CH), 3: Gerard Jaouen (F), 4: Roger Alberto (CH), 5: Anne Vessieres (F), 6: Joao Galamba (P), 7: Lucienne Cicurel (CH), 8: Lucienne Juillerat (CH), 9: Paul Dyson (CH), 10: Judy Caddy (ZA), 11: Thomas Huhn (D), 12: Alberta Bergamo (I), 13: Gianni Sava (I), 14: Matthias Tacke (IR), 15: Johannes Eble (D), 16: Thomas Ward (CH), 17: Anne Lykkesfeldt (DK), 18: Nils Metzler-Nolte (D), 19: Jose Estrela (E), 20: Nigel Bird (UK), 21: Julian Carretero (E), 22: Thibaud Rossel (CH), 23: David Mangnall (UK), 24: Christian Hartinger (A), 25: Mauro Ravera (I)

Partecipanti al Joint Working Group Meeting WG1/WG3

Aggiornamento e perfezionamento per ricercatori e borsisti

Dott. Alberta Bergamo

15-20 luglio 2007. Vienna. 13 ICBIC (International Conference of Biological Inorganic Chemistry)

24-27 settembre 2007. Certosa di Pontignano, Siena. XI° seminario nazionale per Dottorandi in Farmacologia e Scienze Affini.

28-30 settembre 2007. Villars-sur-Ollon (CH). COST D39 WG1-WG3 joint meeting.

30 novembre-3 dicembre 2007. Verona. X ISPC (International Symposium on Platinum in Cancer Chemotherapy).

Dott. Moreno Cocchietto

5 e 6 giugno 2007 - Susans di Majano - UD "Global Sales Strategies for Ambitious Italian Entrepreneurs".

9-12 settembre 2007. '16th International Symposium on Microencapsulation' - Lexington, KY-USA.

Dott. Laura Zorzin

5 e 6 giugno 2007. '16th International Symposium on Microencapsulation' - Lexington, KY-USA.

Dott. Ilaria Crucil

24-27 settembre 2007. Certosa di Pontignano, Siena. XI° seminario nazionale per Dottorandi in Farmacologia e Scienze Affini.

Dott. Alessia Masi

24-27 settembre 2007. Certosa di Pontignano, Siena. XI° seminario nazionale per Dottorandi in Farmacologia e Scienze Affini.



Soggiorni di studio di ricercatori in LINFA

Claudine Scolaro. Proveniente dal EPFL, Losanna, Svizzera. Dal 20 marzo al 11 aprile 2007.

Tesi di Laurea in Fondazione Callerio

I laboratori della Fondazione, in particolare LINFA con il progetto MADE (colture cellulari, preparazioni istologiche, e citometria a flusso) sono stati oggetto di frequenza da studenti della Facoltà di Farmacia dell'Università degli Studi di Trieste, sotto la guida di docenti di quelle Facoltà ed autorizzati alla frequenza nella Fondazione, per la messa a punto della tesi di laurea sperimentale. I ricercatori della Fondazione Callerio onlus sono stati direttamente responsabili dell'assistenza tutoriale al lavoro svolto da parte degli studenti, come risulta dalla firma apposta sulla tesi in qualità di correlatori.

Tesi di laurea interamente svolte nei laboratori della Fondazione Callerio Onlus

Laureanda: Lisa Tacco

Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Effects on tumour cell growth and invasion of salicylates used as ligands for the synthesis of platinum(II) complexes

Relatore Gianni Sava; Correlatori: Alberta Bergamo, Darren Griffith

Laureando: Daniel Era

Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Glutazione e cancro: relazione nei processi invasivi in cellule di tumore mammario

Relatore Gianni Sava; Correlatore: Alberta Bergamo

Laureanda: Aida Spezzacatena

Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Effetti antimetastatici di organometallici di rutenio in linee cellulari mammary con differente potenziale tumorigenico

Relatore Gianni Sava; Correlatori: Alessia Masi, Alberta Bergamo

Laureando: Massimo Pavone

Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Binding of the diarene complexes RM175 and AFAP51 to human serum albumin and influence on their in vitro cytotoxicity

Relatore Gianni Sava; Correlatori: Peter J. Sadler, Alberta Bergamo, Alessia Masi

Laureanda: Valentina Petri

Laurea Magistrale in Farmacia

RTK: nuovi target nella terapia antineoplastica

Relatore Gianni Sava; Correlatore: Alberta Bergamo

Tesi di laurea svolte in parte utilizzando i laboratori della Fondazione Callerio Onlus

Laureando: Veronica Candotto

Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Effetti del peptide antimicrobico umano β -defensina 2 sull'attività fagocitica di APC

Relatore: Sabrina Pacor; Correlatore: A. Tossi, L. Creatti

Laureando: Marco Pelin

Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Effetti della β -defensina umana hBD2 sulla produzione di ROS da parte di APC

Relatore: Sabrina Pacor; Correlatore: A. Tossi

Laureando: Rosar Giulia

Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Studio delle proprietà immunomodulatorie della β -defensina umana hBD2 nelle cellule dendritiche

Relatore: Sabrina Pacor; Correlatore: A. Tossi



APPENDICE