

CURRICULUM VITAE DEL PROF. MAURIZIO CERUTI

Maurizio Ceruti è nato a Torino nel 1955. Laureato in Chimica presso l'Università di Torino nel 1978 e successivamente in Farmacia, entrambe con 110, lode e dignità di stampa. Dal 2002 è Professore Ordinario del SSD CHIM09 (Farmaceutico Tecnologico Applicativo) presso la Facoltà di Farmacia dell'Università degli Studi di Torino. Maurizio Ceruti negli anni recenti è titolare degli insegnamenti di Tecnologie Farmaceutiche Avanzate, Biofarmaceutica e Farmacocinetica del Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche; Farmacocinetica e Metabolismo della Scuola di Specializzazione in Farmacia Ospedaliera; Chimica e Tecnologia Farmaceutica (Sostanze Dopanti e D'abuso, 2° modulo) del Corso di Laurea Magistrale in Chimica Clinica, Forense e dello Sport.

E' socio della Società Chimica Italiana, dell'ADRITELF, della Controlled Release Society Italiana e della Controlled Release Society Internazionale. Nel 1992, su invito dei Prof. W.D. Nes dell'Università del Texas e del Prof. E.J. Parish dell'Università dell'Alabama, è stato nominato membro della American Oil Chemists' Society e della New York Academy of Sciences.

L'attività scientifica, documentata da più di 200 pubblicazioni, la maggior parte su riviste internazionali ad elevato IF, e da brevetti, riguarda: inibitori della biosintesi del colesterolo e dell'ergosterolo come bersagli di farmaci ipocolesterolemici e antifungini; progettazione, sintesi e attività biologica di nuovi profarmaci e proinibitori enzimatici; farmacocinetica e metabolismo dei farmaci; veicolazione e direzionamento di farmaci e di profarmaci, nuovi sistemi liposomiali e nanoparticellari, al fine di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche di varie classi di farmaci, con un aumento del loro indice terapeutico. Recentemente ha ottenuto nuove squalenoil-nanomedicine aventi attività antitumorale più elevata dei farmaci parenti, talora anche con ampliamento del loro spettro d'azione e acquisizione di attività nei confronti di tumori precedentemente non sensibili.

Ha collaborato con importanti laboratori americani, europei e italiani, quali quelli dei Prof. Matsuda, Prof. Nes e Prof. Parish della Rice University (Texas, Stati Uniti), del Prof. Benveniste e del Prof. Schuber dell'Università di Strasburgo (Francia), del Prof. Poralla dell'Università di Tübingen (Germania), della Prof.ssa Filipello Marchisio del Centro di Eccellenza per la Biosensoristica tramite l'utilizzo di Organismi Vegetali e Microbici (CEBIOVEM) dell'Università di Torino, del Prof. Guarda della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino, del Prof. Pugliese dell'Istituto di Malattie Infettive della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Torino, del Prof. Viterbo e del Prof. Pogliani dell'Università della Calabria, del Prof. Castelli dell'Università di Catania, del Prof. Giammona dell'Università di Palermo, del Prof. Fresta dell'Università di Catanzaro, della Prof.ssa Paolino della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Catanzaro. Queste collaborazioni hanno portato a numerose pubblicazioni scientifiche in comune.

CONGRESSI E SIMPOSI

Nell'ambito della sua attività scientifica, Maurizio Ceruti ha partecipato a diversi congressi, riunioni scientifiche e simposi, sia nazionali che internazionali.

In particolare ha presentato relazioni orali o poster ai seguenti congressi e simposi:

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Organica, XIV Convegno Nazionale, S. Margherita Ligure (Ge), 2-6 ottobre 1983.

Société Chimique de France, Convegno Internazionale sugli Steroli, Journées du Gerli, Orsay, Francia, 7-8 marzo 1985.

American Oil Chemists' Society, Convegno Internazionale sugli Steroli, Champaign, Illinois, U.S.A., aprile 1985.

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Farmaceutica, V Convegno Nazionale, Rimini, 25 maggio 1985.

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Organica, XVI Convegno Nazionale, Urbino, 7-12 settembre 1986.

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Farmaceutica, VI Convegno Nazionale, Alghero (Ss), 14-18 ottobre 1986.

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Farmaceutica, XVI Congresso Nazionale "Bononiachem 88", Bologna, 9-14 ottobre 1988.

International Workshop on Medicinal Chemistry, Molecular Dynamics and Protein Structure, S. Miniato (Pi), 19-20 giugno 1989.

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Farmaceutica, Primo Congresso Congiunto Spagnolo-Italiano, Granada, Spagna, 19-22 settembre 1989.

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Farmaceutica, X Convegno Nazionale, S. Benedetto del Tronto (Ap), 30 settembre - 5 ottobre 1990.

American Chemical Society, 201st National Meeting: American Chemical Society Sponsored International Symposium on Sterol Biosynthesis Inhibitors as Agrochemicals and Pharmaceuticals, Atlanta, Georgia, U.S.A., 14-19 aprile 1991.

Società Italiana di Biochimica, 36° Congresso Nazionale, Ferrara, 10-13 settembre 1991.

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Farmaceutica, X Convegno Nazionale, Siena, 16-20 settembre 1991.

XI Congresso Internazionale "Drugs Affecting Lipid Metabolism", Firenze, 13-16 maggio 1992.

Gordon Research Conference "Frontieres of Science", Design, synthesis and evaluation of enzyme inhibitors and inactivators, Kingston, Rhode Island, U.S.A., 22-26 giugno 1992.

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Farmaceutica, XVII Congresso Nazionale "Januachem 92", Genova, 25-30 ottobre 1992.

American Chemical Society, 85th American Chemists' Society Annual Meeting and Ninth American Oil Chemists' Society Symposium on "regulation of isopentenoid biosynthesis and function", Atlanta, Georgia, U.S.A., 8-12 maggio 1994.

Società Italiana di Farmacologia, XXVII Congresso Nazionale, Torino, 25-29 settembre 1994.

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Farmaceutica, XI Convegno Nazionale, Bari, 2-5 ottobre 1994.

Società Botanica Italiana, 89° Congresso, Perugia, 3-6 ottobre 1994.

Società Chimica Italiana, Divisione di Chimica Farmaceutica, 2° Congresso Congiunto Italiano-Spagnolo, Ferrara, 30 agosto - 3 settembre 1995.

Società Italiana di Biochimica, 40° Congresso Nazionale, Torino, 12-15 settembre 1995.

Società Italiana di Biochimica, 10° Convegno Nazionale Proteine '95, Torino, 14-15 settembre 1995.

Simposio internazionale "Oxidosqualene cyclase: target enzyme for the development of new sterol biosynthesis inhibitors", Torino, 4 dicembre 1995.

Simposio internazionale: Yeast Lipid Conference, Graz, Austria, 17-18 maggio 1996.

XIII Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Paestum (Sa), 23-27 settembre 1996.

88th American Chemists' Society Annual Meeting, Seattle, Washington, U.S.A., 11-14 maggio 1997.

Primo Congresso Congiunto Italiano-Svizzero di Chimica Farmaceutica, Torino, 23-26 settembre 1997.

XIV Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Salsomaggiore Terme (Pr), 21-25 settembre 1998.

90th American Oil Chemists' Society Annual Meeting, Orlando, Florida, U.S.A., 9-12 maggio 1999.

39° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Montecatini Terme (Pt), 26-28 maggio 1999.

26th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Boston, MA, U.S.A., 20-25 giugno 1999.

FEBS Advanced Course. Yeast lipids: metabolism and intracellular transport, Utrecht, Olanda, 22-25 settembre 1999.

Congresso Internazionale: Drug Delivery for the Third Millennium, Pisa, 10-12 ottobre 1999.

XVII Simposio A.D.R.I.T.E.L.F., la Ricerca Tecnologica Innovativa nello Sviluppo di Medicinali, Catania, 4-7 ottobre 2000.

4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Firenze, 8-11 aprile 2002.

93rd American Oil Chemists' Society Annual Meeting, Montreal, Quebec, Canada, 5-8 maggio 2002.

XVI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Sorrento (Na), 18-22 settembre 2002.

43° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Perugia, 11-13 giugno 2003.

44° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 19-21 maggio 2004.

45° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 15-17 giugno 2005.

15° International Symposium on Microencapsulation. Parma, 18-21 settembre 2005.

International Symposium 2nd Trends in Medical Mycology. Berlino, Germania, 23-26 ottobre 2005.

47° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 13-15 giugno 2007

6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Barcellona (Spagna) 7-10 Aprile 2008

XII Workshop on apoptosis in Biology and Medicine, Parghelia (Vibo Valentia), 20-22 Maggio 2009

49° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 10-12 giugno 2009

CRS International 36th Annual Meeting, Copenhagen, 18-22 luglio 2009

Simposio Polymerfest, Palermo, 30 Agosto-2 Settembre 2009

XXI Simposio A.D.R.I.T.E.L.F., Veicolazione dei farmaci: aspetti tecnologici innovativi, Cagliari, 10-13 Settembre 2009

50° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 9-11 giugno 2010

Convegno Materiali polimerici per dispositivi medici impiantati. Alessandria, 3 Marzo 2011

51° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 8-10 giugno 2011

XXII Simposio ADRITELF. Firenze 13-16 Settembre 2012

ATTIVITÀ SCIENTIFICA

L'attività scientifica di Maurizio Ceruti si è indirizzata verso i temi fondamentali della tecnologia farmaceutica, con particolare riferimento alla progettazione di nuovi profarmaci e proinibitori enzimatici, alla farmacocinetica, al metabolismo, alla veicolazione ed al direccionamento dei farmaci.

Le principali linee di lavoro di Maurizio Ceruti sono suddivise fondamentalmente in due orientamenti di ricerca:

- 1) nuovi profarmaci e proinibitori enzimatici: progettazione, sintesi, metabolismo ed attività biologica;
- 2) veicolazione e direccionamento di farmaci e di profarmaci: nuovi sistemi liposomiali e nanoparticellari.

Le principali ricerche possono essere così riassunte:

Nuovi profarmaci e proinibitori enzimatici: progettazione, sintesi, metabolismo ed attività biologica

Sono state sviluppate varie serie di proinibitori enzimatici, con due scopi principali:

- 1) per fornire delucidazioni sul meccanismo di ciclizzazione dello squalene e dello squalene epossido da parte delle varie ciclasi;
- 2) per ottenere nuovi composti con specifica attività ipocolesterolemica, antifungina o antiprotozoaria.

La 2,3-ossidosqualene ciclasi è un enzima chiave nella ciclizzazione dello squalene a lanosterolo nei funghi e negli animali ed a cicloartenolo nei vegetali superiori, attraverso la formazione di un intermedio, il 2,3-ossidosqualene.

La ciclizzazione enzimatica dello squalene epossido da parte della 2,3-ossidosqualene ciclasi nei mammiferi, nei funghi e nei vegetali (schema 1) si può separare idealmente in tre stadi distinti:

- 1) l'apertura catalizzata da acidi dell'anello epossidico del 2,3-ossidosqualene 7 ad opera di un residuo acido presente nel sito attivo dell'enzima;

- 2) la ciclizzazione del substrato in conformazione sedia-barca-sedia attraverso vari intermedi carbocationici, che portano al carbocatione tetraciclico al carbonio 20 o ione protosterile 9;

- 3) il riarrangiamento finale a lanosterolo 11, mediante una migrazione sequenziale di idruri e di metili.

Questo stadio presenta un'estrazione terminale di un protone dall'atomo di carbonio in 9 del catione lanosterile 10 da parte di un gruppo basico o nucleofilo dell'enzima, con la formazione del lanosterolo, mentre nei vegetali si forma il cicloartenolo.

Schema 1

La squalene-hopene ciclasi lega lo squalene 1 in conformazione tutta a sedia e la ciclizzazione dello squalene inizia con la protonazione di uno dei doppi legami terminali da parte di un residuo elettrofilo dell'enzima. La ciclizzazione procede attraverso un diverso ripiegamento del substrato, dando un catione pentaciclico, il catione hopile 5, che perde successivamente il protone in 29 senza il riarrangiamento finale, dando come prodotto principale l'hopene 6.

Nei vegetali sono presenti vari metaboliti secondari a struttura triterpenoide, molti dei quali hanno origine dalla ciclizzazione dello squalene epossido 7 da parte della lupeolo sintasi. Questo enzima ciclizza il substrato attraverso una serie di carbocationi conformazionalmente rigidi, formando lo ione dammarenile 13a o 13b. Questo intermedio chiave può avere molti destini, come il riarrangiamento ai cationi baccarenile 14, lupile 15, fino al prodotto finale, il lupeolo 16. Nella sintesi dei triterpeni pentaciclici come il lupeolo 16, la configurazione del precursore, lo ione dammarenile, fino a poco tempo fa era sconosciuta, in quanto non si sapeva se la catena laterale in 17 ha la configurazione α , come in 13a o β , come in 13b.

Una strategia generale per ottenere nuovi, potenti inibitori della ossidosqualene ciclasi, che è stata applicata per la prima volta, è stata quella di mimare i carbocationi visti, che possono essere considerati analoghi di intermedi ad alta energia (HEI) legati all'enzima. Sostituendo l'atomo di carbonio carico positivamente in un substrato opportuno con un atomo di azoto, si possono ottenere simili specie cariche.

Inizialmente è stata focalizzata l'attenzione sul meccanismo d'apertura dell'anello epossidico, che inizia mediante l'attacco elettrofilo di un protone sullo squalene epossido 1, con la formazione di una serie di dipoli, portando al C-2 carbocatione 2. Per mimare questo carbocatione transiente, sono state sintetizzate

varie serie di molecole, il cui capostipite è il 2-aza-2,3-diidro-squalene. È stata studiata la loro azione in vitro sulle ossidosqualene ciclastasi di diverse origini (microsomi o enzimi purificati di fegato di ratto, fegato di maiale, piante superiori e lieviti) e in vivo su topi, piante superiori, lieviti e funghi. Molti di questi composti sono risultati dei potenti inibitori della ossidosqualene ciclastasi con una IC₅₀ da 0.15 a 16 μM.

In seguito sono stati modificati gli azasqualeni ed i corrispondenti Nossidi: 1) saturando il sistema a doppi legami del carrier squalenico; 2) introducendo un gruppo ammonico quaternario; 3) accorciando la catena alchilica satura; 4) diminuendo la lipofilia come nelle serie dei bisazasqualeni e dei bis-azasqualeni; 5) introducendo un gruppo addizionale ammonico o trialchilammonio o N-ossido. Si può concludere che lo scheletro squalenico è il carrier più favorevole e che l'attività diminuisce nell'ordine: squalene > dodecile > squalano.

Nella ricerca di nuovi inibitori con maggiore rassomiglianza strutturale con lo stato di transizione tipo S_N2 che si formerebbe durante l'apertura dello squalene epossido, è stata sintetizzata la squalene N-metilossaziridina e una serie di derivati. Essa possiede un'affinità strutturale con la squalene aziridina ottenuta da Corey, anch'essa un potente inibitore della ciclastasi.

Si è riusciti ad eliminare l'attività sulla squalene epossidasi, senza variare l'attività sulla ossidosqualene ciclastasi, introducendo nella struttura del 2-aza-2,3-diidro-squalene un gruppo polare come un epossido o un idrossile. Il 22,23-eossi-2-aza-2,3-diidro-squalene è risultato un potente antimicotico, presumibilmente per inibizione della 2,3-ossidosqualene ciclastasi fungina. I test, condotti su 50 isolamenti di vari dermatofiti, hanno fornito una MIC media di 3 μg ml⁻¹ simile a quella dei principali azoli che hanno MIC comprese tra 0.58 e 135 μg ml⁻¹.

Sono state studiate la tossicità, la farmacocinetica, il metabolismo e la biodistribuzione di vari derivati azasqualenici e dei cloridrati nel topo, somministrandoli per via endovenosa, intraperitoneale e orale.

In seguito sono stati mimati gli intermedi carbocationici conformazionalmente rigidi, come i carbocationi al C-8 e al C-20, progettando i corrispondenti derivati azasqualeni aciclici. Gli azasqualeni aciclici, essendo conformazionalmente più flessibili dei corrispondenti derivati ciclici, non dovrebbero interferire con altri enzimi della biosintesi degli steroli, come la *8-*7 sterolo isomerasi o la *14 sterolo demetilasi che talora sono inibite dagli inibitori ciclici azasqualenoidi.

I primi azasqualeni aciclici interni sono stati l'analogo al C-8 carbocatione, il (6E)-10-aza-10,11-diidro-squalene 2,3-eossido e il derivato (6Z). Solo il derivato (6E) è risultato attivo in tutti i sistemi biologici provati, confermando la sua potenza e selettività.

Il passo successivo è stata la sintesi di azasqualeni aciclici che mimano l'intermedio carbocationico al C-20, come il 19-aza-18,19,22,23-tetraidro-squalene 2,3-eossido e derivati. Il 19-aza-18,19,22,23-tetraidro-squalene 2,3-eossido è risultato un inibitore più selettivo del (6E)10-aza-10,11-diidro-squalene 2,3-eossido e del 2-aza-2,3-diidro-squalene, in quanto ha inibito specialmente la ciclastasi di mammifero, piuttosto di quella di lievito o di piante superiori.

Pertanto è stato confermato che gli azasqualeni interni, aventi la corretta geometria E e un gruppo epossidico terminale, mimano i corrispondenti intermedi ad alta energia che si formano durante la ciclizzazione dello squalene epossido. Questa è un'evidenza diretta degli studi di Ruzicka, Cornforth e Van Tamelen, che postulano la ciclizzazione dello squalene epossido, correttamente ripiegato, a triterpeni tetra- o pentaciclici, mediante la formazione di una serie di intermedi carbocationici conformazionalmente rigidi dal C-2 al C-20.

In seguito, sono state ottenute altre serie di inibitori dei due enzimi bersaglio, che hanno mostrato vari gradi di selettività. Dei derivati più significativi, sono state studiate in modo approfondito le attività inibitorie e le cinetiche di inibizione.

Mediante una sintesi stereospecifica, è stato ottenuto l'eossi viniletere bioisostero dello squalene epossido. Il viniletere dovrebbe dare, dopo essere riconosciuto dall'enzima e ciclizzato, il carbocatione al carbonio 20, il quale potrebbe essere stabilizzato attraverso la formazione di uno ione ossenio. Quest'ultimo potrebbe interagire con un nucleofilo presente nel sito attivo dell'enzima, dando un legame covalente. Invece, il viniletere è risultato un debole inibitore competitivo su microsomi di fegato di ratto, con un'affinità per l'enzima analoga a quella del substrato. Abbiamo controllato se si formavano prodotti di biociclizzazione, ma a causa della scarsa resa nella biociclizzazione, non siamo riusciti ad identificarli, dato avevamo il derivato marcato.

Due anni dopo Corey, utilizzando lo stesso metodo di sintesi, ha ottenuto l'inibitore triaziato (l'unica differenza era un doppio legame in 22,23, irrilevante ai fini della ciclizzazione) e l'ha incubato con la ciclastasi. Sorprendentemente, ha ottenuto il 17-acetil derivato tetraciclico dello ione protosterile, in cui il trizio occupava la posizione □.

Questo composto gli ha permesso di dimostrare che il catione protosterile, che si forma durante la biociclizzazione dello squalene epossido, ha la catena laterale in 17 \square e non in 17 \square come si riteneva fino ad allora. In questo modo, per la successiva trasformazione a lanosterolo, è sufficiente una rotazione di 60° della catena laterale, per permettere il riarrangiamento di metili e di idruri, e non di 120° come si riteneva prima. Inoltre, in uno studio successivo con lo stesso inibitore triziato, Corey ha identificato un derivato triciclico che si forma come prodotto secondario della biociclizzazione, il che ha permesso di modificare ulteriormente il meccanismo di ciclizzazione dello squalene epossido. Durante la biociclizzazione si formerebbe il carbocatione esociclico intermedio secondo la regola di Markovnikow, che mediante un'espansione di anello, possibile per la stabilizzazione da parte dell'enzima, porterebbe al carbocatione endociclico, anti-Markovnikow.

Nella ricerca di inibitori più specifici della ciclasi di lievito, capaci di entrare e modificare il sito attivo dell'enzima, sono stati progettati nuovi derivati con gruppi reattivi verso i tioli. Sono state sintetizzate serie di potenziali inibitori irreversibili della ossidosqualene ciclasi aventi uno scheletro squalenico o dodecilico. Questi consistevano in inibitori tipo Michael, come la squalene maleimide e il nitrile *,*-insaturo o inibitori tipo Ellman come i derivati 2-nitro-5-ditiobenzoile e 2-ditiopiridile. I derivati maleimidici sono risultati gli inibitori più attivi verso la ciclasi di mammifero, seguiti dai derivati tipo Ellman.

Nell'esaminare l'inattivazione tempo-dipendente di questi composti, seguendo l'incubazione con l'enzima di mammifero, soltanto la squalene maleimide è risultata un inibitore irreversibile. Questi risultati hanno confermato la presenza di diversi gruppi tiolici essenziali per l'attività della ossidosqualene ciclasi di mammifero.

In seguito sono state sintetizzate nuove serie di inibitori per suicidio della 2,3-ossidosqualene ciclasi con gruppi reattivi. In particolare, i derivati dello squalene epossido sostituiti in posizione 19 con una funzione acetilenica o allenica, dovrebbero essere riconosciuti e ciclizzati dall'enzima bersaglio agendo da pro-inibitori o, nel caso di formazione di un legame irreversibile, da inibitori per suicidio.

Il meccanismo di inibizione sulla ciclasi di mammifero coinvolge la ciclizzazione iniziale al catione 21-metilideneprotosterile, catione questo che può dare le usuali migrazioni di idruri e di metili e la perdita di un protone ad un analogo del lanosterolo, oppure può essere catturato da un residuo nucleofilo presente nel sito attivo enzimatico e dare una concomitante inattivazione irreversibile dell'enzima.

Alla luce di queste considerazioni, sono stati sintetizzati diversi analoghi dello squalene epossido con gruppi reattivi nella posizione 19, allo scopo di ottenere inibitori selettivi delle varie ciclasi. In particolare, i derivati sostituiti in 19 con una funzione eninica coniugata, data l'elevata somiglianza strutturale con lo squalene epossido, dovrebbero essere riconosciuti dall'enzima bersaglio ed agire da pro-inibitori o, nel caso di formazione di un legame irreversibile, da inibitori suicidi.

Per quanto riguarda l'attività biologica degli acetileni, è stata trovata una IC₅₀ di 50 \square M, nei derivati alchilati e di 25 \square M in quelli non alchilati. Inoltre è stata valutata l'irreversibilità, ottenendo una diminuzione dell'attività enzimatica nel tempo, a concentrazioni da 50 \square M a 100 \square M.

Dato che gli acetileni sono risultati poco attivi, sono state progettate sintesi regiospecifiche e stereospecifiche di derivati 29-metilidenici, come il (18Z) e il (18E)-29-metilidene-2,3-ossidosqualene, i (18Z) e (18E) esanor derivati, il derivato (18E)-nor, il 18,19-diidro derivato e il derivato troncato.

Nella serie non troncata, il composto più attivo sull'enzima animale e di lievito è risultato l'isomero Z, mentre l'isomero E è risultato circa 10 volte meno attivo. Considerando i due isomeri esanormetilidenici, si nota una completa inversione dell'attività regiospecifica. In questo caso, l'isomero più attivo è risultato il derivato trans, con una IC₅₀ di 1.5 \square M nel lievito mentre l'isomero cis è risultato dieci volte meno attivo. Quando la funzione dienica è stata eliminata mediante idrogenazione regiospecifica del doppio legame in 18,19, l'attività è stata praticamente annullata (la IC₅₀ è passata da 0.4 a >100 \square M).

Sulla ciclasi di fegato di maiale, è stata osservata un'inattivazione tempo-dipendente, quando l'enzima è stato incubato con l'esanormetilidene trans a concentrazioni 5 \square M, 10 \square M e 50 \square M. L'attività residua dell'enzima è stata determinata prelevando, in tempi differenti, aliquote di 25 \square l e diluendole poi ad un volume finale di 1 ml, in presenza del substrato.

Le differenze tra gli isomeri cis e trans della serie esanormetilidenica, sono state ancora più marcate sulla ciclasi di lievito. In questo caso, la costante di inattivazione di secondo ordine dell'isomero trans è stata 100 volte più elevata di quella dell'isomero cis, mostrando che solo l'isomero trans si è comportato come un inibitore irreversibile.

Per verificare se l'inibizione tempo-dipendente fosse dovuta ad una modificazione covalente della ciclasi di lievito da parte del trans-metilidene, l'enzima, dopo preincubazione con l'inibitore per 20 min o per 1 h, è stato fatto passare in una colonna a scambio ionico di dietilamminosefariosio (DEAE). Questo metodo ha permesso di dimostrare che il trans-esanormetilidene è un vero inibitore irreversibile della ciclasi.

Quindi, il trans-esanormetilidene è risultato il primo potente inibitore irreversibile della ciclasi di lievito, circa 15 volte più attivo sull'enzima di lievito rispetto a quello animale, come evidenziato dalle costanti di inattivazione di secondo ordine.

Abbiamo supposto che un residuo nucleofilo dell'enzima, capace di interagire con il catione protosterile, o vicino ad esso reagisca con il trans-esanormetilidene. In effetti, Corey un anno dopo questo lavoro, ha trovato che il residuo di istidina 234 dell'enzima di lievito è responsabile dell'interazione irreversibile con una miscela dei due isomeri cis e trans esanormetilidene, da lui ottenuta mediante una sintesi non stereoselettiva. Attraverso esperimenti di mutagenesi sito diretta in *S. cerevisiae*, egli ha inoltre individuato il residuo di istidina 146 che, protonato a pH fisiologico, aumenta l'acidità dell'aspartato 456. Inoltre, dopo la formazione del catione protosterile, il residuo di istidina in forma non protonata potrebbe essere l'accettore del protone nel passaggio finale della biosintesi del lanosterolo, permettendo la rigenerazione dell'enzima nella sua forma iniziale.

In conclusione, le sintesi stereospecifiche delle due coppie di isomeri geometrici hanno fornito derivati con attività potente e specifica come inibitori irreversibili delle ciclasi. Inoltre, questi composti si sono rivelati dei buoni modelli per chiarire il ruolo di alcuni amminoacidi presenti nel sito attivo dell'enzima, coinvolti nel processo di ciclizzazione dello squalene epossido.

Un altro enzima di cui mi sono occupato è la squalene epossidasi, che è responsabile dell'ossidazione stereospecifica dello squalene a squalene-2,3-epossido. Di questo enzima, non si conosce molto, eccetto che non è citocromo P-450 dipendente, e che per l'attività richiede ossigeno, NADPH e FAD.

Dato che molti enzimi flavinici sono inattivati da derivati acetilenici o allenici, attraverso la formazione di intermedi altamente reattivi che possono reagire con un nucleofilo dell'enzima, sono stati sintetizzati derivati acetilenici ed allenici dello squalene, come inibitori della squalene epossidasi. I derivati sono l'acetilene, il metilacetilene, il metilallene e gli analoghi bifunzionalizzati alle due estremità della struttura squalenica. L'attività inibitoria è risultata specifica verso la squalene epossidasi di microsomi di fegato di ratto, in quanto non hanno inibito l'amminopirina Ndemetilasi, una reduttasi citocromo P-450 dipendente. Il derivato bifunzionalizzato con una funzione allenica è risultato l'inibitore più potente della serie verso la squalene epossidasi, con una IC50 di 50 μ M. Questo suggerisce che l'eossidazione enzimatica, possa avvenire simmetricamente alle due unità isopreniche terminali dello squalene, come esemplificato dall'eossidazione dello squalene a 2,3;22,23-diepossido.

Successivamente, abbiamo sintetizzato una serie di derivati Zfluorosqualenici, come inibitori dell'eossidasi. È stato trovato da studiosi americani che il bis-nordifluorosqualene, avente due atomi di fluoro al posto dei due metili terminali dello squalene è un inibitore potente dell'enzima, mentre vari monofluorometil e difluorometil derivati con isomeria E sono inattivi. Per vedere se la scarsa attività era dovuta alla geometria E, è stata ottenuta una serie di fluorosqualeni con isomeria Z. I nuovi metodi sintetici, ove era presente isomeria geometrica, hanno fornito un rapporto dell'isomero Z rispetto a quello E di circa 93:7.

Questi sono stati testati sull'eossidasi di fegato di ratto, di maiale e dei lieviti *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. I derivati sono risultati praticamente inattivi: solo l'esafluorosqualene epossido ha inibito l'eossidasi di lievito, con una IC50 di 150 μ M.

Questo indica che solo atomi di fluoro legati direttamente a un doppio legame terminale dello squalene riescono a diminuire sufficientemente la densità elettronica sul doppio legame, in modo da inibire l'eossidasi che sembra agire con un meccanismo ossidativo elettrofilo.

Per questi studi sugli inibitori della biosintesi degli steroli sono stati utilizzati dei precursori marcati, in particolare squalene epossido triziato per la ciclasi, e squalene triziato per l'eossidasi, ottenuti direttamente con un nuovo metodo di sintesi e non per conversione microbiologica da acetato marcato, come lo squalene che si trova in commercio a bassa radioattività specifica.

Con i nuovi metodi sintetici e di purificazione, appositamente sviluppati per i derivati marcati, lo squalene e lo squalene epossido marcati sono stati ottenuti con alta radioattività specifica ed elevata resa radiochimica.

Lo squalene triziato ci ha inoltre permesso di approfondire il meccanismo della squalene epossidasi. Questo è l'unico enzima flavoproteico che catalizza l'eossidazione di un'olefina.

Per testare la possibilità di un meccanismo catalitico basato su un metallo non emico, è stata studiata la conversione dello squalene triziato in epossido, sull'eossidasi parzialmente purificata di fegato di maiale. Le eossidazioni di alcheni catalizzate da metalloenzimi, in genere avvengono con uno scambio del protone vinilico. È stato studiato se veniva scambiato l'idrogeno in 3 e quindi l'eossidazione era catalizzata da un metalloenzima.

Durante l'ossidazione enzimatica dello squalene, non si è osservato nessun scambio dell'idrogeno marcato, che si ritrova tutto nel lanosterolo. Questo esclude che l'eossidazione sia catalizzata da un metalloenzima e quindi la specie che trasferisce l'ossigeno attivo sembra essere un idroperossido flavinico.

Di alcuni dei derivati più significativi sono stati condotti studi di analisi strutturale e conformazionale mediante tecniche di risonanza magnetica nucleare, spettrometria di massa e calcoli di meccanica molecolare.

Questi studi mostrano che nella parte centrale dello scheletro squalenico è presente una struttura relativamente rigida, mentre allontanandosi dalla parte centrale, la mobilità aumenta. I modelli proposti spiegano la reattività selettiva dei terminali mobili rispetto alla parte centrale più rigida che è protetta da questi terminali della molecola. I calcoli di meccanica molecolare e di dinamica molecolare condotti in assenza e in presenza del solvente sono in accordo con i dati sperimentali.

Per ottenere i nuovi inibitori, sono stati sviluppati nuovi metodi sintetici, che utilizzano particolari sintoni. Ricordandone qualcuno, è stato sviluppato un nuovo metodo per ottenere le aldeidi squalenoidi C17 e C22 epossidi e l'aldeide C27. Questo si basa sul taglio diretto degli epossidi dello squalene con acido periodico in etere etilico, metodo che viene ora usato correntemente in letteratura. Altri metodi, coadiuvati da calcoli di meccanica molecolare e di dinamica molecolare in presenza del solvente, si basano sulla protezione selettiva delle aldeidi squaleniche come diossolani, consentendo una regiospecificità dell'eossidazione sul doppio legame terminale dei derivati dello squalene.

Inoltre è stato sviluppato un metodo di omologazione dei composti carbonilici via 1,4-benzoditiazoloni. Questa nuova procedura è stata menzionata nel capitolo relativo alla reazione di Wittig del trattato di chimica organica: March, *Advanced Organic Chemistry*.

Nella sintesi degli inibitori, particolare attenzione è stata rivolta allo sviluppo e alla messa a punto di sintesi di Wittig e Horner-Wittig, finalizzate a sintesi stereospecifiche. La separazione degli intermedi diastereoisomeri *-fosfinoalcoli, *-trimetilsililalcoli, *-alchilalcoli, seguita da una reazione di eliminazione, ha permesso di ottenere i due isomeri cis/trans o Z/E completamente privi dell'altro isomero. In altri casi, come nella sintesi dei Zfluorosqualeni, una reazione tipo Wittig ha fornito direttamente l'isomero Z. Altre metodiche hanno consentito di ottenere con rese elevate lo squalene e lo squalene epossido triziati.

Riconoscimenti ottenuti in ambito scientifico internazionale

Il meccanismo d'azione e l'attività dei nuovi inibitori e pro-inibitori enzimatici hanno riscosso interesse da parte di studiosi stranieri:

- come antifungini, R.S. Burden, D.T. Cooke e G.A. Carter, *Phytochemistry* 28, 1791-1804 (1989);
- come ipocolesterolemici, J.L. Adams e B.W. Metcalf, Hansch, *Comprehensive Medicinal Chemistry* 2, 333-364 (1990);
- come antifungini, A. Polak e P.G. Hartman, *Progress in Drug Research* 37, 181-269 (1991);
- come probes per dimostrare il meccanismo di ciclizzazione dello squalene epossido, E.J. Corey e S.C. Virgil, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4025-4026 (1991);
- come inibitori della 2,3-ossidosqualene ciclasi, I. Abe, M. Rohmer e G.D. Prestwich, *Chemical Reviews* 93, 2189-2206 (1993);
- come nuove terapie per il trattamento dell'aterosclerosi, S.D. Larsen e C.H. Spilman, *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 28, 217-226 (1993);
- come inibitori della 2,3-ossidosqualene ciclasi, I. Abe, J.C. Tomesch, S. Wattanasin e G.D. Prestwich, *Natural Product Reports* 279-302 (1994);
- Come inibitori della 2,3-ossidosqualene ciclasi, E.J. Corey, D.C. Daley e H. Cheng, *Tetrahedron Lett.* 37, 3287-3290 (1996);
- Come probes per identificare gli amminoacidi del sito attivo degli enzimi squalene hopene ciclasi e ossidosqualene ciclasi, studiare la loro funzione e sviluppare nuovi mutanti degli enzimi, utilizzando le biotecnologie farmaceutiche, K.U. Wendt, K. Poralla e G.E. Schulz, *Science* 277, 1811-1815 (1997).

Un tema di ricerca di cui mi sono occupato i primi anni dopo la laurea riguarda lo studio delle micotossine prodotte da funghi inquinanti le derrate alimentari e lo sviluppo di nuovi antifungini.

Nel 1961 si è aperto un campo nuovo nella patologia, quello delle micotossicosi, cioè delle malattie dovute alle micotossine, metaboliti fungini secondari inquinanti alimenti per l'uomo e mangimi per gli animali, molti dei quali passano nel latte, nelle carni e nelle uova.

I funghi produttori di micotossine si trovano specialmente nel terreno e da qui passano nei magazzini, cucine, refettori, silos, laboratori alimentari, farmaceutici. Quelli finora noti sono più di 300, ma il loro numero va continuamente salendo. Essi hanno un vasto spettro di attività.

L'azione delle micotossine può essere acuta o cronica. Le micotossine possono determinare malattie molto varie come leucopenia, agranulocitosi, emorragie, degenerazioni epatiche, renali, gastriti, sindrome di Reye. Molte possiedono anche azione cancerogena; questa può manifestarsi anche dopo 30 o 40 anni o nella progenie. Le micotossine inducono alterazioni a livello macro-, micro-, sub-microscopico, biochimico, funzionale, e molte si legano al DNA e all'RNA.

Pertanto, è di primaria importanza la determinazione della qualità e della quantità delle micotossine negli alimenti. Per gli esami, si ricorre a sistemi cromatografici, spettrofotometrici, di risonanza magnetica nucleare, di fluorescenza.

Molti vegetali producono anche sostanze antitumorali. Queste inibiscono la sintesi del DNA, dell'RNA, delle proteine (I), o agiscono come immunostimolanti (II). Al gruppo I appartengono quelle capaci di formare complessi con le basi puriniche o pirimidiniche o di inibire l'RNA polimerasi e la sintesi proteica. Il gruppo II è rappresentato da numerosi polisaccaridi aventi la capacità di esaltare le difese immunitarie.

In quest'ottica, è stata determinata la presenza di varie micotossine in funghi come *Agaricus bisporus* (prataiolo coltivato), evidenziando quattro idrazine e vari sali di diazonio in quantità rilevanti.

Sono state studiate le micotossine di varie specie di *Aspergillus*, alcune delle quali altamente cancerogene; funghi inquinanti alimenti vari: cereali, orzo, mais, segale, grano, avena, semi di caffè, cacao, arachidi, carni. È stata determinata l'azione delle micotossine sulle cellule di vari organi di topo, rilevando azione citotossica, specialmente sui nuclei a carico della cromatina e molte infiltrazioni parvicellulari. Per alcune di queste sostanze, è stata anche dimostrata attività specifica per il DNA delle cellule neoplastiche.

Altri lavori riguardano la sintesi di nuovi antifungini e la determinazione dell'attività verso funghi produttori di micotossine, come varie specie di *Fusarium*. Questi funghi sono inquinanti soprattutto di granaglie, anche se tenute a bassa temperatura con elevata umidità, e producono miscele di tricoteceni cancerogeni.

Abbiamo scritto due libri. Il primo riguarda le micotossine e le sostanze fungine antitumorali. Queste vengono considerate secondo l'origine, la composizione chimica, i gruppi attivi, l'azione patologica e terapeutica, basandosi su una bibliografia di più di 3000 lavori. Nel secondo vengono trattate sostanze di interesse terapeutico ed alimentare, prodotte da batteri, funghi e piante. Particolare rilevanza viene data agli antibiotici, compresi quelli poco noti.

Fra gli aspetti peculiari della ricerca farmaceutica tecnologica, vi sono gli studi rivolti all'ottimizzazione delle caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche di farmaci in uso o in sperimentazione. Nella cosiddetta fase farmacocinetica, è fondamentale lo studio del metabolismo dei farmaci, in quanto dà indicazioni importanti su questioni fondamentali come la biosponibilità e l'assorbimento dei farmaci, l'effetto di primo passaggio, la biodistribuzione, la circolazione entero-epatica, gli eventuali effetti tossici e collaterali. Lo studio della farmacocinetica approfondisce tali aspetti, specie se riguardano problemi di rilascio che possono avere conseguenze pratiche sulla formulazione. Infatti, i problemi connessi al metabolismo e alla biodistribuzione del farmaco nell'organismo coinvolgono anche lo sviluppo di nuovi sistemi di direccionamento e di targeting.

Abbiamo sviluppato ricerche riguardanti sia la farmacocinetica di carattere pre-clinico, collegata fondamentalmente alla verifica dei nuovi sistemi di direccionamento, sia di carattere clinico, riguardante lo studio di nuovi farmaci sintetizzati nel nostro laboratorio, oppure già in uso clinico come alcuni antitumorali. Ad esempio, studiando il comportamento farmacocinetico clinico del Docetaxel in associazione con Epirubicina, è stato osservato un aumento transitorio della concentrazione plasmatica di quest'ultima, in concomitanza con l'infusione di Docetaxel, attribuibile alla presenza del Tween 80 utilizzato per la formulazione del farmaco. Conseguentemente, abbiamo sviluppato ricerche mirate allo studio di nuove formulazioni del Docetaxel incorporandolo in liposomi.

Fra gli aspetti applicativi nello sviluppo di un farmaco, vi è lo studio delle caratteristiche farmacocinetiche cliniche. In particolare, è importante da un punto di vista pratico appurare se a certe dosi il farmaco è caratterizzato da una farmacocinetica di tipo non-lineare. In tal caso, la somministrazione deve

essere fatta solo in ambiente ospedaliero e con monitoraggio continuo del farmaco stesso che consente di stabilire in modo corretto la dose da somministrare e l'intervallo di somministrazione. L'alternativa al monitoraggio, che comporta un notevole costo aggiuntivo, rimane la riformulazione del farmaco in sistemi che consentano di stabilire la linearità fra dose e concentrazione plasmatica.

Il Paclitaxel (Taxolo), un farmaco di origine naturale isolato dalla corteccia del *Taxus brevifolia*, ha trovato larga applicazione clinica nel trattamento di carcinomi ovarici o mammari resistenti all'azione di farmaci antiblastici. Essendo di natura lipofila, pochissimo solubile in acqua, per la sua formulazione viene utilizzato il Cremophor EL in etanolo, eccipiente tossico, che causa gravi effetti collaterali come allergie e neutropenia. Si è visto che il Paclitaxel, a dosi relativamente elevate o con brevi tempi di infusione ha una farmacocinetica non lineare. Tale effetto è evidente nelle infusioni brevi (< 6 h) e a dosi superiori a 175 mg/m².

Per questo motivo, abbiamo intrapreso uno studio di monitoraggio clinico del Paclitaxel alla dose di 175 mg/m², in infusione continua per tre ore in pazienti affetti da carcinomi ovarico o mammario, resistenti all'azione dei normali farmaci antiblastici. Utilizzando i dati plasmatici sperimentali e quelli di popolazione, sono stati calcolati i dati farmacocinetici compartimentali e non compartimentali. È stata osservata una certa variabilità statisticamente non significativa dei dati plasmatici che confermano per il Paclitaxel, alle dosi e nei modi di somministrazione previsti, una farmacocinetica di tipo lineare e non saturabile.

Successivamente è stata studiata la farmacocinetica del Docetaxel, un derivato semi-sintetico del Paclitaxel, in associazione con Epirubicina, in pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico. L'Epirubicina e il Docetaxel, alle dosi di 75 mg/m², sono stati somministrati seguendo due diverse procedure che prevedono rispettivamente la somministrazione di Docetaxel immediatamente dopo la somministrazione di Epirubicina (10 min), oppure con un intervallo di un'ora. Tale tipo di somministrazione è stato studiato per valutare una possibile interazione farmacocinetica o metabolica tra i due farmaci che possa determinare un'eliminazione di tipo saturabile.

Dai calcoli dei parametri farmacocinetici si è vista una diminuzione significativa della clearance dell'Epirubicina, insieme con un aumento transitorio della sua concentrazione plasmatica, in corrispondenza con la massima concentrazione plasmatica del Docetaxel. Questi risultati fanno ritenere che il Tween 80 utilizzato per la formulazione del farmaco, analogamente al Cremophor EL, sia responsabile dell'inibizione della pompa Pgp responsabile dello sviluppo della resistenza cellulare e, di conseguenza, faccia aumentare la concentrazione plasmatica dell'Epirubicina. Abbiamo valutato questo dato clinico allo scopo di sviluppare una serie di ricerche finalizzate alla riformulazione del Docetaxel utilizzando liposomi ed immunoliposomi.

Il Tacrolimus (FK506), un farmaco analogo della Ciclosporina, è in fase di sperimentazione clinica presso alcune unità di trapianti epatici e renali, come immunosoppressore. Esso è utilizzato in sostituzione della Ciclosporina o di altri farmaci immunosoppressori, in caso di rigetto acuto corticoresistente. Il Tacrolimus richiede normalmente il monitoraggio ematico per due motivi principali: 1) assunto per os possiede una bassa biodisponibilità; 2) ha un'alta estrazione epatica. Per gli stessi motivi, alcuni gruppi di ricerca stanno studiando nuove possibili formulazioni del Tacrolimus che rendano il farmaco più biodisponibile.

Abbiamo studiato la possibile incorporazione del Tacrolimus in liposomi, per avere un rilascio costante del farmaco e una riduzione della sua trasformazione metabolica. Come ricerca clinica si è cercato di valutare i livelli plasmatici del Tacrolimus in pazienti trapiantati di rene in imminente pericolo di rigetto, utilizzando un nuovo metodo immunoenzimatico (ELISA) PRO-TRAC II, e confrontandolo con il precedente I-IMx. Sono state messe in evidenza variazioni significative del tempo di picco in due diverse categorie di popolazioni evidenziando la notevole variabilità di assorbimento orale del farmaco legato all'interindividualità e a fattori patologici che condizionano la velocità di assorbimento e la conseguente estrazione epatica del farmaco.

Il micofenolato di mofetile è l'estere 2-morfinoetilico dell'acido micofenolico. Esso è indicato, in associazione con la Ciclosporina ed i corticosteroidi, per la profilassi del rigetto acuto in pazienti con trapianto renale in corso. Il micofenolato di mofetile è considerato una prodrug, in quanto dopo somministrazione orale viene in gran parte assorbito e trasformato attraverso un metabolismo pre-sistemico nella sua forma attiva, l'acido micofenolico. Questo è trasformato in glucuronide e come tale subisce una circolazione entero-epatica.

Tale comportamento induce ancora una grande variabilità nella biodisponibilità del farmaco e diverse ricerche di tipo farmaceutico tecnologico applicativo sono in corso per migliorare l'assorbimento del farmaco e ridurre il metabolismo. Un monitoraggio clinico del farmaco in pazienti che hanno subito un trapianto renale può essere molto utile per stabilire un corretto dosaggio del farmaco a tempi molto lunghi, e stabilire se sia necessario sviluppare una nuova formulazione.

Basandoci su queste premesse, abbiamo stabilito l'esistenza di una relazione stretta e diretta fra dose, livelli plasmatici e peso del paziente e che è necessario mantenere una concentrazione plasmatica del

farmaco superiore a 2 µg/ml, per non avere il rischio di rigetto. Inoltre, a differenza di quanto riportato in letteratura, si osserva nel tempo (fino a 40 giorni) un aumento della concentrazione plasmatica di farmaco, anche mantenendo invariata la dose giornaliera. Potrebbe quindi essere utile il monitoraggio del farmaco o in alternativa lo studio di una nuova formulazione che consenta un assorbimento costante del farmaco nel plasma.

Altre ricerche riguardanti la farmacocinetica e il metabolismo dei farmaci sono state sviluppate specialmente nell'ottica dello studio di metaboliti tossici e reattivi. I metaboliti reattivi, mediante la formazione di legami covalenti con le macromolecole biologiche possono provocare la morte o lesioni alle cellule. Processi mutagenetici, teratogenetici e cancerogenetici sono la conseguenza di questi eventi. La formazione di un legame stabile tra il farmaco e le proteine cellulari è anche causa della comparsa di strutture con caratteristiche antigeniche capaci di provocare una risposta immunitaria diretta contro gli stessi tessuti (sindromi autoimmuni da farmaci). Queste considerazioni indicano la necessità di includere studi del metabolismo nei processi generali di progettazione del farmaco come proposto da Ariens e da Bodor (concetto di soft-drug) che permettano un miglioramento del loro indice terapeutico.

Numerosi derivati della Teofillina vengono utilizzati nella terapia delle patologie dell'apparato respiratorio, in particolare nel trattamento dell'asma bronchiale. Uno dei principali limiti dell'impiego della Teofillina risiede nello stretto intervallo terapeutico che la caratterizza. Tali effetti sono dovuti all'interazione con i recettori adenosinici per i quali la Teofillina mostra buona affinità. Sulla scorta di questi dati, sono stati sintetizzati dei derivati analoghi ed isosteri della Doxofillina. Lo scopo è quello di associare due attività farmacodinamiche nell'ambito della stessa molecola, quella antibrucospastica e quella mucolitica. Infatti è noto in letteratura che molti derivati solforati possiedono quest'ultima attività e vengono impiegati in terapia. Dei composti così sintetizzati, il derivato 1,3-ditiolanico ha mostrato non solo buona attività antibrucospastica, ma anche spiccata azione mucolitica. I derivati acetalici e tioacetalici sintetizzati sono stati utilizzati per uno studio di correlazione struttura-metabolismo in cui si è valutato il differente comportamento nei confronti dei sistemi enzimatici microsomiali degli eterocicli 1,3-ditiolano, 1,3-ditiano, 1,3-ossatiolano, 1,3-diossano. Nel caso del derivato 1,3-ditiolanico (ABC 99), è stata osservata la solfossidazione diastereoselettiva dell'anello tioacetalico con la formazione di una coppia di solfossidi. Analogo comportamento è stato dimostrato per i derivati 1,3-ditiano e 1,3-ossatiolano; la presenza dell'atomo di zolfo determina una notevole regioselettività nel metabolismo di questi derivati e non si è osservata la scissione dell'anello tioacetalico ciclico. Il derivato diossanico, invece subisce la scissione dell'anello attraverso una ossidazione enzimatica del carbonio acetalico e un successivo riarrangiamento che porta alla formazione di una funzione estere aciclica. Il derivato 1,3-tiazolidinico della teofillina viene ossidato a solfossido che, a differenza degli altri derivati solforati, risulta instabile formando per idrolisi la 7teofillinacetaleide.

È stato studiato il metabolismo in vitro dell'antiinfiammatorio a struttura benzimidazolica KB-1043. Sono stati identificati e sintetizzati i metaboliti provenienti dall'ossidazione in posizione benzilica e dalla successiva conversione del gruppo alcolico a chetone. È stata osservata anche la formazione di un coniugato con l'acido glucuronico. Il metabolita con la funzione alcolica presenta un'attività antinfiammatoria comparabile a quella del farmaco parente, ma con una minore attività ulcerogena.

Nel caso dello studio del metabolismo del farmaco antiparkinson Budipina, sono stati isolati ed identificati vari metaboliti come la Budipina Nossido e il derivato fenolico proveniente dall'ossidazione in posizione para di uno degli anelli fenilici. Sono stati evidenziati anche i prodotti di coniugazione con l'acido glucuronico e solforico.

Del farmaco antineoplastico Analog II è stato invece chiarito il metabolismo dell'anello diclorociclopropanico e determinate le strutture di parecchi metaboliti generati da intermedi reattivi ed instabili.

Nell'intento di caratterizzare meglio le proprietà biologiche dei derivati azasqualenici, è stata studiata l'azione inibitrice nei confronti dell'attività amminopirina N-demetilasi citocromo P450 dipendente. La IC₅₀ per i derivati azasqualenici ed i relativi N-ossidi è di circa 1 mM. Del composto 2-aza-2,3-diidro-squalene sono state determinate la struttura del metabolita N-ossido e la cinetica di inibizione.

Proseguendo le precedenti ricerche sulla ossidosqualene ciclastasi (Schema1), in uno studio coordinato da Maurizio Ceruti e dal Professore Seiichi Matsuda dell'Università di Houston, Texas, mediante lo sviluppo di un proinibitore enzimatico, abbiamo dimostrato che lo ione dammarenile ha la configurazione della catena laterale in 17β e pertanto la sua struttura è la 22.

Mediante una sintesi stereospecifica, abbiamo ottenuto il 22,23-diidro-20-ossa-2,3-ossidosqualene 21, un analogo dello squalene epossido, avente un atomo di ossigeno al posto dell'atomo di carbonio in posizione 20 del substrato (schema 2).

Schema 2

Abbiamo inserito il gene ricombinante della lupeolo sintasi di *Arabidopsis thaliana* (LUP1) in un mutante di lievito privo di qualsiasi ciclasi. L'espressione di LUP1 nel lievito ha fornito un'elevata attività enzimatica, priva di qualsiasi altra ciclasi. L'incubazione in vitro di lisato di lievito contenente la LUP1 ricombinante, con l'enoletere 21 precedentemente sintetizzato, ha fornito il prodotto di biociclicizzazione, il 3 β -idrossi-22,23,24,25,26,27-esanordammaran-20-one 24b. Complessi studi analitico-strumentali (vedere lavoro 7 e supplementary material) hanno assegnato in modo univoco la configurazione β alla catena laterale in 17. Il derivato 24b può essere razionalizzato come il prodotto idrolitico dell'emichetale 23, che deriva dal catione tetraciclico 22 per reazione con acqua, presente nel sito attivo dell'enzima. La configurazione 17 β del catione dammarenile è congelata nel derivato dammaranico 24b ottenuto per biociclicizzazione del proinibitore 21.

Inoltre abbiamo condotto studi di meccanica molecolare. I calcoli di meccanica molecolare mostrano che la 20-ossa sostituzione ha un effetto trascurabile sul legame del substrato e sulle energie di attivazione della reazione, che portano agli epimeri dello ione dammarenile. Gli studi di "molecular modeling" indicano che, a causa della limitata libertà rotazionale nella cavità del sito attivo della ciclasi, la configurazione dello ione dammarenile può essere dedotta dalla configurazione del metile angolare del derivato pentaciclico o del derivato tetraciclico 6-6-6-6.

In un altro lavoro sono stati ottenuti nuovi vinilsolfuri analoghi dello squalene epossido troncato 3,4,7,8,9,11,13 (figura 1), in cui la funzione reattiva è stata posta adiacente agli atomi di carbonio dello squalene epossido, coinvolti nella formazione del terzo o del quarto ciclo. Questi sono stati studiati come inibitori della ossidosqualene ciclasi di fegato di maiale e di *Saccharomyces cerevisiae* e della squalene-hopene ciclasi di *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

Negli isomeri 3,4,7,8,9, il solfuro coniugato aumenta notevolmente la stabilità del carbocatione formato dall'enzima. Dopo biociclicizzazione dei proinibitori, la carica positiva del carbocatione intermedio formato dall'enzima risulta delocalizzata tra il sistema coniugato e lo zolfo adiacente, e lo ione tiocarbenio può reagire con i residui nucleofili del sito attivo dell'enzima.

I metiltio derivati 3, 4, 7 e 8 sono stati ottenuti mediante un nuovo metodo di sintesi stereospecifica e l'isomeria è stata assegnata da studi di analisi NMR, mentre i feniltio derivati 9, 11 e 13 sono stati ottenuti in miscele E + Z.

I composti hanno mostrato un'elevata attività di inibizione della ossidosqualene ciclasi animale e di lievito e della squalene hopene-ciclasi di *Alicyclobacillus acidocaldarius*, con selettività verso le varie ciclasi. I metiltio derivati coniugati 3 e 4 sono risultati dei proinibitori potenti e specifici verso la ossidosqualene ciclasi di lievito, con una IC₅₀ rispettivamente di 0,4 e 0,9 μ M. I feniltio derivati 9, 11 e 13 sono risultati meno attivi verso la ciclasi animale e di lievito, probabilmente a causa dell'ingombro sterico del fenile. Al contrario, i feniltio derivati hanno mostrato una buona attività verso la squalene-hopene ciclasi, che permette l'inserimento nel suo sito attivo di gruppi dotati di maggiore ingombro sterico.

Figura 1

In seguito sono stati studiati vari analoghi dello squalene e dello squalene epossido, appositamente sintetizzati, nell'attività di inibizione della ossidosqualene ciclasi di *Trypanosoma cruzi* espressa in *Saccharomyces cerevisiae*, comparandola con l'attività inibitoria verso le ciclasi animale ed il lievito.

Il *Trypanosoma cruzi* è un protozoo patogeno responsabile della malattia di Chagas. Esso, come altri protozoi patogeni, non può sostituire gli steroli da esso biosintetizzati con il colesterolo biosintetizzato dalle cellule del mammifero ospite, per cui inibitori specifici della biosintesi degli steroli del protozoo possono essere utili come farmaci antiprotozoari.

Abbiamo sintetizzato e testato l'attività di 19 composti, i derivati squalenici 1-19 (figura 2).

I derivati azasqualenici sono stati progettati come analoghi dei carbocationi ad alta energia generati al C-2 dopo l'apertura dell'anello epossidico, come i composti 8 e 9, o analoghi del carbocatione generato dopo la chiusura del 4° anello, come il composto 10. Questi non hanno mostrato specificità verso la ciclasi di *Trypanosoma cruzi* rispetto alle ciclasi animale e di lievito. Analogamente i derivati 29-metilidenici 11, 12, 13 e 14, che sono risultati inibitori irreversibili verso le varie ciclasi, pur essendo molto attivi, mancano di specificità verso la ciclasi di *Trypanosoma cruzi*.

Nella serie dei viniltio derivati, abbiamo trovato una potente attività inibitoria verso la ossidosqualene ciclasi di *Trypanosoma cruzi*. Questi composti sono stati progettati come profarmaci, dato che necessitano per l'attivazione di una parziale ciclizzazione nel sito attivo enzimatico. A causa delle eccellenti proprietà dello zolfo, π e σ -donatrici, nello stabilizzare il carbonio in α elettrone-deficiente, essi possono generare intermedi carbocationici relativamente stabili che interagiscono fortemente con i residui nucleofili amminoacidici dell'enzima.

I metilsolfuri non coniugati come il derivato 16, o coniugati come gli isomeri 1 e 2, sono risultati inibitori potenti e selettivi verso la ciclasi di *Saccharomyces cerevisiae*; al contrario i fenilsolfuri come 6, 7 e 19 sono risultati dei deboli inibitori delle ciclasi animale e di lievito, e inibitori potenti e specifici verso l'enzima di *Trypanosoma cruzi*, con un'attività fino a 100 volte superiore rispetto a quella sull'enzima di mammifero.

Data la carenza di farmaci specifici verso il *Trypanosoma cruzi* e analoghi patogeni, è in progetto lo studio dell'attività in vitro dei profarmaci viniltio derivati 6, 7 e 19 su colture di *Trypanosoma cruzi* e di protozoi analoghi ad elevata patogenicità.

Figura 2

Abbiamo sviluppato due nuove molecole reattive verso i tioli ed è stata studiata la loro attività biologica su due mutanti della squalene-hopene ciclasi di *Alicyclobacillus acidocaldarius*, costruiti apposta per questo scopo. Le due nuove molecole sono la N-dodeciliodoacetammide 40 e la N-squaleniliodoacetammide 41 (figura 3).

40

41

Figura 3

La N-dodeciliodoacetammide 40 è stata ottenuta in due passaggi a partire dalla dodecilammina, mentre per la sintesi della N-squaleniliodoacetammide 41 sono stati necessari otto passaggi a partire dallo squalene.

Abbiamo costruito due mutanti della squalene-hopene ciclasi di *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Nel quintuplo mutante, tutti i cinque residui cisteinici sono stati sostituiti con una serina, mentre nel sestuplo mutante, in aggiunta alla sostituzione dei cinque residui cisteinici, anche l'aspartato D376, che si trova alla sommità del sito attivo, è stato sostituito con una cisteina.

Abbiamo studiato l'effetto delle due nuove molecole reattive verso i tioli 40 e 41 verso i due mutanti della ciclasi di *Alicyclobacillus acidocaldarius*, per identificare il primo inibitore irreversibile in grado di legarsi covalentemente al sito attivo e che mimica la struttura ed il ripiegamento del substrato naturale. La struttura squalenica o dodecilica di questi inibitori dovrebbe permettere loro di entrare nella cavità lipofila del sito attivo enzimatico, mentre la funzione iodoacetammidica dovrebbe reagire in modo specifico verso i residui di cisteina localizzati in posizioni critiche.

Dato che il quintuplo mutante è privo di tutti i residui di cisteina presenti nell'enzima non mutato, gli inibitori reattivi verso i tioli dovrebbero risultare inattivi e naturalmente reversibili verso questo mutante, mentre dovrebbero inattivare irreversibilmente il sestuplo mutante che contiene una cisteina nel sito attivo. Abbiamo osservato che il sestuplo mutante ha perso la capacità di ciclizzare lo squalene, per cui l'attività dei due derivati iodoacetammidici 40 e 41, è stata testata verso l'attività ciclizzante lo squalene epossido. La N-dodeciliodoacetammide 40 ha mostrato una scarsa attività verso entrambi i mutanti, mentre la N-squaleniliodoacetammide 41 ha mostrato una maggiore attività inibitoria verso il sestuplo mutante, rispetto al quintuplo mutante. È stata poi testata l'irreversibilità dell'inattivazione della N-squaleniliodoacetammide 41 sul sestuplo mutante, che è risultato un buon inibitore irreversibile.

Recentemente è stata cristallizzata la ossidosqualene ciclasi umana ed è stata determinata la struttura dell'enzima 3-D. Abbiamo in progetto di legare irreversibilmente una molecola analoga di substrato

con un gruppo reattivo verso i tioli, come la N-squaleniliodoacetammide 41, alla ossidosqualene ciclasi umana che possiede tre residui cisteinici situati in posizioni critiche, per ottenere un complesso stabile tra l'enzima e la molecola squalenica. La cristallizzazione del complesso enzima-inibitore e la determinazione della struttura 3-D risulterebbero di grande importanza per chiarire il meccanismo con cui una molecola squalenica si ripiega nel sito attivo della ossidosqualene ciclasi umana.

Abbiamo studiato l'attività antifungina e citotossica di due inibitori della ossidosqualene ciclasi, la squalene bis-dietilammina 42 e lo squalene bis-dietilmetilammonio ioduro 43 (figura 4). I derivati azasqualenici mimano l'intermedio carbocationico al carbonio 2 generato dall'apertura dell'anello epossidico dello squalene epossido 7 da parte della ciclasi. Nei composti 42 e 43, l'atomo di carbonio in posizione 2, carico positivamente, è stato sostituito con un atomo di azoto, che è protonato a pH fisiologico.

42

43

Figura 4

Molti farmaci antifungini agiscono inibendo vari enzimi della biosintesi degli steroli: le allilammine, come la terbinafina, inibiscono specificatamente la squalene epossidasi fungina, mentre gli azoli, come il miconazolo ed il chetoconazolo inibiscono la lanosterolo C14-demetilasi. Nell'ultimo decennio si è verificato un notevole sviluppo della resistenza verso gli antifungini di uso corrente; per questo, è stata focalizzata l'attenzione nel comprendere i meccanismi di sviluppo della resistenza, insieme alla progettazione di nuovi antifungini per il trattamento delle infezioni causate dai ceppi resistenti.

In quest'ottica, abbiamo studiato l'attività fungistatica e fungicida dei due inibitori a struttura azasqualenica, 42 e 43, verso i dermatofiti ed altri funghi responsabili di micosi cutanee e sistemiche, su 12 isolati da 7 specie fungine. Per ogni isolato, sono state determinate la minima concentrazione inibente (MIC) e la minima concentrazione fungicida (MFC), usando una tecnica da noi messa a punto in studi precedenti. Mentre in passato, la determinazione della MIC di un antifungino era considerata il parametro fondamentale per dimostrare la sua efficacia, oggi molti ritengono i dati della MFC meglio correlabili nella pratica clinica, perché questi misurano l'effettiva capacità di un antifungino ad uccidere il microrganismo. Per questi motivi, abbiamo determinato per ogni fungo entrambi i parametri.

I derivati azasqualenici 42 e 43 sono risultati molto attivi verso la maggior parte dei funghi esaminati, ed il derivato ammonico quaternario 43 è risultato mediamente più potente, con valori di MIC compresi tra 1,5 e 12,5 µg/ml verso la maggior parte dei funghi studiati, e valori di MFC compresi tra 3 e 25 µg/ml verso molti dei ceppi analizzati. I derivati 42 e 43 hanno mostrato un'attività fungistatica e fungicida mediamente superiore a quella degli antimicotici più utilizzati in terapia, come gli azoli, le allilammine e l'anfotericina B. Infine, in prospettiva di un possibile utilizzo di questi composti come antimicotici, abbiamo studiato la loro tossicità su colture cellulari delle linee MDCK di rene di cane, verso le quali sono risultati tossici a concentrazioni molto più elevate rispetto a quelle necessarie per esplicare l'attività antifungina.

Abbiamo sintetizzato e studiato l'attività citotossica ed antiproliferativa verso colture di cellule tumorali di 20 nuovi derivati tetraciclici a struttura bis-triazolobenzodiazepinica. Questo studio è stato condotto in collaborazione con i gruppi di ricerca dei Professori Mario Di Braccio e Giorgio Roma dell'Università degli Studi di Genova. I metodi sintetici sono stati sviluppati per ottenere i prodotti grezzi il più possibile privi di altri sottoprodotti, così da semplificare i successivi stadi di purificazione. Abbiamo sviluppato la sintesi dei derivati 9-non sostituiti 8a-8c e 8e-8g e di quelli 9-metil-sostituiti 8d e 8h-8o (tabella 1).

Data l'importanza della sostituzione in 9 nel determinare l'attività biologica, abbiamo ottenuto anche i derivati 9-[(dimetilammino)metilene] 10, il 9-cloro 11 il 9,9-dicloro 12 e i 9-(dialchilammino) 13a e 13b. Inoltre abbiamo modificato il sistema triazolico, sintetizzando il derivato bis-triazolone 14.

La sintesi dei nuovi derivati è stata sviluppata in otto passaggi, a partire dal monoetil malonato, a cui si rimanda per i dettagli sintetici alla pubblicazione. Le analisi 1H-NMR hanno evidenziato che l'anello eptatomico benzodiazepinico è bloccato in una sola conformazione a barca, e non avviene inversione conformazionale a causa dei sostituenti R''' degli anelli triazolici. Infatti, nei derivati 9 non sostituiti, i due protoni al C-9 sono diastereotopici e mostrano due segnali distinti. Quando il C-9 è sostituito con un gruppo alchilico, la barriera di interconversione tra i due conformeri risulta ancora più elevata ed il sostituito R si trova nella posizione quasi-equatoriale, termodinamicamente più stabile.

Tabella 1

Abbiamo testato i composti in vitro per l'attività citotossica verso le cellule MT-4 ed anti HIV-1. A differenza della Nevirapina (tabella 1), che possiede una spiccata attività anti HIV-1, ma è priva di attività citotossica, nessuno dei 20 composti ha mostrato attività anti HIV-1, ma 6 composti hanno mostrato una notevole attività citotossica ($CC_{50} < 50 \mu M$). I sostituenti fenilici in R''' hanno portato ad una elevata citotossicità, come nei derivati 8c e 8d. Anche alcuni derivati del composto 8c, variamente sostituiti in posizione 9, hanno dato ottimi risultati, come ad esempio il 9-cloro derivato 11 che è risultato il più attivo della serie.

I derivati dotati di maggiore tossicità sono stati poi studiati nell'attività antiproliferativa in vitro verso varie linee cellulari derivate da tumori umani ematologici o solidi. Tutti i composti hanno mostrato un'elevata attività antiproliferativa verso le cellule derivate da tumori ematologici, mentre solo i derivati 54 e 59 sono risultati molto attivi e specifici anche verso alcuni tumori solidi, in quanto alle stesse concentrazioni non hanno mostrato attività antiproliferativa verso colture cellulari derivate da cellule normali.

Veicolazione e direzionamento di farmaci e di profarmaci: nuovi sistemi liposomiali e nanoparticellari

Questa linea di ricerca si è basata sulla ricerca e lo sviluppo di un approccio razionale ed innovativo nel trattamento di neoplasie. In particolare sono stati ricercati e sintetizzati nuovi agenti farmacologicamente attivi in grado di raggiungere e penetrare attraverso la massa cellulare.

Il bersaglio tumorale verso il quale sono state sviluppate alcune delle nostre ricerche è rappresentato dai carcinomi del colon, in quanto questi sono tra le più frequenti forme neoplastiche maligne umane, producono sintomi in fase relativamente precoce e sono potenzialmente guaribili con la resezione chirurgica. Nonostante ciò, il carcinoma del colon rappresenta ancora una delle cause più frequenti di morte per tumore. Fino ad oggi, il trattamento chemioterapico delle suddette forme carcinomatose ha fornito risultati poco significativi anche utilizzando farmaci ad elevata tossicità. Infatti i principali requisiti richiesti ai farmaci antitumorali sono un'elevata capacità di intossicazione delle cellule bersaglio legata ad una altrettanto elevata specificità.

Sono state valutate diverse classi di agenti tossici ed è stata focalizzata l'attenzione su un gruppo di proteine vegetali, denominate anche RIP (Ribosome Inactivating Protein), in grado di esplicare un'elevata tossicità data dalla loro intrinseca capacità catalitica nei confronti dei ribosomi cellulari; infatti già a concentrazioni 10-12 M sono in grado di causare la morte delle cellule.

Successivamente alla scelta della RIP si procede alla riduzione della sua attività tossica sistemica incrementandone contemporaneamente la specificità mediante la coniugazione con polimeri biodegradabili o con anticorpi monoclonali (MAb). L'utilizzo delle RIP I (cioè a singola catena polipeptidica) richiede uno studio approfondito sulla natura del legame MAb-RIP anche allo scopo di poterne modificare le caratteristiche al fine di avere il rilascio del tossiforo nelle condizioni più opportune. La lunghezza di legame ed il mantenimento della carica superficiale proteica sono determinanti sull'attività dell'immunoconiugato. Dalla letteratura risulta infatti che l'attività catalitica di molte RIP I si riduce in seguito all'inevitabile derivatizzazione chimica richiesta nella preparazione di IT. In particolare, i leganti commerciali normalmente utilizzati comportano una riduzione del 50-60% dell'attività tossica.

È stata quindi progettata la sintesi di nuovi leganti eterobifunzionali caratterizzati da un gruppo tioamidinico in grado di legarsi ai gruppi amminici α -terminali delle lisine, mantenendone completamente la carica positiva. Il secondo gruppo reattivo è stato modulato al fine di ottenere leganti solubili, stabili ed in grado di produrre coniugati in buone rese. In base ad una valutazione complessiva del lavoro preliminare sono stati scelti i sistemi leganti: AMPT (acetilmercaptopropionil tioimidato di etile) e CDPT [3-(4-carbossiammidofenilditio)propionil tioimidato di etile]. Questi reattivi presentano buone caratteristiche chimico-fisiche, nonché un'elevata capacità derivatizzante la RIP senza ridurre l'intrinseca capacità tossica. L'utilizzo combinato dei due reattivi tioimidati eterobifunzionali porta alla formazione di una popolazione omogenea di immunoconiugato in resa elevata. Questo coniugato si è dimostrato specifico ed altamente attivo in vitro sulle linee cellulari bersaglio.

Parallelamente sono state sviluppate tecniche di legame innovative che prevedono l'uso di coloranti di tipo triazinantrachinonsolfonici (Procion Blue e Cibacron Blue) capaci di interagire in maniera non covalente con alcuni siti specifici delle tossine vegetali. Questo è possibile sfruttando l'interazione principalmente a carattere ionico, fra le RIP di tipo I (dotate di elevata basicità) ed i gruppi solfonici presenti sul colorante. La costante di affinità fra questi coloranti e le RIP è dell'ordine di $10^7 M$, quindi sufficientemente elevata per generare coniugati stabili anche in vivo. Infatti, i coniugati sintetizzati con questa tecnica mostrano, in base ad un approfondito studio farmacocinetico, un'emivita paragonabile a quella dei coniugati realizzati con un ponte

disolfuro protetto. L'applicazione di questa tecnica per preparare IT presenta inoltre un'elevata resa di coniugazione e la possibilità di non danneggiare con leganti eterobifunzionali la tossina.

L'attività tossica e la specificità anticorpale risultano sostanzialmente inalterate da questa procedura di coniugazione. Sono stati prodotti diversi coniugati utilizzando le RIP vegetali: gelonina, momordina, colocina, briodina, momorcochina. La realizzazione della sintesi di una serie di coniugati, differenti nell'unità tossica ma identici nella parte anticorpale, permette di ridurre l'immunogenicità del trattamento terapeutico. È quindi, possibile realizzare un 'panel' di immunotossine utilizzando una sola procedura di coniugazione, veloce ed efficiente, ottenendo una tossicità specifica elevata.

Sempre sfruttando l'interazione delle RIP I con questi coloranti è stata messa a punto un'ulteriore procedura di sintesi di coniugati, definita "in fase solida". Lo scopo di questo studio si prefiggeva la riduzione degli stadi di purificazione, ipotizzando un processo di coniugazione automatizzato. In particolare, la proteina tossica viene ancorata su una fase cromatografica di affinità e successivamente viene derivatizzata in situ con opportuni leganti; in ultimo avviene la coniugazione con un MAb precedentemente derivatizzato. Con questa procedura di sintesi, rimuovendo in un secondo tempo completamente l'anticorpo non coniugato, l'IT viene recuperata in rese elevate.

Nel corso degli studi sulle IT è emersa la necessità di studiare in maniera approfondita la capacità di veicolamento degli anticorpi. È necessario infatti uno studio sul legame MAb-superficie cellulare e sulla successiva internalizzazione proteica per poter predire l'azione delle IT sintetizzate. In quest'ottica, al fine di evidenziare meglio il legame antigene-anticorpo, si è sintetizzato un linker radioattivo [acido 2,3,4,5-tetraidrossi-5-(4-idrossifenil)valerico] labile all'azione dell'acido periodico. Inizialmente sono stati sintetizzati derivati anticorpali, la stabilità e l'efficacia dei quali sono state successivamente valutate su linee cellulari tumorali target.

Nonostante i coniugati con le RIP I mostrino una scarsa tossicità sistemica, grazie al veicolamento del MAb, si rende a volte indispensabile l'uso di sostanze potenzianti la citotossicità specifica. Tra questi prodotti vi sono: ammine lisosomiotrope, ionofori, inibitori di enzimi lisosomiali. Una delle sostanze che permette di ottenere un elevato rapporto fra potenziamento e attività intrinseca è lo ionoforo monensina. Infatti, l'attività di IT composte dalla catena A della ricina e MAb si incrementa anche di 2500 volte. È stato progettato e portato a termine uno studio di correlazione di struttura-attività di analoghi della monensina allo scopo di aumentare l'attività potenziante limitando la tossicità cellulare. I derivati sintetici della monensina sono stati caratterizzati anche per quanto riguarda l'idrofilità e la capacità di agire come ionofori. Sono stati ottenuti composti più polari, con una tossicità circa 200 volte minore della monensina, ed altri con minore polarità dotati sia di maggiore capacità ionoforetica che potenziante.

Un'altra classe di leganti, ottenuta da noi, è rappresentata da nuovi derivati del metossipoli(etil)englicole (mPEG), contenenti un gruppo reattivo tioimidoestere. Questi leganti reagiscono con gli α -ammino gruppi delle lisine dell'opportuna proteina, formando un legame amidinico, come discusso precedentemente. Sono stati ottenuti mPEG di pesi molecolari di 2000 e 5000 Da e sono stati preparati due tipi di legami introducendo spaziatori di diverse lunghezze tra il gruppo ossidrilico del polimero e il tioimidato.

E' stata testata la reattività verso gli α -ammino gruppi delle lisine utilizzando come modello l'albumina umana, ed è stato valutato il grado di derivatizzazione. L'incremento del peso molecolare dei coniugati è stato analizzato mediante gel-filtrazione e elettroforesi. Abbiamo osservato che il grado di derivatizzazione aumenta incrementando gli eccessi di mPEG e la lunghezza dello spacer. Abbiamo studiato la farmacocinetica delle proteina nativa e di quella modificata con PEG, osservando un incremento dell'emivita plasmatica dopo la modificazione.

Abbiamo sviluppato coniugati mPEG-albumina umana-Paclitaxel. Il Paclitaxel (Taxolo) è un diterpene isolato dal *Taxus brevifolia*, approvato dal FDA per il trattamento del carcinoma ovarico e mammario platinor resistente.

Per incrementare l'attività chemioterapica, abbiamo proposto la sua coniugazione con uno stabile carrier del farmaco a struttura macromolecolare: l'albumina umana. Infatti, è stato osservato che le macromolecole come l'albumina, le globuline e i polimeri sintetici si accumulano preferenzialmente nei tessuti tumorali, a causa dell'incremento della permeabilità vascolare e dei prolungati tempi di ritenzione negli interstizi tumorali, a causa dell'ostruzione del drenaggio linfatico.

Il polimero è stato attivato con un gruppo tioimidoestere che reagisce con gli α -ammino gruppi delle lisine della proteina. Sono stati impiegati mPEG con peso molecolare di 2000 e 5000 Da, e sono stati ottenuti diversi coniugati impiegando diversi eccessi molar del polimero. Il peso molecolare è stato valutato mediante gel-filtrazione e SDS-PAGE. Il grado di derivatizzazione è stato stimato dopo ogni reazione di derivatizzazione mediante il metodo TNBS.

E' stata valutata l'attività su diverse linee cellulari tumorali umane. Il comportamento farmacocinetico è stato studiato in topi Balb/c dopo iniezione iv e ip. Sono stati preparati due tipi di coniugati per seguire

separatamente il comportamento della proteina e il rilascio di Paclitaxel. Questi coniugati hanno mostrato un incremento nella stabilità plasmatica del Paclitaxel aumentandone di conseguenza l'attività antitumorale.

Infine, abbiamo sviluppato nuove formulazioni del Paclitaxel e di alcune sue prodrugs. A causa della scarsa solubilità in acqua, il Paclitaxel è somministrato sciolto in Cremophor EL (olio di ricino polioossietilato) ed etanolo. Tale formulazione causa seri effetti collaterali (ipersensibilità allergica, effetti neurotossici) e obbliga i pazienti ad una pre-medicazione con antistaminici.

Per ridurre questi problemi, abbiamo studiato formulazioni alternative meno tossiche, come l'incorporazione del farmaco in liposomi. In particolare abbiamo confrontato due tipi di liposomi: 1) liposomi convenzionali PC/PG 9:1; 2) liposomi modificati con PEG, potenzialmente a lunga emivita (stealth). Questi ultimi si sono dimostrati meno stabili durante la conservazione e più stabili nel plasma a 37°. Inoltre, i liposomi stealth contenenti Paclitaxel, rispetto ai liposomi convenzionali, hanno mostrato una lunga circolazione plasmatica e un trascurabile uptake da parte degli organi RES (fegato e milza). Tutti questi elementi concorrono a ritenere che il Paclitaxel veicolato in tali preparazioni presenti caratteristiche di stabilità e di farmacocinetica nettamente migliori rispetto alla formulazione commerciale.

E' possibile aumentare la solubilità in acqua del Paclitaxel, sintetizzando prodrugs solubili in acqua e sufficientemente stabili sia alla conservazione sia nel plasma. Un ulteriore sviluppo potrebbe riguardare l'incapsulazione di prodrugs del Paclitaxel solubili in liposomi. In tal modo si avrebbe una maggiore stabilità del farmaco, un miglioramento delle sue caratteristiche farmacocinetiche ed una maggiore quantità di farmaco incorporato nelle vescicole lipidiche. Infatti, uno degli aspetti limitanti l'uso terapeutico del Paclitaxel incorporato in liposomi convenzionali, è la modesta concentrazione del farmaco presente all'interno delle vescicole lipidiche, tale da raggiungere appena una concentrazione di 1 mg/ml, insufficiente a raggiungere la minima concentrazione terapeutica.

Abbiamo incapsulato in liposomi tre diverse prodrugs solubili del Paclitaxel: 1) il 2'-succinil estere; 2) il derivato 2'-metilpiridinio acetato; 3) il 2'-estere con il PEG. Quest'ultimo risulta avere le caratteristiche migliori come solubilizzante in acqua, relativa stabilità alla conservazione a pH leggermente acido, un tempo di idrolisi nel plasma abbastanza rapido ($t_{1/2} = 30$ min). Con una formulazione liposomiale PC/PG/col 9:1:5, i liposomi contenenti Paclitaxel-2'-PEG-estere hanno incorporato fino a 6.5 mg/ml di farmaco, sono risultati stabili per almeno due mesi e non hanno presentato sintomi di aggregazione o fusione delle particelle lipidiche.

La citotossicità in vitro su cellule di adenocarcinoma umano è risultata simile a quella del farmaco parente: ciò dimostra un pronta idrolisi delle prodrugs ed il conseguente rilascio del farmaco libero. I parametri farmacocinetici ottenuti dopo somministrazione dei liposomi per via ev hanno mostrato che i liposomi contenenti il PEG-estere del Paclitaxel sono caratterizzati da un'emivita plasmatica più lunga, una clearance minore e una AUC superiore rispetto ai corrispondenti valori riscontrati con il Paclitaxel veicolato in liposomi convenzionali.

Abbiamo sintetizzato nuovi profarmaci della Gemcitabina, la loro incorporazione in varie formulazioni liposomiali, la caratterizzazione, gli studi di stabilità dei profarmaci e dei sistemi liposomiali, la citotossicità e la farmacocinetica.

La Gemcitabina o 2',2'-difluorodesossicitidina (schema 3) è un antimetabolita pirimidinico strutturalmente e farmacologicamente simile alla Citarabina.

La Gemcitabina è indicata nella cura del tumore del pancreas e del tumore polmonare non a piccole cellule, ma è anche attiva verso molti altri tumori solidi. La sua attivazione necessita della fosforilazione intracellulare al derivato 5'-trifosfato che viene incorporato al terminale di una catena di DNA in formazione. Un problema che si riscontra nel suo utilizzo è la rapida deaminazione da parte della citidina deaminasi nel sangue, fegato, rene ed altri tessuti, al metabolita inattivo, la 2',2'-difluorodesossipuridina. Per questo motivo, essa possiede un'emivita plasmatica molto breve, di 8-17 min.

Schema 3

Per migliorare la stabilità metabolica della Gemcitabina e quindi l'attività citotossica, si è provato a somministrarla incorporata in liposomi; però a causa del basso peso molecolare e della elevata idrosolubilità, essa diffonde rapidamente attraverso i liposomi, limitando l'efficacia dell'incorporazione e l'utilità clinica di queste formulazioni. Per rallentarne la degradazione metabolica, abbiamo sintetizzato una serie di suoi profarmaci a lipofilia crescente e li abbiamo incorporati nei liposomi.

Abbiamo sintetizzato i derivati 4-(N)-valeroile 1, 4-(N)-eptanoile 2, 4-(N)-lauroile 3 e 4-(N)-stearoile 4 (schema 3), secondo due diversi metodi. Il primo prevede la reazione dell'etil clorocarbonato e dell'acido grasso corrispondente, in presenza di trietilammina, per dare l'anidride mista intermedia. Alla miscela di

reazione contenente l'anidride, viene direttamente aggiunta la Gemcitabina, fornendo il profarmaco ammidico con rese elevate. Mediante il secondo metodo, l'anidride lipofila viene fatta reagire direttamente con la Gemcitabina; questa sintesi è risultata meno specifica della precedente ed ha fornito rese più basse.

Abbiamo ottenuto liposomi di varia composizione e studiato l'efficienza dell'incorporazione in funzione della polarità del farmaco. In generale, l'incorporazione della Gemcitabina è risultata molto bassa. Le varie formulazioni liposomiali hanno mostrato una bassa efficienza d'incorporazione dei profarmaci meno lipofili: per la 4-(N)-valeroilgemcitabina 1, si è arrivati al massimo a 0,3 di frazione molare rispetto alle moli di lipide; per la 4-(N)-eptanoilgemcitabina 2, il valore è risultato dell'1,7%. I risultati migliori sono stati ottenuti con la 4-(N)-lauroilgemcitabina 3 e con la 4-(N)-stearoilgemcitabina 4. Per esempio, i liposomi composti da distearoilfosfatidilcolina / distearoilfosfatidilglicerolo, 9/1, con il 20% di colesterolo, hanno fornito un'elevata incorporazione di profarmaco: sia per il lauroil- 3 che per lo stearoil-derivato 4 si è arrivati al 25% di frazione molare.

Abbiamo poi testato la stabilità a diversi pH dei due profarmaci più interessanti la lauroil- 3 e la stearoilgemcitabina 4. In vari tamponi a pH compresi tra 4 e 9, a 37 °C, essi sono rimasti inalterati per più di 24 h a 37 °C, confermando l'elevata stabilità del legame ammidico. Anche nel plasma, i profarmaci 3 e 4 hanno mostrato un'elevata stabilità ed una notevole resistenza alla deamminazione. A differenza della Gemcitabina che viene rapidamente degradata nel plasma, la cinetica di degradazione a 37 °C ha mostrato che dopo 8 h è ancora presente il 90% di profarmaco inalterato, mentre dopo 24 h ne è ancora presente più del 60%.

Per valutare l'idrolisi selettiva del legame ammidico dei lauroil e stearoil derivati della Gemcitabina all'interno della cellula da parte degli enzimi lisosomiali, li abbiamo incubati con le catepsine B e D. Dopo 24 h, il 60% del profarmaco aveva subito idrolisi del legame ammidico, senza verificarsi degradazione della Gemcitabina libera.

Abbiamo studiato la stabilità delle varie formulazioni liposomiali contenenti la lauroil- 3 e la stearoilgemcitabina 4 in tampone a pH 7,4, a 4 °C. La più stabile è stata quella composta da distearoilfosfatidilcolina / distearoilfosfatidilglicerolo, 9:1, con o senza colesterolo, che ha mantenuto inalterato il contenuto di farmaco anche dopo 21 giorni.

Abbiamo studiato la citotossicità della lauroilgemcitabina 3 e della stearoilgemcitabina 4, sia da sole, che nella formulazione liposomiale precedentemente descritta, su culture cellulari di adenocarcinoma HT-29 del colon e di carcinoma KB nasofaringeo. Esse hanno mostrato una attività citotossica da 2 a 5 volte superiore a quella della Gemcitabina e la citotossicità è rimasta invariata dopo l'incorporazione nei liposomi.

Infine abbiamo studiato la farmacocinetica su topo della 4-(N)-stearoilgemcitabina 4, sia da sola che in formulazione liposomiale, somministrata per bolo endovenoso, comparandola con quella della Gemcitabina. Abbiamo determinato tutti i parametri farmacocinetici, dai quali si può osservare che l'incorporazione della 4-(N)-stearoilgemcitabina 4 nei liposomi riduce notevolmente i parametri relativi al volume di distribuzione, rimanendo confinata nella circolazione sistemica, a differenza della Gemcitabina e del profarmaco 4, che posseggono un elevato volume di distribuzione e sono quindi distribuiti ampiamente nei tessuti. Inoltre la formulazione liposomiale del profarmaco 4 è caratterizzata da un'elevata emivita plasmatica.

Quindi il legame chimico della Gemcitabina con un acido grasso a lunga catena, come nello stearoil derivato e la successiva incorporazione del profarmaco lipofilo nei liposomi, proteggono la Gemcitabina dalla degradazione plasmatica. Infine gli studi di citotossicità, di farmacocinetica e di stabilità nel plasma indicano che le nuove formulazioni liposomiali della 4-(N)-stearoilgemcitabina 4 offrono condizioni ottimali per il targeting passivo della Gemcitabina nelle cellule tumorali.

Successivamente abbiamo ottenuto nanosfere e nanocapsule di cianoacrilato, incorporando in esse la Gemcitabina 64, ed i profarmaci 4-(N)-valeroilgemcitabina 65, 4-(N)-lauroilgemcitabina 67, 4-(N)-stearoilgemcitabina 68 e 4-(N)-squalenoilgemcitabina 69 (figura 5).

Figura 5

La 4-(N)-squalenoilgemcitabina 69 è stata sintetizzata partendo dall'acido squalenico (a sua volta preparato a partire dallo squalene), per reazione con la Gemcitabina in presenza di trietilammina ed etil cloroformiato. Le nanosfere e le nanocapsule contenenti i derivati della Gemcitabina sono state preparate per nanoprecipitazione del poli(H₂NPEGCA-co-HDCA) copolimero, usando acetone come solvente organico. Per le nanocapsule, il Miglyol 812N è stato aggiunto per formare la cavità oleosa interna.

I risultati ottenuti indicano che l'efficienza d'incorporazione dei derivati della Gemcitabina dipende fortemente dalla polarità dei farmaci: la lipofilia della matrice delle nanosfere e la cavità interna oleosa delle nanocapsule non hanno consentito l'incorporazione della Gemcitabina 64 e del suo valeroil derivato 65.

Maggiore è risultata la lipofilia del profarmaco, maggiore è stata l'efficienza dell'incorporazione. In particolare, sono stati trovati i più elevati valori d'incorporazione con le nanosfere che incorporano la 4-(N)-squalenoilgemcitabina 69.

Tutte le nanoparticelle con diametro medio compreso tra 100 e 200 nm sono risultate stabili per almeno un mese a 4 °C. Abbiamo anche investigato i descrittori della lipofilia della Gemcitabina e dei derivati: solo i profarmaci con Log P > 4 sono stati incapsulati con successo in queste nanoparticelle.

Concludendo, i risultati ottenuti incorporando i profarmaci della Gemcitabina nelle nanoparticelle sono simili a quelli precedentemente discussi per l'incorporazione degli stessi nei liposomi: più alta è la lipofilia del profarmaco, più alta risulta l'efficienza d'incorporazione.

Abbiamo studiato alcuni dei nuovi profarmaci lipofili della Gemcitabina da noi sintetizzati, la 4-(N)-valeroilgemcitabina, la 4-(N)-lauroilgemcitabina e la 4-(N)-stearoilgemcitabina nell'interazione con biomembrane, mediante studi di calorimetria a scansione differenziale. Questi studi sono stati condotti in collaborazione con il Professore Francesco Castelli dell'Università degli Studi di Catania.

E' stata studiata la serie dei tre profarmaci a lipofilia crescente, per valutare l'effetto della lunghezza della catena acilica nella capacità di interagire con un modello di biomembrane in un compartimento acquoso e per avere un'informazione biomimetica sul loro carattere lipofilo e sulla solubilità. Queste interazioni sono state studiate mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC), una tecnica non perturbativa, ampiamente impiegata per gli effetti esercitati dalle biomolecole sui doppi strati lipidici di una membrana tipo quella cellulare nei processi di cattura e rilascio all'interno delle vescicole lipidiche.

Come modelli sintetici di biomembrane, sono stati impiegati liposomi MLV e LUV che danno una netta transizione di fase da una struttura ordinata tipo gel a una struttura disordinata tipo fluida. La tecnica DSC rileva queste transizioni di fase. La presenza di sostanze estranee disciolte nel doppio strato lipidico influenza notevolmente le proprietà termodinamiche della transizione di fase; per esempio una sostanza disciolta nel doppio strato lipidico normalmente destabilizza la struttura ordinata, abbassando la temperatura di transizione.

In questo studio, è stata usata la tecnica DSC per studiare l'interazione della Gemcitabina e di suoi tre profarmaci, la 4-(N)-valeroilgemcitabina, la 4-(N)-lauroilgemcitabina e la 4-(N)-stearoilgemcitabina, con liposomi MLV e LUV composti da dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e da distearoilfosfatidilcolina (DSPC), e per monitorare esperimenti di trasferimento dei composti in funzione del tempo. Detti studi hanno riguardato il trasferimento di questi composti attraverso un mezzo acquoso e la migrazione da liposomi contenenti una quantità nota di Gemcitabina o dei suoi 4-(N)-acil derivati a liposomi vuoti. La comparazione dei dati ottenuti con il metodo classico, con quelli ottenuti da esperimenti di trasferimento, fornisce informazioni sulla reale capacità di un composto di permeare lo strato acquoso che circonda la membrana lipidica, raggiungere lo strato lipidico esterno e passare attraverso tutti gli strati lipidici, penetrando in una struttura tipo modello cellulare. In questo modo si possono avere evidenze della maggiore capacità dei 4(N)-acil derivati rispetto alla Gemcitabina pura di sciogliersi nelle vescicole lipidiche, per avere una maggiore capacità di incorporazione, e inoltre modulare il rilascio del farmaco antitumorale cambiando il tipo di fosfolipide liposomiale.

I risultati ottenuti suggeriscono che la Gemcitabina da sola non interagisce con i modelli di biomembrane usati, rappresentati da DMPC MLV e LUV e da DSPC MLV. Invece, i 4-(N)-acil derivati della Gemcitabina mostrano un'interazione con i modelli di biomembrane considerati, interazione dipendente dalla lunghezza della catena acilica dei fosfolipidi dei modelli di biomembrane e di quella dei profarmaci. I profarmaci causano un decremento della temperatura di transizione rispetto a quella dei fosfolipidi da soli. Comparando i risultati ottenuti con i DMPC MLV con quelli ottenuti con i DSPC MLV, la 4-(N)-valeroilgemcitabina ha mostrato un effetto simile verso i due tipi di lipidi che formano le membrane modello. I lauroil e stearoil derivati hanno mostrato un diverso comportamento negli MLV preparati in loro presenza, da cui si evince che maggiore è la differenza di lunghezza di catena fra il fosfolipide e il profarmaco, maggiore risulta l'effetto destabilizzante del profarmaco. Anche i risultati ottenuti nei liposomi MLV e LUV, con le cinetiche di permeazione dei profarmaci e degli acidi grassi da soli, sono in accordo con le precedenti considerazioni.

Sui profarmaci della Gemcitabina discussi in precedenza, sono stati eseguiti degli studi in collaborazione con il Professore Francesco Castelli dell'Università degli Studi di Catania utilizzando la tecnica di Langmuir-Blodgett. Nel 1917 Irving Langmuir constatò che le molecole anfifiliche erano in grado di formare un monolayer di spessore monomolecolare, se adeguatamente deposte su una superficie acquosa. Il monolayer è un sistema bidimensionale, generalmente studiato con il metodo del film-balance di Langmuir-

Adam che in seguito a variazioni di pressione superficiale, area e temperatura, fornisce utili informazioni sulla distribuzione e sull'orientamento molecolare. Questo metodo costituisce uno strumento per lo studio dell'organizzazione dei fosfolipidi di membrana e può essere affiancato alle notizie sulla permeabilità di membrana documentate dai lavori sui liposomi condotti mediante analisi DSC.

L'uso dei monolayers, come modelli di membrana, deriva dal fatto che essi rappresentano la metà di un doppio strato lipidico (bilayer), avendo caratteristiche direttamente legate alle proprietà di quest'ultimo e apparentemente più simili alle membrane naturali. Il monolayer può essere considerato come un gas bidimensionale e quando l'area disponibile è tale che la distanza tra le molecole adiacenti risulta elevata, le interazioni sono deboli e in queste condizioni il monolayer ha un piccolo effetto sulla tensione superficiale dell'acqua. Se l'area disponibile al monolayer è ridotta da un sistema di barriere, incominciano a manifestarsi effetti repulsivi tra le molecole del film. Il metodo del film-balance permette quindi di ottenere diagrammi di fase dei fosfolipidi, rappresentabili generalmente con curve isoterme "pressione superficiale/area per molecola" (\square/A quadrato).

I risultati ottenuti evidenziano che la Gemcitabina e la 4-(N)-valeroilgemcitabina non forniscono nessuna isoterma pressione superficiale/area per molecola, a causa del loro carattere idrofilo. Le prodrugs lauroil- e stearoilgemcitabina, essendo particolarmente lipofile, presentano delle isoterme ben definite. L'incorporazione delle prodrugs nei monolayer provoca variazioni corrette o negative sull'unione di quest'ultimo in funzione della capacità di questi composti di adattare la propria struttura a quella del fosfolipide.

Dal confronto dei risultati ottenuti dagli esperimenti calorimetrici con quelli di Langmuir-Blodgett si evince che i dati sono in accordo tra di loro: la Gemcitabina da sola non è in grado di interagire con i modelli di membrana studiati, invece la gemcitabina coniugata mostra una sostanziale migliore interazione con i modelli di membrana e l'entità di tale interazione dipende sia dalla lunghezza della catena idrocarburica dei fosfolipidi costituenti le membrane modello, sia dalla lunghezza della catena idrocarburica delle prodrugs.

In un altro lavoro è stata studiata l'interazione dell'Aciclovir e della sua prodrug lipofila squalenoilaciclovir con modelli di biomembrane. L'Aciclovir è un farmaco antivirale della famiglia degli analoghi nucleosidici (derivati della guanina), substrati naturali della DNA e RNA polimerasi. L'efficacia dell'Aciclovir risiede nel trattamento del virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV 1) e di tipo 2 (HSV 2), della varicella zoster ed è importante nel trattamento della infezione da citomegalovirus.

Lo studio concerne gli effetti dell'Aciclovir e dello squalenoilaciclovir nei confronti di biomembrane liposomiali (MLVS) mediante la tecnica della calorimetria a scansione differenziale (DSC). Per acquisire una serie di informazioni più dettagliate sono state eseguite le DSC anche dello squalene e dell'acido squalenico. I risultati mostrano che i composti interagiscono con il sistema liposomiale in modi differenti. L'Aciclovir e lo squalene non hanno effetto sulla temperatura di transizione T_m , mentre sia lo squalenoilaciclovir che lo squalene acido producono un decremento della temperatura di transizione T_m provocando una destabilizzazione della membrana dovuta all'inserimento dei composti tra le molecole fosfolipidiche. Questo dimostra che lo squalenoilaciclovir riesce a distribuirsi facilmente negli strati fosfolipidici, per cui i liposomi potrebbero essere usati come validi carrier per l'incorporazione e il lento rilascio di prodrug squaleniche.

Abbiamo discusso gli studi farmacocinetici, di distribuzione e clinici della Doxorubicina liposomiale pegilata (PLD) 70 (figura 6).

70

Figura 6

Nella PLD, la Doxorubicina è incorporata in liposomi ricoperti di un polimero idrofilo, il polietilen glicole (PEG). Questi liposomi hanno un tempo di circolazione plasmatica di molti giorni e sono denominati "stealth" per la loro capacità di evadere l'intercettazione da parte del sistema immunitario.

La PLD 70 è attualmente l'unico liposoma stealth approvato negli Stati Uniti ed in Europa per il trattamento del sarcoma di Kaposi e dei tumori ovarico e mammario. La PLD ha mostrato un'emivita plasmatica di 2-3 giorni, ma è ancora rilevabile dopo una o due settimane dalla somministrazione. La sua concentrazione plasmatica è molto elevata, fino a mille volte superiore rispetto alla curva concentrazione/tempo della Doxorubicina libera. Dopo somministrazione endovenosa della PLD, la maggior parte della Doxorubicina plasmatica rimane incapsulata nei liposomi. La maggior parte della Doxorubicina si distribuisce nei tessuti sani, come il tratto gastrointestinale ed il miocardio. La PLD ha una clearance e un

volume di distribuzione di 5-7 litri, molto minore del volume apparente di distribuzione della Doxorubicina libera, che va da 1400 a 3000 litri. Questo indica che la farmacocinetica della PLD dipende dalla struttura particolare del carrier liposomiale pegilato, dato che la maggior parte del farmaco viene rilasciato ai tessuti in forma associata ai liposomi.

Sono stati condotti studi clinici con PLD in pazienti con tumore ovarico epiteliale o tumori di origine peritoneale resistenti al platino o al Paclitaxel. La somministrazione di PLD a pazienti con tumore ovarico ricorrente ha dato una sopravvivenza media di 15 mesi, mentre quelli trattati con Doxorubicina libera hanno mostrato una sopravvivenza media di 6-7 mesi.

Inoltre abbiamo studiato l'accumulo e la tossicità della Doxorubicina liposomiale pegilata (PLD) 70 (figura 7).

70

Figura 7

Normalmente, per iniezione endovenosa della Doxorubicina, meno dell'1% del farmaco raggiunge le cellule tumorali, mentre con i liposomi pegilati, i livelli di Doxorubicina nei tumori sono risultati fino a 10 volte superiori. Studi effettuati su animali e pazienti portatori di tumori hanno mostrato che il picco di cattura dei liposomi pegilati da parte dei tessuti tumorali viene raggiunto da 48 a 72 ore dopo l'iniezione. La Doxorubicina incapsulata viene rilasciata dai liposomi stealth nell'interstizio dei tumori, per giorni o anche per settimane dopo la somministrazione, a differenza della Doxorubicina libera che assicura l'esposizione delle cellule tumorali al farmaco solo per poche ore dopo una singola somministrazione. Pertanto, a causa della lunga esposizione delle cellule tumorali alla Doxorubicina pegilata, quando il farmaco viene liberato dai liposomi nell'interstizio delle cellule, esso può penetrare nel tumore attraverso molti strati cellulari, molto oltre il punto raggiunto dal liposoma stesso.

La principale tossicità dose-dipendente della PLD si manifesta in una reazione acuta nella sede dell'infusione, in mucosite ed in tossicità cutanea. La mucosite è un fenomeno tossico comune e spesso dose-limitante dopo una singola iniezione contenente un'elevata dose di PLD. La eritrodismetria palmare è stata associata anche alla terapia liposomiale di Antraciclina. I problemi si verificano specialmente dopo dosaggi ripetuti a dosi elevate o a brevi intervalli di dosaggio. I liposomi stealth probabilmente si accumulano nella pelle e particolarmente nelle aree a contatto, a causa dell'aumento locale e temporaneo della permeabilità vascolare. La PLD è meno mielotossica della Doxorubicina, in quanto la trombocitopenia e l'anemia risultano molto rare. Inoltre, con la PLD è stata osservata una cardiotossicità minima, anche in pazienti che hanno ricevuto elevate dosi cumulative. Le proprietà farmacologiche della PLD, così come gli elevati livelli plasmatici che rimangono per un tempo prolungato, e la diminuita distribuzione al muscolo cardiaco, sono i principali fattori responsabili della minore cardiotossicità della PLD rispetto a quella della Doxorubicina libera.

Abbiamo ottenuto nuove formulazioni liposomiali stealth direzionanti il recettore del folato, il cui recettore è iperespresso in alcuni tumori. L'uso dell'acido folico per il direzionamento attivo di farmaci è importante nella terapia antitumorale, specialmente nel tumore ovarico che iperesprime il recettore del folato nel 90% dei casi, ma anche in molti altri tipi di tumore. L'acido folico è un agente direzionante a basso peso molecolare, con molti vantaggi rispetto agli anticorpi monoclonali, come un limitato aumento di peso ed una mancanza di antigenicità. Pertanto i coniugati con l'acido folico entrano facilmente nelle cellule tumorali che iperesprimono il recettore, via endocitosi recettore-mediata, raggiungendo il citoplasma delle cellule bersaglio.

Abbiamo ottenuto nuovi coniugati PEG-folato, usando due diversi leganti: AMPT (schema 4) e SATA (schema 5), che differiscono per la carica, in quanto l'AMPT possiede una carica positiva, mentre il SATA è neutro.

Schema 4

Schema 5

Per la sintesi, il bis-(ammino)-PEG3350 è stato fatto reagire con l'acido folico ed il derivato PEG-folato è stato purificato. Per reazione del PEG-folato con l'AMPT o con il SATA, sono stati ottenuti gli intermedi. Questi derivati sono stati coniugati con la DSPE-MC (distearoilfosfatidiletanolamina-acido ϵ -maleimmidocapronico) da noi preparata, dando i coniugati del folato.

I liposomi stealth sono stati ottenuti aggiungendo la miscela fosfolipidica composta di DSPC/CHOL/DSPE-PEG2000 ai coniugati dell'AMPT o del SATA, in rapporto 10:5:0,4:0,1. Abbiamo determinato il potenziale zeta delle diverse preparazioni liposomiali, da cui si evince che il coniugato DSPE-SATA-PEG-folato non modifica la carica superficiale delle vescicole. I liposomi formulati con il coniugato DSPE-AMPT-PEG-folato hanno mostrato valori di potenziali zeta più positivi.

Gli studi di citometria a flusso sono stati condotti su cellule KB-3.1 di carcinoma nasofaringeo e HT-29 di adenocarcinoma del colon, per valutare la maggiore internalizzazione dei liposomi folatati stealth nelle cellule tumorali, rispetto a quelle normali. I risultati mostrano una maggiore internalizzazione dei liposomi folatati da parte delle cellule tumorali, rispetto a quelle normali.

Abbiamo sviluppato un nuovo sistema di veicolazione e direzionamento di farmaci mediante albumina umana (HSA). Abbiamo affrontato due progetti di preparazione di farmaci macromolecolari: il primo riguarda il trasporto e il direzionamento del farmaco antitumorale Paclitaxel, mentre il secondo riguarda il direzionamento intracellulare di Desossispergualina, in studi sulla fibrosi cistica.

Nel direzionamento del Paclitaxel (PTX), il PEG3350-folato [ottenuto per reazione del folato-NHS con il bis(ammino)PEG3350] è stato derivatizzato con NHS-capronilmaleidiimmide (schema 6).

Schema 6

Parallelamente, l'albumina umana (HSA) è stata coniugata con il PTX-NHS al derivato HSA-PTX, del quale sono stati poi liberati i cinque gruppi tiolici mediante l'attività riducente del ditiotreitolo, formando il derivato. La coniugazione finale avviene per reazione diretta dei gruppi tiolici dell'HSA-PTX ridotto e il gruppo maleimmidico, per formare, mediante un legame tioetero stabile in vivo, il coniugato finale.

In un altro studio abbiamo sintetizzato il prodotto acido folico-PEG-Procion BluMX, mediante reazione tra l'ammino-PEG3350-folato ed il Procion BluMX, un colorante antrachinonsolfonico (schema 7).

Schema 7

Sfruttando l'elevata costante di affinità tra l'HSA ed il colorante, abbiamo ottenuto un coniugato caratterizzato da un legame non-covalente. Questo è stato ottenuto dalla coniugazione tra l'HSA-PTX, ottenuto come descritto in precedenza, ed il colorante direzionato con il folato.

Il principale vantaggio nella preparazione del coniugato, caratterizzato da legami stabili non covalenti, risiede nella non modificazione dell'HSA, preservando quindi il legame con il PTX.

Un altro progetto ha riguardato l'approccio della veicolazione nello studio del meccanismo d'azione della principale proteina (DF508-CFTR) implicata nella fibrosi cistica. Il farmaco è la Desossispergualina (schema 8), una molecola in grado di intervenire nel processo di maturazione e di degradazione di proteine.

L'obiettivo è la realizzazione di vettori in grado di stabilizzare il farmaco e di trasportarlo sul reticolo endoplasmatico, sito in cui avvengono sia il refolding che la degradazione delle proteine. In tal modo si incrementa il corretto refolding della CFTR, aumentandone l'espressione sulla superficie cellulare.

Schema 8

Abbiamo derivatizzato la Desossispergualina sul terminale amminico mediante leganti eterobifunzionali, la NHS-capronilmaleidiimmide e l'SPDP, generando i derivati reattivi in grado di legarsi stabilmente, con legami riducibili o meno, ai vettori. Come vettore proteico abbiamo studiato la HSA. Questo sistema che opera da modello è stato confrontato con il sistema che usa come modello la Ricina "disarmata". Questa è una variante inattiva ricombinante di tossina che viene trasportata nel reticolo endoplasmatico per via retrograda e permette il trasporto della Desossispergualina sul reticolo endoplasmatico. I derivati della Desossispergualina sono in fase di test su colture cellulari esprimenti sia CFTR wt che DF508-CFTR.

Abbiamo sintetizzato e studiato l'attività di transfezione nella terapia genica di nuovi lipidi cationici, saturi e insaturi. Abbiamo ottenuto derivati con catene etero, dodeciliche, 2,3-diidrofarnesiliche, tris-nor-squaleniliche e tris-nor-squalaniliche, con sostituenti metilici e 2-idrossietilici legati all'atomo di azoto (schema 9).

Inizialmente abbiamo sintetizzato i derivati metansulfonilici del dodecanolo, dell'1,1',2-tris-nor-squalene alcol e dell'1,1',2-tris-nor-squalano alcol e di un derivato del farnesolo, che abbiamo ottenuto mediante riduzione selettiva del doppio legame vicinale al gruppo alcolico. Per reazione tra il 3-(dimetilammino)-1,2-propandiolo ed i metansulfonati, in presenza di terz-butossido di potassio, sono stati ottenuti i dieteri. La trasformazione nei sali ammonici quaternari corrispondenti con ioduro di metile ha fornito i derivati trimetilici, mentre per reazione con 2-bromoetanolo sono stati ottenuti i derivati dimetil-2-idrossietilici.

Schema 9

Per la preparazione dei liposomi, i lipidi cationici sono stati mescolati in rapporto 1:1 con il colipide fusogenico dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). Sono state ottenute varie formulazioni liposomiali con diverse proporzioni di lipidi cationici, in rapporto 1:1 con il DOPE, e queste sono state complessate con il DNA plasmidico. Le dimensioni delle vescicole sono aumentate incrementando il rapporto lipide/DNA fino ad un massimo di rapporto lipide/DNA di 5:1. I complessi hanno mostrato potenziali zeta negativi fino ad un rapporto lipide/DNA di 5:1, mentre per un eccesso di lipide su DNA di 8:1, abbiamo ottenuto valori di potenziale zeta positivi.

Infine abbiamo studiato l'attività transfettante dei vari lipidi cationici, in miscela con il DOPE, su due linee cellulari normali e tre maligne con diverse capacità transfettanti: HEK 293 (rene umano fetale), CHO (ovaio di criceto cinese), A431 (carcinoma epidermoide umano), KB (carcinoma nasofaringeo umano) e IGROV1 (carcinoma ovarico umano). Abbiamo comparato l'attività transfettante dei nostri lipidi cationici con quella dei lipidi cationici commerciali, LipofectinTM ed EscortTM.

Le due linee cellulari normali hanno mostrato un'elevata efficienza nella transfezione, sia con i nostri lipidi cationici, che con i composti commerciali, ma i derivati dodecilici e farnesilici hanno mostrato un'attività leggermente superiore. Sulle tre linee cellulari tumorali, la capacità transfettante dei derivati dodecilici e farnesilici è risultata da dieci a cento volte superiore di quella dei derivati commerciali. L'incremento è risultato particolarmente evidente per le cellule IGROV1, che hanno mostrato un aumento di efficienza transfettante da parte del composto 2-idrossietilico di circa mille volte, rispetto alla lipofectina commerciale.

Sono stati sintetizzati e formulati in forma nanoparticellare la 1,1',2-tris-nor-squalenoilcitarabina (squalenoil-ARA-C). Questi studi sono stati condotti in collaborazione con il gruppo di ricerca del Professore Massimo Fresta dell'Università degli Studi "Magna Graecia" di Catanzaro. Le nanoparticelle hanno mostrato un diametro medio di circa 150 nm e una bassa polidispersione. Abbiamo studiato l'attività antitumorale in vitro su differenti linee cellulari leucemiche, murine (L1210, responsiva all'ARA-C e L1210R resistente), umane leucemiche (K562) e una linea umana di tumore mammario (MCF-7). La sq-Ara-C ha portato a una riduzione del dosaggio di circa 2 volte rispetto all'ARA-C, con una contemporanea riduzione dei valori di IC50 di 2,5 volte per le cellule L1210R, di 4 volte per le K562 e MCF-7, rispetto all'ARA-C. Solo, alla dose dimezzata, l'attività sulle cellule L1210 è risultata simile, a causa dell'elevata sensibilità delle cellule al farmaco. Abbiamo studiato l'interazione della squalenoil-ARA-C triziata e, anche con quelle marcate con fluoresceina con le cellule; per le cellule K562, L1210 e L1210R il picco d'interazione è stato raggiunto dopo 4 h, mentre con le cellule MCF7 è stato raggiunto dopo 12 h. Abbiamo studiato l'attività in vivo della squalenoil-ARA-C su un modello leucemico murino L1210R. I risultati hanno mostrato una notevole riduzione dello sviluppo della malattia. Abbiamo studiato la biodistribuzione della squalenoil-ARA-C triziata nei topi DBA/2. Dopo 1 h, le nanoparticelle si sono localizzate principalmente nella milza, fegato e polmoni e molto meno negli altri organi, mentre una grande quantità è localizzata nel sangue. Dopo 24 h la quantità presente nel sangue è risultata molto ridotta, con una maggiore concentrazione negli organi RES. La squalenoil-ARA-C ha mostrato un'emivita plasmatica circa 6 volte maggiore rispetto a quella dell'ARA-C. L'ARA-C è risultata non più rilevabile nel sangue dopo 12 h dalla somministrazione, mentre la squalenoil-ARA-C è risultata misurabile nel plasma anche dopo 24 h.

E' stata studiata l'interazione dell'ARA-C e della sua prodrug lipofila squalenoil-ARA-C con modelli di biomembrane. Questi studi sono stati condotti in collaborazione con il gruppo di ricerca del Professore Francesco Castelli dell'Università degli Studi di Catania, utilizzando la tecnica di Langmuir-Blodgett. Lo studio concerne in particolare gli effetti dell'ARA-C e della sua prodrug lipofila squalenoil-ARA-C nei confronti di

biomembrane liposomiali (MLVS) mediante la tecnica della calorimetria a scansione differenziale (DSC). Per acquisire una serie di informazioni più dettagliate sono state eseguite le DSC anche dello squalene e dell'acido squalenico. I risultati ottenuti mostrano che i nuovi composti da noi sviluppati interagiscono con il sistema liposomiale in modi differenti. L'ARA-C e lo squalene non hanno effetto sulla temperatura di transizione T_m , mentre sia la squalenoil-ARA-C che lo squalene acido producono un decremento della temperatura di transizione T_m , provocando una destabilizzazione della membrana dovuta all'inserimento dei composti tra le molecole fosfolipidiche. Questo dimostra che la squalenoil-ARA-C riesce a distribuirsi facilmente negli strati fosfolipidici, per cui i liposomi potrebbero essere usati come validi carrier per l'incorporazione e il lento rilascio di prodrugs squaleniche.

Sono state sviluppate nuove micelle polimeriche come "Colloidal Drug Delivery Systems" al fine di veicolare e direzionare un farmaco verso un organo o un tessuto bersaglio e di rilasciarlo in maniera prolungata nel tempo, minimizzando la perdita e la prematura degradazione dello stesso in seguito a disattivazione chimica e/o enzimatica, oltre ad aumentarne la biodisponibilità e ridurre gli effetti collaterali. Questi studi sono stati condotti in collaborazione con il gruppo di ricerca del Professore Gaetano Giammona dell'Università degli Studi di Palermo.

Abbiamo sintetizzato due nuovi copolimeri anfifilici e peghilati dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) e formulato questi come micelle polimeriche. In un tipico esempio, per la realizzazione delle micelle, il derivato peghilato del PHEA, il PHEA-PEG2000, è stato funzionalizzato con l'etilendiammina (EDA), al fine di ottenere il PHEA-PEG2000-EDA. Successivamente a tale copolimero sono stati legati due derivati aldeidici a struttura squalenoilica (SqCHO C17 e SqCHO C27). Le micelle sono state caratterizzate e abbiamo effettuato studi sulla loro stabilità in vitro in mezzi mimanti le condizioni fisiologiche.

Riassunto, l'inserimento nella struttura del PHEA di catene di PEG e derivati squalenici ha consentito di ottenere nuovi copolimeri con caratteristiche anfifiliche, in grado di auto-assemblarsi in mezzi acquosi anche in basse concentrazioni e di formare sistemi colloidali di tipo micellare. I risultati ottenuti hanno permesso di dimostrare che questi sistemi sono stabili nei diversi mezzi mimanti ambienti fisiologici, mostrano proprietà stealth che consentono loro di permanere per lungo tempo nel torrente ematico, sfuggendo alla cattura da parte degli organi RES e risultano internalizzati da cellule del colon e cellule nervose.

Maurizio CERUTI

PRODUZIONE SCIENTIFICA ORIGINALE

A) Pubblicazioni Scientifiche

- 1) Ceruti M., Degani I., Fochi R., Bis(2-acyloxy or aroyloxybenzene thiolates)mercury(II), as inhibitors of dermatophytes. *Allionia* 23, 25-33 (1978/79) (Torino, Italia).
- 2) Cadamuro S., Ceruti M., Fochi R., Regondi V., Bis(2-acyloxy or aroyloxybenzenethiolates)mercury(II), as inhibitors of Fusarium. *Allionia* 24, 115-124 (1980/81) (Torino, Italia).
- 3) Ceruti M., Ceruti A., Cantini Cortellezzi G., Guarda F., Micotossicosi acuta da *Aspergillus sulphureus*. *Summa* 1, 85-88 (1984) (Milano, Italia).
- 4) Cattel L., Delprino L., Balliano G., Viola F., Ceruti M., Chemistry, biosynthesis and function of sterols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 641-642 (1985) (Champaign, Illinois, USA).
- 5) Cattel L., Delprino L., Balliano G., Viola F., Ceruti M., Benveniste P., The squalene 2,3-epoxide cyclase, as a model for the development of new drugs. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 5 (1985) (Champaign, Illinois, USA).
- 6) Ceruti M., Bouvier-Navé P., Schuber F., Cattel L., N-oxides of long chain amines as inhibitors of squalene 2,3-epoxide cyclase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 6 (1985) (Champaign, Illinois, USA).
- 7) Ceruti M., Delprino L., Cattel L., Bouvier-Navé P., Duriatti A., Schuber F., Benveniste P., N-oxide as a potential function in the design of enzyme inhibitors. Application to 2,3-epoxysqualene-sterol cyclases. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1054-1055 (1985) (Cambridge, Regno Unito).

- 8) Cattel L., Ceruti M., Viola F., Delprino L., Balliano G., Duriatti A., Bouvier-Navé P., The squalene-2,3-epoxide cyclase as a model for the development of new drugs. *Lipids* 21(1), 31-38 (1986) (Champaign, Illinois, USA).
- 9) Ceruti A., Ceruti M., *Funghi cancerogeni ed anticancerogeni dell'ambiente, degli alimenti, dei mangimi*. Musumeci Ed., 235 pp. (1986) (Aosta, Italia).
- 10) Pugliese A., Vidotto V., Parisi L., Vitale M., Schioppacassi G., Ceruti M., Tovo P.A., In vitro activity of *,*,* human interferons and *Aspergillus terreus* mycotoxins on cell proliferation. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* 65, 530-537 (1986) (Milano, Italia).
- 11) Ceruti A., Ceruti M., Vigolo G., I composti naturali antitumorali di origine vegetale. *Giorn. Batt. Virol. Immun.* 79, 187-198 (1986) (Torino, Italia).
- 12) Pugliese A., Vidotto V., Ceruti M., Biglino A., Effetto antiproliferativo di un estratto di *Aspergillus terreus*. *Giorn. Batt. Virol. Immun.* 79, 272-278 (1986) (Torino, Italia).
- 13) Ceruti M., Degani I., Fochi R., A new synthetic application of 1,3-benzodithiolium cations: Synthesis of aldehydes by 1-carbon homologation of carbonyl compounds. *Synthesis* 79-82 (1987) (Stuttgart, Germania; New York, USA).
- 14) Ceruti A., Ceruti M., Micotossine. In *Aggiornamenti di Patologia Clinica*, UTET Ed., pp. 207-219 (1987) (Torino, Italia).
- 15) Barbero M., Cadamuro S., Ceruti M., Degani I., Fochi R., Regondi V., A simple synthesis and some chemical properties of benzo-1,4-dithiafulvenes. *Gazz. Chim. Ital.* 117, 227-235 (1987) (Roma, Italia).
- 16) Ceruti M., Balliano G., Viola F., Cattel L., Gerst N., Schuber F., Synthesis and biological activity of azasqualenes, bis-azasqualenes and derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 22, 199-208 (1987) (Châtenay-Malabry, Parigi, Francia).
- 17) Schmitt P., Gonzales R., Benveniste P., Ceruti M., Cattel L., Inhibition of sterol biosynthesis and accumulation of 2,3-oxidosqualene in bramble cell suspension cultures treated with 2-aza-2,3-dihydrosqualene and 2-aza-2,3-dihydrosqualene-N-oxide. *Phytochemistry* 26, 2709-2714 (1987) (Oxford, Regno Unito).
- 18) Reitano G., Ceruti M., Vigolo G., Tozzi M., Le tossine di *Aspergillus sulphureus* e di *A. terreus* su alcuni dermatofiti. *Allionia* 28, 171-174 (1987/88) (Torino, Italia).
- 19) Ceruti M., Viola F., Dosio F., Cattel L., Bouvier-Navé P., Ugliengo P., Stereospecific synthesis of squalenoid epoxide vinyl ethers as inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* 461-469 (1988) (Cambridge, Regno Unito).
- 20) Ceruti M., Viola F., Grosa G., Balliano G., Delprino L., Cattel L., Synthesis of squalenoid acetylenes and allenes, as inhibitors of squalene epoxidase. *J. Chem. Res. (S)* 18-19 (1988) (Cambridge, Regno Unito).
- 21) Ceruti M., Viola F., Grosa G., Balliano G., Delprino L., Cattel L., Synthesis of squalenoid acetylenes and allenes, as inhibitors of squalene epoxidase. *J. Chem. Res. (M)* 0239-0260 (1988) (Cambridge, Regno Unito).
- 22) Balliano G., Viola F., Ceruti M., Cattel L., Inhibition of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by N,N-diethylazasqualene and derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* 959, 9-19 (1988) (Amsterdam, Olanda).
- 23) Ceruti M., Viola F., Balliano G., Grosa G., Caputo O., Gerst N., Schuber F., Cattel L., Synthesis of a squalenoid oxaziridine and other new classes of squalene derivatives, as inhibitors of sterol biosynthesis. *Eur. J. Med. Chem.* 23, 533-537 (1988) (Châtenay-Malabry, Parigi, Francia).
- 24) Fiussello N., Vigolo G., Ceruti M., Sostanze mutagene e cancerogene in funghi del genere *Agaricus*. *Atti Accad. Sci. Torino* 122, 237-242 (1988) (Torino, Italia).

- 25) Viola F., Grosa G., Ceruti M., Caputo O., Cattel L., In vitro metabolism of azasqualene derivatives and their effects on aminopyrine N-demethylase activity in rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 38, 2497-2503 (1989) (New Haven, USA).
- 26) Ugliengo P., Ahmed J., Viterbo D., Calleri M., Ceruti M., Study of (1-alkoxyethyl)diphenylphosphine oxides. I. Syntheses and structural analyses of phenylethoxy, methoxy and isopentyloxy derivatives. *Gazz. Chim. Ital.* 119, 487-492 (1989) (Roma, Italia).
- 27) Ugliengo P., Ahmed J., Viterbo D., Ceruti M., Study of (1-alkoxyethyl)diphenylphosphine oxides. II. Conformational analysis by theoretical calculations. *Gazz. Chim. Ital.* 119, 493-502 (1989) (Roma, Italia).
- 28) Cattel L., Ceruti M., Balliano G., Viola F., Grosa G., Schuber F., Drug design based on biosynthetic studies: synthesis, biological activity, and kinetics of new inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase and squalene epoxidase. *Steroids* 53, 363-391 (1989) (San Francisco, USA).
- 29) Grosa G., Caputo O., Ceruti M., Biglino G., Franzone J.S., Cirillo R., Synthesis and antibronchospastic activity of theophylline thioacetal derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 24, 635-638 (1989) (Châtenay-Malabry, Parigi, Francia).
- 30) Caputo O., Grosa G., Ceruti M., Viola F., Rocco F., In vivo metabolism of the anti-inflammatory agent 2-(ethylpyridin-2-yl)benzimidazole. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 14, 263-268 (1989) (Ginevra, Svizzera).
- 31) Pogliani L., Viterbo D., Niccolai N., Ceruti M., Ugliengo P., Study of (1-alkoxyethyl)diphenylphosphine oxides. III. Nuclear magnetic resonance analysis. *Gazz. Chim. Ital.* 120, 41-52 (1990) (Roma, Italia).
- 32) Caputo O., Grosa G., Ceruti M., Rocco F., Biglino G., Metabolism of 1,1-dichloro-cis-diphenylcyclopropane by rat liver microsomes. *Drug Metab. Disp.* 18, 771-778 (1990) (Baltimore, USA).
- 33) Viola F., Ceruti M., Balliano G., Caputo O., Cattel L., 22,23-Epoxy-2-aza-2,3-dihydrosqualene derivatives: potent new inhibitors of squalene 2,3-oxide-lanosterol cyclase. *Il Farmaco* 45, 965-978 (1990) (Roma, Italia).
- 34) Pogliani L., Viterbo D., Giannini M., Ceruti M., Ugliengo P., Study of (1-alkoxyethyl)diphenylphosphine oxides. IV. Conclusive conformational study by NMR and molecular mechanics calculations. *Gazz. Chim. Ital.* 121, 81-88 (1991) (Roma, Italia).
- 35) Caputo O., Grosa G., Ceruti M., Rocco F., Biglino G., The metabolic fate of the anti-parkinsonian drug budipine in rats. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 16, 113-118 (1991) (Ginevra, Svizzera).
- 36) Grosa G., Caputo O., Ceruti M., Biglino G., Franzone J.S., Cravanzola C., Metabolism of 7-(1,3-dithiolan-2-ylmethyl)-1,3-dimethylxantine by rat liver microsomes. Diastereoselective metabolism of the 1,3-dithiolane ring. *Drug Metab. Disp.* 19, 454-457 (1991) (Baltimore, USA).
- 37) Balliano G., Viola F., Ceruti M., Cattel L., Characterization and partial purification of squalene-2,3-oxide cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archiv. Biochem. Biophys.* 293, 122-129 (1992) (New York, USA).
- 38) Cattel L., Ceruti M., 2,3-oxidosqualene cyclase and squalene epoxidase: enzymology, mechanism and inhibitors. *Lipids Special Edition: Physiology and Biochemistry of Sterols*, Patterson G.W. and Nes W.D., Eds., American Oil Chemists' Society, 50-82 (1992) (Champaign, Illinois, USA).
- 39) Cattel L., Ceruti M., Balliano G., Viola F., 2,3-Oxidosqualene cyclase and squalene epoxidase as target enzymes for the development of new sterol biosynthesis inhibitors. *Lipids Special Edition: Regulation of Isopentenoid Metabolism*, Nes W.D., Parish E.J. and Trzaskos J.M., Eds., American Chemical Society, 174-191 (1992) (Washington, USA).
- 40) Ceruti M., Berta G., Effects of 2-Aza-2,3-dihydrosqualene on fine structure and meristematic activity of root apical cells of *Allium porrum* L. *Life Science Adv.* 11, 115-123 (1992) (Sreekanteswaram, Trivandrum, India).

- 41) Ceruti M., Balliano G., Viola F., Grosa G., Rocco F., Cattel L., 2,3-Epoxy-10-aza-10,11-dihydrosqualene, a high-energy intermediate analogue inhibitor of 2,3-oxidosqualene cyclase. *J. Med. Chem.* 35, 3050-3058 (1992) (Washington, USA).
- 42) Ceruti M., Viola F., Balliano G., Grosa G., Rocco F., Azasqualene alcohol and derivatives. New selective inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase. *Atti Accad. Sci. Torino* 126, 131-141 (1992) (Torino, Italia).
- 43) Grosa G., Caputo O., Ceruti M., Biglino G., Metabolism of 7-(1,3-thiazolidin-2-ylmethyl)theophylline by rat liver microsomes. Evidence for a monooxygenase-dependent step in 1,3-thiazolidine ring cleavage. *Drug Metab. Disp.* 20, 742-746 (1992) (Baltimore, USA).
- 44) Dosio F., Brusa P., Delprino L., Ceruti M., Grosa G., Cattel L., A new "solid phase" procedure to synthesize immunotoxins (antibody-ribosome inactivating protein conjugates). *Il Farmaco* 48, 105-115 (1993) (Roma, Italia).
- 45) Balliano G., Milla P., Ceruti M., Viola F., Carrano L., Cattel L., Differential inhibition of fungal oxidosqualene cyclase by 6E and 6Z isomers of 2,3-epoxy-10-aza-10,11-dihydrosqualene. *FEBS Lett.* 320, 203-206 (1993) (Amsterdam, Olanda).
- 46) Grosa G., Rocco F., Ceruti M., Dosio F., Brusa P., Biglino G., In vitro metabolism of 1,3-dioxane, 1,3-oxathiolane and 1,3-dithiane derivatives of theophylline: a structure-metabolism correlation study. *Il Farmaco* 48, 677-690 (1993) (Roma, Italia).
- 47) Delprino L., Giacomotti M., Dosio F., Brusa P., Ceruti M., Grosa G., Cattel L., Toxin-targeted design for anticancer therapy. I: Synthesis and biological evaluation of new thioimidate heterobifunctional reagents. *J. Pharm. Sci.* 82, 506-512 (1993) (Washington, USA).
- 48) Delprino L., Giacomotti M., Dosio F., Brusa P., Ceruti M., Grosa G., Cattel L., Toxin-targeted design for anticancer therapy. II: Preparation and biological comparison of different chemically linked gelonin-antibody conjugates. *J. Pharm. Sci.* 82, 699-704 (1993) (Washington, USA).
- 49) Ceruti M., Rocco F., Viola F., Balliano G., Grosa G., Dosio F., Cattel L., Synthesis and biological activity of 19-azasqualene 2,3-epoxide as inhibitor of 2,3-oxidosqualene cyclase. *Eur. J. Med. Chem.* 28, 675-682 (1993) (Châtenay-Malabry, Parigi, Francia).
- 50) Ceruti A., Ceruti M., Vigolo G., *Botanica Medica, Farmaceutica e Veterinaria*, Zanichelli Ed., 686 pp. (1993) (Bologna, Italia).
- 51) Brusa P., Dosio F., Ceruti M., Grosa G., Cattel L., 2-Aza-2,3-dihydrosqualene: biodistribution and pharmacokinetic properties in mice. *Atti Accad. Sci. Torino* 127, 239-256 (1993) (Torino, Italia).
- 52) Pogliani L., Ceruti M., Ricchiardi G., Viterbo D., An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives. *Chem. Phys. Lipids* 70, 21-34 (1994) (Shannon, Irlanda; Austin, Minnesota, USA).
- 53) Airaudi D., Ceruti M., Giannetta A., Filipello Marchisio V., Fungitoxic activity of squalene derivatives towards dermatophytes. *Giornale Botanico Italiano*, 128, 391-392 (1994).
- 54) Dosio F., Brusa P., Delprino L., Grosa G., Ceruti M., Cattel L., A new approach in the synthesis of immunotoxins: ribosome inactivating protein noncovalently bound to monoclonal antibody. *J. Pharm. Sci.* 83, 206-211 (1994) (Washington, USA).
- 55) Ceruti M., Seraglia R., Traldi P., Mass spectrometric studies on azasqualenes, a class of 2,3-oxidosqualene cyclase inhibitors. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 59-64 (1994) (Londra, Regno Unito).
- 56) Grosa G., Viola F., Ceruti M., Brusa P., Delprino L., Dosio F., Cattel L., Synthesis and biological activity of a squalenoid maleimide and other classes of squalene derivatives as irreversible inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase. *Eur. J. Med. Chem.* 29, 17-23 (1994) (Châtenay-Malabry, Parigi, Francia).

- 57) Grosa G., Dosio F., Brusa P., Ceruti M., Delprino L., Cattel L., 2,3,4,5-Tetrahydroxy-5-(4-hydroxyphenyl)valeric acid: a new cleavable monofunctional reagent for monoclonal antibody labeling. *Il Farmaco* 49, 349-355 (1994) (Roma, Italia).
- 58) Cattel L., Ceruti M., Balliano G., Viola F., Grosa G., Rocco F., 2,3-oxidosqualene cyclase: from azasqualenes to new site-directed inhibitors. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 485 (1994) (Champaign, Illinois, USA).
- 59) Ceruti M., Grosa G., Rocco F., Dosio F., Cattel L., A convenient synthesis of [3-3H]squalene and [3-3H]-2,3-oxidosqualene. *J. Labelled Compd. Rad.* 34, 577-585 (1994) (East Hanover, USA).
- 60) Balliano G., Milla P., Ceruti M., Carrano L., Viola F., Brusa P., Cattel L., Inhibition of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* by 22,23-epoxy-2-aza-2,3-dihydrosqualene and the corresponding N-oxide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1904-1908 (1994) (Washington, USA).
- 61) Ceruti M., Amisano S., Milla P., Viola F., Rocco F., Jung M., Cattel L., Stereocontrolled synthesis of fluorosqualenes and fluoroepoxysqualenes as inhibitors of squalene epoxidase and 2,3-oxidosqualene cyclase. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* 889-893 (1995) (Cambridge, Regno Unito).
- 62) Cattel L., Ceruti M., Balliano G., Viola F., Grosa G., Rocco F., Brusa P., 2,3-Oxidosqualene cyclase: from azasqualenes to new site-directed inhibitors. *Lipids* 30(3), 235-246 (1995) (Champaign, Illinois, USA).
- 63) Airaudi D., Ceruti M., Giannetta A., Filipello Marchisio V., Preliminary screening of some squalenoid derivatives for toxicity towards dermatophytes. *Mycoses* 38, 311-315 (1995) (Berlino, Germania).
- 64) Boutaud O., Ceruti M., Cattel L., Schuber F., Retention of the label during the conversion of [3-3H]squalene into (3S)-2,3-oxidosqualene catalyzed by mammalian squalene oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 42-47 (1995) (Orlando, Florida, USA).
- 65) Viola F., Brusa P., Balliano G., Ceruti M., Boutaud O., Schuber F., Cattel L., Inhibition of 2,3-oxidosqualene cyclase and sterol biosynthesis by 10 and 19-azasqualene derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 50, 787-796 (1995) (New Haven, USA).
- 66) Airaudi D., Ceruti M., Bianco C., Filipello Marchisio V., In vitro susceptibility of fungi to acyclic inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclases. *Mycoses* 39, 51-56 (1996) (Berlino, Germania).
- 67) Taton M., Ceruti M., Cattel L., Rahier A. Inhibition of higher plant 2,3-oxidosqualene cyclases by nitrogen-containing oxidosqualene analogues. *Phytochemistry* 43, 75-81 (1996) (Oxford, Regno Unito).
- 68) Dosio F., Franceschi A., Ceruti M., Brusa P., Cattel L., Colombatti M., Enhancement of ricin toxin A chain immunotoxin activity: synthesis, ionophoretic ability, and in vitro activity of monensin derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 52, 157-166 (1996) (New Haven, USA).
- 69) Cattel L., Ceruti M., Inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase as tools for studying the mechanism and function of enzyme. *Lipids Special Edition: Biochemistry and Function of Sterols*, Parish E.J. and Nes W.D., Eds., American Oil Chemists' Society, 1-21 (1997) (Champaign, Illinois, USA).
- 70) Ceruti M., Seraglia R., Mass spectrometric behaviour of some 19-aza and 2-aza squalene derivatives. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 321-324 (1997) (Londra, Regno Unito).
- 71) Ceruti M., Rocco F., Viola F., Balliano G., Milla P., Arpicco S., Cattel L., 29-Methylidene-2,3-oxidosqualene derivatives as stereospecific mechanism-based inhibitors of liver and yeast oxidosqualene cyclase. *J. Med. Chem.* 41, 540-554 (1998) (Washington, USA).
- 72) Cattel L., Ceruti M., Inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase as tools for studying the mechanism and function of the enzyme. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 33, 353-373 (1998) (USA).
- 73) Milla P., Viola F., Ceruti M., Rocco F., Cattel L., Balliano G., 19-Azasqualene-2,3-epoxide and its N-oxide: metabolic fate and inhibitory effect on sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* 34(7) 681-688 (1999) (Champaign, Illinois, USA).

- 74) Pogliani L., Rossi P., Paoli P., Ceruti M., Conformational and dynamical study of squalene derivatives. – II – Vinyl oxidosqualenes. *Chem. Phys. Lipids* 103, 67-79 (1999) (Shannon, Irlanda; Austin, Minnesota, USA).
- 75) Ceruti M., Rocco F., Rational inhibition of sterol biosynthesis: new time-dependent inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase. *Life Science Adv.* 3, 111-126 (1999) (Sreekanteswaram, Trivandrum, India).
- 76) Cattel L., Ceruti M., Viola F., Balliano G., Milla P., Rocco F., Poralla K., Rationally designed inhibitors as tools for comparing the mechanisms of squalene hopene cyclase and oxidosqualene cyclases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55-56 (1999) (Champaign, Illinois, USA).
- 77) Pogliani L., Milanesio M., Ceruti M., Viterbo D., Conformational and dynamical study of squalene derivatives. – III – Azasqualenes and solvated squalene. *Chem. Phys. Lipids* 103, 81-93 (1999) (Shannon, Irlanda; Austin, Minnesota, USA).
- 78) Ceruti M., Tagini V., Recalenda V., Arpicco S., Cattel L., Airoidi M., Bumma C., Docetaxel in combination with epirubicin in metastatic breast cancer: pharmacokinetic interactions. *Il Farmaco* 54, 733-739 (1999) (Roma, Italia).
- 79) Ceruti M., Nanni D., Tagini V., Crosasso P., Casullo R., Zola P., Cattel L., Pharmacokinetic monitoring of paclitaxel in patients affected by ovarian and mammalian cancer. *Acta Technologiae et Legis Medicamenti* 10, 183-201 (1999) (Parma, Italia).
- 80) Crosasso P., Ceruti M., Brusa P., Arpicco S., Dosio F., Cattel L., Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *J. Control. Release* 63, 19-30 (2000) (Amsterdam, Olanda).
- 81) Viola F., Balliano G., Milla P., Cattel L., Rocco F., Ceruti M., Stereospecific syntheses of trans-vinyldioxidosqualene and b-hydroxysulfide derivatives, as potent and time-dependent 2,3-oxidosqualene cyclase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 8, 223-232 (2000) (La Jolla, California USA).
- 82) Brusa P., Ceruti M., Casullo R., Tagini V., Cattel L., Squicciarro G., Moscato D., Segoloni G.P., Comparison of two immunoenzymatic assays to determine FK 506 in whole blood from kidney transplant patients. *Acta Technologiae et Legis Medicamenti* 11, 1-12 (2000) (Parma, Italia).
- 83) Ceruti M., Crosasso P., Brusa P., Arpicco S., Dosio F., Cattel L., Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing water-soluble pro-drugs of paclitaxel. *J. Control. Release* 63, 141-153 (2000) (Amsterdam, Olanda).
- 84) Viola F., Ceruti M., Cattel L., Milla P., Poralla K., Balliano G., Rationally designed inhibitors as tools for comparing the mechanism of squalene-hopene cyclase with oxidosqualene cyclase *Lipids* 35(3), 297-303 (2000) (Champaign, Illinois, USA).
- 85) Brusa P., Ceruti M., Casullo R., Dosio F., Squicciarro G., Segoloni G.P., Cattel L., Pharmacokinetic monitoring of mycophenolate mofetil in kidney transplanted patients. *Il Farmaco* 55, 270-275 (2000) (Roma, Italia).
- 86) Ceruti M., Balliano G., Rocco F., Milla P., Arpicco S., Cattel L., Viola F., Vinyl sulfide derivatives of truncated oxidosqualene as selective inhibitors of oxidosqualene and squalene-hopene cyclases. *Lipids* 36(6), 629-636 (2001) (Champaign, Illinois, USA).
- 87) Cattel L., Buffa E., De Simone M., Cesana P., Novello S., Dosio F., Ceruti M., Melphalan monitoring during hyperthermic perfusion of isolated limb for melanoma: pharmacokinetic study and ^{99m}Tc-albumin microcolloid technique. *Anticancer Res.* 21, 2243-2248 (2001) (Kapandriti, Attiki, Grecia).
- 88) Ceruti M., Viola F., Balliano G., Milla P., Roma G., Grossi G., Rocco F., Synthesis of (E)- and (Z)-29-methylidene-2,3-oxidosqualene derivatives as inhibitors of liver and yeast oxidosqualene cyclase. *JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS I*, 1477-1486 (2002). ISSN 1472-7781 Editor: The Royal Society of Chemistry. (Rivista attualmente denominata ORGANIC AND BIOMOLECULAR CHEMISTRY: ISSN 1477-0520).

- 89) Arpicco S., Dosio F., Bolognesi A., Lubelli C., Brusa P., Stella B., Ceruti M., Cattel L., Novel poly(ethylene glycol) derivatives for preparation of ribosome-inactivating protein conjugates. *BIOCONJUGATE CHEMISTRY* 13(4), 757-765 (2002). ISSN 1043-1802. Editor: American Chemical Society.
- 90) Rocco F., Oliaro Bosso S., Viola F., Milla P., Roma G., Grossi G., Ceruti M., Conjugated methyl sulfide and phenyl sulfide derivatives of oxidosqualene as inhibitors of oxidosqualene and squalene-hopene cyclases. *LIPIDS* 38(3), 201-207 (2003). ISSN 0024-4201. Editor: American Oil Chemists' Society.
- 91) Cattel L., Ceruti M., Dosio F., From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. *TUMORI* 89(3), 237-249 (2003). ISSN 0300-8916. Editor: Il Pensiero Scientifico.
- 92) Arpicco S., Canevari S., Ceruti M., Galmozzi E., Rocco F., Cattel L., Synthesis, characterization and transfection activity of new saturated and unsaturated cationic lipids. *IL FARMACO* 59(11), 869-878 (2004). ISSN 0014-827X. Editor: Elsevier. (Rivista attualmente denominata CHEMMEDCHEM: ISSN 1860-7179).
- 93) Immordino M.L., Brusa P., Rocco F., Arpicco S., Ceruti M., Cattel L., Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE* 100(3), 331-346 (2004). ISSN 0168-3659. Editor: Elsevier.
- 94) Cattel L., Ceruti M., Dosio F., From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy. *JOURNAL OF CHEMOTHERAPY* 16, suppl. 4, 94-97 (2004). ISSN 1120-009X. Editor: E.S.I.F.T. (Firenze).
- 95) Ceruti M., Balliano G., Rocco F., Lenhart A., Schulz G.E., Castelli F., Milla P., Synthesis and biological activity of new iodoacetamide derivatives on mutants of squalene-hopene cyclase. *LIPIDS* 40(7), 729-735 (2005). ISSN 0024-4201. Editor: American Oil Chemists' Society.
- 96) Di Braccio M., Grossi G., Ceruti M., Rocco F., Loddo R., Sanna G., Busonera B., Murreddu M., Marongiu M.E., 1,5-Benzodiazepines XIV. Synthesis of new substituted 9H-bis[1,2,4]triazolo[4,3-a:3',4'-d][1,5]benzodiazepines and relate compounds endowed with in vitro cytotoxic properties. *IL FARMACO* 60(2), 113-125 (2005). ISSN 0014-827X. Editor: Elsevier. (Rivista attualmente denominata CHEMMEDCHEM: ISSN 1860-7179).
- 97) Xiong Q., Rocco F., Wilson W.K., Xu R., Ceruti M., Matsuda S.P.T., Structure and reactivity of the dammarenyl cation: configurational transmission in triterpene synthesis. *JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY* 70, 5362-5375 (2005). ISSN 0022-3263. Editor: American Chemical Society.
- 98) Voyron S., Forni P., Rocco F., Ceruti M., Filipello Marchisio V., Antifungal and cytotoxic activity of two inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase. *Mycoses* 48 (Suppl. 2), 44-45 (2005). ISSN 0933-7407. Editor: Blackwell, Verlag.
- 99) Oliaro Bosso S., Ceruti M., Balliano G., Milla P., Rocco F., Viola F., Analogs of squalene and oxidosqualene inhibit oxidosqualene cyclase of *Trypanosoma cruzi* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *LIPIDS* 40(12), 1257-1262 (2005). ISSN 0024-4201. Editor: American Oil Chemists' Society.
- 100) Castelli F., Sarpietro M.G., Ceruti M., Rocco F., Cattel L., Characterization of lipophilic gemcitabine prodrug-liposomal membrane interaction by differential scanning calorimetry. *MOLECULAR PHARMACEUTICS* 3(6), 737-744 (2006). ISSN 1543-8384. Editor: American Chemical Society.
- 101) Castelli F., Sarpietro M.G., Rocco F., Ceruti M., Cattel L., Interaction of lipophilic gemcitabine prodrugs with biomembrane models studied by Langmuir-Blodgett technique. *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE* 313(1), 363-368 (2007). ISSN 0021-9797. Editor: Elsevier.
- 102) Sarpietro M.G., Micieli D., Rocco F., Ceruti M., Castelli F., Conjugation of squalene to acyclovir improves the interaction with biomembrane models. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS* 382(1-2), 73-79 (2009). ISSN 0378-5173. Editor: Elsevier.

- 103) Voyron S., Rocco F., Ceruti M., Forni P., Florio Pla A., Sarpietro M.G, Varese G.C., Filipello Marchisio V., Antifungal activity of bis-azasqualenes, inhibitors of oxidosqualene cyclase. MYCOSES 53(6), 481-487 (2010). ISSN 0933-7407. Editor: Blackwell, Verlag.
- 104) Sarpietro M.G., Rocco F., Micieli D., Ottimo S., Ceruti M., Castelli F., Interaction of acyclovir and its squalenoyl-acyclovir prodrug with DMPC in monolayers at the air/water interface. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS. 395(1-2), 167-173 (2010). ISSN 0378-5173. Editor: Elsevier.
- 105) Sarpietro M.G., Ottimo S., Giuffrida M.C., Rocco F., Ceruti M., Castelli F., Synthesis of N-squalenoyl-cytarabine and evaluation of its affinity with phospholipid bilayers and monolayers. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS 406(1-2), 69-77 (2011). ISSN 0378-5173. Editor: Elsevier.
- 106) Ognibene M.C., Rocco F., Craparo E.F., Picone P., Ceruti M., Giammona G., Biocompatible micelles based on squalene portions linked to PEGylated polyaspartamide as potential colloidal drug carriers. CURRENT NANOSCIENCE 7(5), 747-756 (2011). ISSN 1573-4137. Editor: Bentham Science.
- 107) Cosco D., Rocco F., Ceruti M., Vono M., Fresta M., Paolino D., Self-assembled squalenoyl-cytarabine nanostructures as a potent nanomedicine for treatment of leukemic diseases. INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE 7, 2535-2546 (2012). ISSN 1176-9114. Editor: Dove Medical Press.
- 108) Scialabba C., Rocco F., Licciardi M., Pitarresi G., Ceruti M., Giammona G., Amphiphilic polyaspartamide copolymer-based micelles for rivastigmine delivery to neuronal cells. DRUG DELIVERY 19(6), 307-316 (2012). ISSN 1071-7544. Editor: Informa Healthcare USA.
- 109) Scialabba C., Licciardi M., Mauro N., Rocco F., Ceruti M., Giammona G., Inulin-based polymer coated SPIONs as potential drug delivery systems for targeted cancer therapy. Eur. J. Pharm. Biopharm. 88 (3): 695-705 (2014). doi: 10.1016/j.ejpb.2014.09.008.
- 110) Licciardi M.; Scialabba C.; Rocco F.; Ceruti M.; Pitarresi G.; Cavallaro G.; Giammona G., Metallic Core Nanocarriers for Multiple Cancer Targeting. Nanomedicine: pharmacokinetic challenges, targeting and clinical outcomes pp 25-26, Vol. Unico (2014). ISBN 9788793053014.
- 111) Ceruti M., Rocco F., Di Pietro M.E., Tocci E., De Luca G., Conformational features of 4-(N)-squalenoyl-gemcitabine in solution: a combined NMR and molecular dynamics investigation. New J. Chem. 39, 3484-3496 (2015). DOI:10.1039/C4NJ02091J.
- 112) Arpicco S., Battaglia L., Brusa P., Cavalli R., Chirio D., Dosio F., Gallarate M., Milla P., Peira E., Rocco F., Sapino S., Stella B., Ugazio E., Ceruti M., Recent studies on the delivery of hydrophilic drugs in nanoparticulate systems. J. Drug Deliv. Science Technol. 32, Part B, 298-312 (2016) DOI: 10.1016/j.jddst.2015.09.004.

B) Brevetti

- 1) Arpicco S., Brusa P., Cattel L., Ceruti M., Dosio F., Nuovi derivati del PEG e loro impiego per la preparazione di coniugati di interesse terapeutico. Brevetto di 35 pag., depositato al Ministero dell'Industria, del Commercio e dell'Artigianato il 2/4/1999, n° TO99A000259.
- 2) Ceruti M., Robinia "Georgia da Torino". Brevetto Internazionale depositato in Francia il 13/08/2012, n° CPVO 2012/1752 (2012).

C) Comunicazioni a Congressi

- 1* Ceruti M., Degani I., Fochi R., Sintesi di aldeidi per omologazione di composti carbonilici, via 1,4-benzoditiafulveni. XIV Convegno Nazionale di Chimica Organica, S. Margherita Ligure, 2-6 ottobre 1983, pag. 287-288.
- 2* Ceruti M., Balliano G., Cattel L., Gerst N., Schuber F., Inhibition of cholesterol biosynthesis in 3T3 fibroblasts by 2-aza-2,3-dihydrosqualene. Convegno internazionale sugli steroli: Journees du Gerli, Orsay, Francia, 7-8 marzo 1985, pag. 116 (Comunicazione orale).

- 3* Ceruti M., Cattel L., Schmitt P., Benveniste P., 2-Aza-2,3-dihydrosqualene and its N-oxide as inhibitors of sterol biosynthesis in bramble cell suspension cultures. Convegno internazionale sugli steroli: Journees du Gerli, Orsay, Francia, 7-8 marzo 1985, pag. 117.
- 4* Ceruti M., Rocco F., Schmitt P., Benveniste P., Novel azasqualene derivatives, inhibitors of sterol biosynthesis in bramble cell cultures. Convegno internazionale sugli steroli: Journees du Gerli, Orsay, Francia, 7-8 marzo 1985, pag. 118.
- 5* Cattel L., Delprino L., Balliano G., Viola F., Ceruti M., Benveniste P., The squalene 2,3-epoxide cyclase, as a model for the development of new drugs. Convegno Internazionale della Am. Oil Chem. Soc., Champaign, Illinois, USA, aprile 1985 (Comunicazione orale).
- 6* Ceruti M., Bouvier-Navé P., Schuber F., Cattel L., N-oxides of long chain amines as inhibitors of squalene 2,3-epoxide cyclase. Convegno Internazionale della Am. Oil Chem. Soc., Champaign, Illinois, USA, aprile 1985.
- 7* Ceruti M., Viola F., Balliano G., Cattel L., Azasqualeni N-ossidi e bis-azasqualeni, inibitori dell'enzima squalene epossido ciclastasi. V Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica, Rimini, 25 maggio 1985, pag. S45.
- 8* Grosa G., Caputo O., Ceruti M., Viola F., Cattel L., Metabolismo ossidativo di azasqualeni. V Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica, Rimini, 25 maggio 1985, pag. S53.
- 9* Cattel L., Ceruti M., Dosio F., Sintesi di inibitori suicidi dello squalene 2,3-epossido ciclastasi. XVI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Organica, Urbino, 7-12 settembre 1986, pag. 168-169.
- 10* Cattel L., Ceruti M., Balliano G., Sintesi ed attività biologica di azasqualeni, bis-azasqualeni e derivati. VI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica, Alghero (Ss), 14-18 ottobre 1986, pag. 20 (Comunicazione orale).
- 11* Ceruti M., Grosa G., Cattel L., Sintesi, attività biologica e metabolismo di derivati squalenoidi acetilenici ed allenici. VI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica, Alghero (Ss), 14-18 ottobre 1986, pag. 107.
- 12* Caputo O., Grosa G., Ceruti M., Studio del metabolismo in vivo nel ratto dell'antiparkinson Budipina. XVI Congresso Nazionale di Chimica "Bononiachem 88" Bologna, 9-14 ottobre 1988, pag. 148.
- 13* Caputo O., Grosa G., Ceruti M., Studio del metabolismo in vivo nel ratto dell'antiestrogeno Analog II. XVI Congresso Nazionale di Chimica "Bononiachem 88" Bologna, 9-14 ottobre 1988, pag. 149.
- 14* Grosa G., Caputo O., Ceruti M., Metabolismo ossidativo di funzioni acetaliche e tioacetaliche cicliche: studio della correlazione struttura metabolismo. XVI Congresso Nazionale di Chimica "Bononiachem 88" Bologna, 9-14 ottobre 1988, pag. 150.
- 15* Ceruti M., Grosa G., Cattel L., Sintesi della squalene N-metilossaziridina e di altre nuove classi di derivati squalenoidi, inibitori della biosintesi degli steroli. XVI Congresso Nazionale di Chimica "Bononiachem 88" Bologna, 9-14 ottobre 1988, pag. 151.
- 16* Grosa G., Viola F., Ceruti M., Caputo O., Cattel L., Studio comparato dell'attività inibitoria di derivati squalenoidi acetilenici ed allenici, nei confronti dell'enzima squalene epossidasi e delle monoossigenasi P-450 dipendenti. XVI Congresso Nazionale di Chimica "Bononiachem 88", Bologna, 9-14 ottobre 1988, pag. 152.
- 17* Pogliani L., Viterbo D., Ceruti M., Ugliengo P., Comparison of experimental and molecular modelling results on phosphine oxides. International Workshop on Medicinal Chemistry, Molecular Dynamics and Protein Structure, S. Miniato (Pi), 19-20 giugno 1989 (Comunicazione orale).

- 18* Caputo O., Grosa G., Franzone J.S., Ceruti M., Biglino G., Studio del metabolismo del 7-(1,3-ditiolan-2-ilmetil)teofillina, un nuovo farmaco ad attività antibroncospastica e mucolitica. Primo Congresso Congiunto Spagnolo-Italiano di Chimica Farmaceutica, Granada, Spagna, 19-22 settembre 1989, pag. 396.
- 19* Caputo O., Grosa G., Ceruti M., Studio del metabolismo in vivo del nuovo analgesico Filenadol (FI - 2024). Primo Congresso Congiunto Spagnolo-Italiano di Chimica Farmaceutica, Granada, Spagna, 19-22 settembre 1989, pag. 397.
- 20* Grosa G., Ceruti M., Caputo O., Rocco F., Biglino G., In vitro metabolism of 7-(1,3-thiazolidin-2-ylmethyl)theophylline: the metabolic fate of the 1,3-thiazolidine ring. X Convegno Nazionale di Chimica Farmaceutica, S. Benedetto del Tronto (Ap), 30 settembre - 5 ottobre 1990, pag. 135.
- 21* Ceruti M., Grosa G., Caputo O., Giacomotti M., Cattel L., Synthesis and biological activity of 22,23-epoxy-2-aza-2,3-dihydrosqualene derivatives: potent new inhibitors of squalene 2,3-oxide - lanosterol cyclase. X Convegno Nazionale di Chimica Farmaceutica, S. Benedetto del Tronto (Ap), 30 settembre - 5 ottobre 1990, pag. 50.
- 22* Cattel L., Ceruti M., Balliano G., Viola F., 2,3-oxidosqualene cyclase and squalene epoxidase, as target enzymes for the development of new sterol biosynthesis inhibitors. American Chemical Society Sponsored International Symposium on Sterol Biosynthesis Inhibitors as Agrochemicals and Pharmaceuticals, 201st American Chemical Society National Meeting. Atlanta, Georgia, USA, 14-19 aprile 1991, pag. 40 (Comunicazione orale).
- 23* Viola F., Balliano G., Ceruti M., Cattel L., Inhibition of squalene oxide cyclase by 10-azasqualene 2,3-oxide, a new analogue of high energy intermediate. 36° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica, Ferrara, 10-13 settembre 1991, pag. 376.
- 24* Ceruti M., Rocco F., Grosa G., Cattel L., Total synthesis of the hypocholesterolemic and antifungal drug 10-azasqualene 2,3-epoxide, the first non-cyclized analogue of the C-8 carbonium ion formed during squalene epoxide cyclization. X Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Siena, 16-20 settembre 1991, pag. 29 (Comunicazione orale).
- 25* Ceruti M., Grosa G., Rocco F., ¹H-NMR and ¹³C-NMR studies for the assignment of the structure of (6E)-10-azasqualene 2,3-epoxide and (6Z)-10-azasqualene 2,3-epoxide and their correlation with hypocholesterolemic and antifungal activity. X Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Siena, 16-20 settembre 1991, pag. 47.
- 26* Grosa G., Ceruti M., Caputo O., Rocco F., Biglino G., The in vitro metabolism of 1,3-thiazolidine derivatives of theophylline: a study on structure-metabolism correlation. X Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Siena, 16-20 settembre 1991, pag. 101.
- 27* Viola F., Ceruti M., Balliano G., Brusa P., Cattel L., Inhibition of sterol biosynthesis by an aza analogue of 2,3-oxidosqualene. XI Congresso Internazionale "Drugs Affecting Lipid Metabolism", Firenze, 13-16 maggio 1992, pag. 80.
- 28* Ceruti M., Viola F., Balliano G., Cattel L., Total synthesis and inhibition of sterol biosynthesis by 10-azasqualene 2,3-epoxide, a high-energy intermediate analogue. Gordon Research Conference "Frontiers of Science", Design, synthesis and evaluation of enzyme inhibitors and inactivators, Kingston, Rhode Island, USA, 22-26 giugno 1992, pag. 6 (Comunicazione orale).
- 29* Brusa P., Dosio F., Ceruti M., Grosa G., Cattel L., Pharmacokinetics, biodistribution and metabolism of a 2,3-oxidosqualene cyclase inhibitor: 2-aza-2,3-dihydrosqualene. XVII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana "Januachem 92", Genova, 25-30 ottobre 1992, pag. 111-112 (FP 20).
- 30* Ceruti M., Seraglia R., Traldi P., Mass spectrometric behaviour of squalene derivatives. XVII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana "Januachem 92", Genova, 25-30 ottobre 1992, pag. 122-123 (FP 29).

- 31* Ceruti M., Rocco F., Grosa G., Brusa P., Cattel L., Synthesis of HEI analogues of the C-20 carbocation forming during lanosterol biosynthesis, as hypocholesterolemic. XVII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana "Januachem 92" Genova, 25-30 ottobre 1992, pag. 124-125 (FP 30).
- 32* Grosa G., Ceruti M., Biglino G., In vivo metabolism of 7-(1,3-thiazolidin-2-ylmethyl)theophylline: the metabolic fate of the 1,3-thiazolidine ring. XVII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana "Januachem 92", Genova, 25-30 ottobre 1992, pag. 193-194 (FP 69).
- 33* Rocco F., Ceruti M., Grosa G., Cattel L., Synthesis and inhibition of cholesterol biosynthesis by azasqualene alcohol and derivatives. XVII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana "Januachem 92", Genova, 25-30 ottobre 1992, pag. 261-262 (FP 108).
- 34* Grosa G., Milla P., Ceruti M., Brusa P., Rocco F., Cattel L., Synthesis and biological activity of arylidithio and maleimido squalene derivatives as new irreversible inhibitors of squalene 2,3-oxide-lanosterol cyclase. XVII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana "Januachem 92", Genova, 25-30 ottobre 1992, pag. 311-312 (FP 137).
- 35* Cattel L., Ceruti M., Balliano G., Viola F., Grosa G., Rocco F., 2,3-oxidosqualene cyclase: from azasqualenes to new site-directed inhibitors. 85th American Chemists' Society Annual Meeting and Ninth American Oil Chemists' Society Symposium on "regulation of isopentenoid biosynthesis and function". Atlanta, Georgia, USA, 8-12 maggio 1994, pag. 485 (Comunicazione orale).
- 36* Brusa P., Dosio F., Ceruti M., Grosa G., Cattel L., Pharmacokinetic and biodistribution in mice of the hypocholesterolemic agent 2-aza-2,3-dihydrosqualene. XXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Torino, 25-29 settembre 1994, pag. 182.
- 37* Ceruti M., Viola F., Balliano G., Rocco F., Cattel L., Inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase as hypocholesterolemic and antifungal drugs. XXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Torino, 25-29 settembre 1994, pag. 183.
- 38* Ceruti M., Rocco F., Grosa G., Cattel L., Novel high-energy intermediate analogues and site-directed inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase. XI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Bari, 2-5 ottobre 1994, pag. 5 (Comunicazione orale).
- 39* Ceruti M., Amisano S., Rocco F., Cattel L., Stereocontrolled synthesis of fluorosqualenes and fluoroepoxysqualenes as inhibitors of squalene epoxidase. XI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Bari, 2-5 ottobre 1994, pag. 8.
- 40* Ceruti M., Grosa G., Rocco F., Cattel L., Synthesis of [3-3H]squalene and [3-3H]-2,3-oxidosqualene. XI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Bari, 2-5 ottobre 1994, pag. 124.
- 41* Grosa G., Ceruti M., Cattel L., In vitro metabolism of xylazine: evidence for enzymatic formation of acrolein in 1,3-thiazine ring metabolic cleavage. XI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Bari, 2-5 ottobre 1994, pag. 125.
- 42* Grosa G., Ceruti M., Dosio F., Brusa P., Cattel L., 2,3,4,5-tetrahydroxy-5-(4-hydroxyphenyl)valeric acid: a new cleavable monofunctional reagent for monoclonal antibody labeling. XI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Bari, 2-5 ottobre 1994, pag. 126.
- 43* Airaudi D., Ceruti M., Giannetta A., Filipello Marchisio V., Fungitoxic activity of squalene derivatives towards dermatophytes. 89° Congresso della Società Botanica Italiana, Perugia, 3-6 ottobre 1994, P 147.
- 44* Airaudi D., Ceruti M., Bianco C., Filipello Marchisio V., Antifungal spectrum of two acyclic inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase. 2° Congresso Congiunto Italiano-Spagnolo di Chimica Farmaceutica, Ferrara, 30 agosto - 3 settembre 1995, pag. 80.
- 45* Ceruti M., Rocco F., Cattel L., Stereospecific synthesis of 18-cis- and 18-trans-29-methylidene-2,3-oxidoheptacosqualene as irreversible inhibitors of animal 2,3-oxidosqualene cyclase. 2° Congresso Congiunto Italiano-Spagnolo di Chimica Farmaceutica, Ferrara, 30 agosto - 3 settembre 1995, pag. 145.

- 46* Ceruti M., Viola F., Balliano G., Rocco F., Cattel L., 10 and 19-azasqualene derivatives as irreversible inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase from pig liver. 2° Congresso Congiunto Italiano-Spagnolo di Chimica Farmaceutica, Ferrara, 30 agosto – 3 settembre 1995, pag. 146.
- 47* Viola F., Balliano G., Ceruti M., Chiorra C., Cattel L., Time-dependent inhibition of oxidosqualene cyclase by aza derivatives of squalene oxide. 40° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica, Torino, 12-15 settembre 1995, pag. 275; 10° Convegno Nazionale Proteine '95, Torino, 14-15 settembre 1995, pag. 68.
- 48* Ceruti M., Synthesis of new inhibitors of oxidosqualene cyclase. Mini-simposio "Oxidosqualene cyclase: target enzyme for the development of new sterol biosynthesis inhibitors", Torino, 4 dicembre 1995 (Comunicazione orale).
- 49* Milla P., Balliano G., Ceruti M., Cattel L., 2,3-oxidosqualene cyclase from yeast: a target enzyme for drug discovery. Yeast Lipid Conference, Graz, Austria, 17-18 maggio 1996, pag. 9.
- 50* Ceruti M., Rocco F., Cattel L., New time-dependent inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase with hypocholesterolemic and antifungal activity. XIII Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Paestum (Sa), 23-27 settembre 1996, pag. 50 (Comunicazione orale).
- 51* Ceruti M., Rocco F., Cattel L., Synthesis of tritium-labelled 19-azasqualene 2,3-epoxide and derivatives, as probes to study their hypocholesterolemic activity. XIII Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Paestum (Sa), 23-27 settembre 1996, pag. 123.
- 52* Ceruti M., Seraglia R., Traldi P., Mass spectrometric behaviour of some 19-aza and 2-azasqualene derivatives XIII Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Paestum (Sa), 23-27 settembre 1996, pag. 232.
- 53* Cattel L., Balliano G., Viola F., Milla P., Rocco F., Ceruti M., Stereospecific irreversible inhibitors of liver and yeast oxidosqualene cyclase. 88th American Chemists' Society Annual Meeting, Seattle, Washington, USA, 11-14 maggio 1997, pag. 3 (Comunicazione orale).
- 54* Pogliani L., Ceruti M., Viterbo D., An NMR study of 2-aza and 19-azasqualene derivatives. Primo Congresso Congiunto Italiano-Svizzero di Chimica Farmaceutica, Torino, 23-26 settembre 1997, pag. 64.
- 55* Ceruti M., Rocco F., Cattel L., (E) and (Z)-29-methylidene-2,3-oxidosqualene as stereospecific mechanism-based inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase. Primo Congresso Congiunto Italiano-Svizzero di Chimica Farmaceutica, Torino, 23-26 settembre 1997, pag. 65.
- 56* Ceruti M., Rocco F., Cattel L., Synthesis of vinyl sulfide derivatives of oxidosqualene, as potent inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase. XIV Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Salsomaggiore Terme (Pr), 21-25 settembre 1998, pag. 234.
- 57* Ceruti M., Pogliani L., Paoli P., Rossi P., Molecular dynamics simulations of some oxidosqualene cyclase inhibitors. XIV Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Salsomaggiore Terme (Pr), 21-25 settembre 1998, pag. 235.
- 58* Ceruti M., Balliano G., Viola F., Milla P., Rocco F., Cattel L., Stereospecific inhibition of sterol biosynthesis in HEP G2 and *Saccharomyces cerevisiae* cell cultures by 29-methylidene-oxidosqualene derivatives. XIV Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Salsomaggiore Terme (Pr), 21-25 settembre 1998, pag. 236.
- 59* Arpicco S., Ceruti M., Brusa P., Infante L., Cattel L., Novel cationic lipids potentially useful for gene tranfection. XIV Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Salsomaggiore Terme (Pr), 21-25 settembre 1998, pag. 237.
- 60* Cattel L., Ceruti M., Viola F., Balliano G., Milla P., Rocco F., Poralla K., Rationally designed inhibitors as tools for comparing the mechanisms of squalene hopene cyclase and oxidosqualene cyclases. 90th

American Oil Chemists' Society Annual Meeting, Orlando, Florida, USA, 9-12 maggio 1999, pag. S55-S56 (Comunicazione orale), AOCS Ed., Champaign, Illinois, USA.

61* Arpicco S., Ceruti M., Stella B., Brusa P., Cattel L., Preparazione e caratterizzazione di lipidi cationici per il trasferimento di geni. 39° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Montecatini Terme (Pt), 26-28 maggio 1999, pag. 94.

62* Arpicco S., Ceruti M., Stella B., Brusa P., Ajmone Marsan F., Cattel L., Preparation and characterization of novel cationic lipids developed for gene transfection. 26th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Boston, MA, USA, 20-25 giugno 1999, pag. 6203, CRS Ed., Deerfield, Illinois, USA.

63* Milla P., Balliano G., Viola F., Ceruti M., Cattel L., Poralla K., Comparison of the mechanism of yeast oxidosqualene cyclase and bacterial squalene cyclase by using rationally designed inhibitors. FEBS Advanced Course. Yeast lipids: metabolism and intracellular transport, Utrecht, Olanda, 22-25 settembre 1999, FEBS Ed.

64* Ceruti M., Arpicco S., Dosio F., Brusa P., Cattel L., Synthesis, characterization and biological activity of new cationic lipids active for gene transfection. Congresso Internazionale: Drug Delivery for the Third Millennium, Pisa, 10-12 ottobre 1999, pag. 84 (Comunicazione orale), CRS Ed., Deerfield, Illinois, USA.

65* Cattel L., Arpicco S., Ceruti M., Rocco F., Dosio F., Brusa P., Caratterizzazione e studio dell'attività di una nuova classe di lipidi cationici. XVII Simposio A.D.R.I.T.E.L.F., la Ricerca Tecnologica Innovativa nello Sviluppo di Medicinali, Catania, 4-7 ottobre 2000, PA 19.

66* Stella B., Rocco F., Immordino M.L., Caron G., Ceruti M., Tumiatti K., Cattel L., Synthesis of new gemcitabine prodrugs for liposome and nanoparticle encapsulation. 4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Firenze, 8-11 aprile 2002, pag. 697-698, A.D.R.I.T.E.L.F. Ed., Perugia.

67* Ceruti M., Oliaro Bosso S., Rocco F., Milla P., Matsuda S.P.T., Balliano G., Viola F., Vinyl sulfide derivatives of oxidosqualene, as inhibitors of oxidosqualene cyclase of *Trypanosoma cruzi* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. 93rd American Oil Chemists' Society Annual Meeting, Montreal, Quebec, Canada, 5-8 maggio 2002, pag. 59, AOCS ed., Champaign, Illinois, USA, AOCS Ed., Champaign, Illinois, USA.

68* Ceruti M., Rocco F., Sintesi di E e Z-29-metilidino-2,3-ossidosqualene derivati, inibitori irreversibili della ossidosqualene ciclastasi. XVI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Sorrento (Na), 18-22 settembre 2002, pag. 121 (P 21).

69* Ceruti M., Arpicco S., Rocco F., Feniltio e metiltio dieni coniugati, inibitori delle ossidosqualene e squalene-hopene ciclastasi. XVI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Sorrento (Na), 18-22 settembre 2002, pag. 122 (P 22).

70* Ceruti M., Viola F., Balliano G., Milla P., Rocco F. Fenil vinil solfuri e metil vinil solfuri, inibitori specifici della ossidosqualene ciclastasi di *Trypanosoma cruzi* e di *S. cerevisiae*. XVI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Sorrento (Na), 18-22 settembre 2002, pag. 123 (P 23).

71* Ceruti M., Rocco F., Balliano G., Milla P., Sulfide derivatives of oxidosqualene inhibitors of 2,3-oxidosqualene and squalene-hopene cyclase as antifungals or hypocholesterolemic. 43° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Perugia, 11-13 giugno 2003, pag. 137.

72* Immordino M.L., Rocco F., Brusa P., Stella B., Arpicco S., Ceruti M., Cattel L., Incorporation of lipophilic Gemcitabine prodrugs in liposomes. 43° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Perugia, 11-13 giugno 2003, pag. 140.

73* Stella B., Rocco F., Immordino M.L., Arpicco S., Caron G., Dosio F., Ceruti M., Cattel L., Cyanoacrylate nanospheres and nanocapsules containing lipophilic prodrugs of Gemcitabine. 43° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Perugia, 11-13 giugno 2003, pag. 141.

- 74* Viola F., Oliaro Bosso S., Rocco F., Ceruti M., New potent selective inhibitors of Trypanosoma cruzi oxidosqualene cyclase. 43° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Perugia, 11-13 giugno 2003, pag. 142.
- 75* Ceruti M., Rocco F., Milla P., Balliano G., Mutants of squalene hopene cyclase: synthesis and biological activity of new iodoacetamide derivatives as thiol reactive groups. 44° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 19-21 maggio 2004, pag. 180.
- 76* Dosio F., Colombatti M., Bellisola G., Ceruti M., Cattel L., Farmaci macromolecolari: veicolazione e direzionamento mediante albumina umana. 45° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 15-17 giugno 2005, pag. 184.
- 76* Immordino M.L., Ceruti M., Arpicco S., Cattel L., New DSPE-PEG-Folate conjugates for liposomal drug targeting. 45° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 15-17 giugno 2005, pag. 185.
- 78* Immordino M.L., Ceruti M., Cattel L., Folate-targeted liposomes for drug delivery. 15° International Symposium on Microencapsulation, Parma, 18-21 settembre 2005, pag. 301-302, International Microencapsulation Society Ed.
- 79* Voyron S., Forni P., Rocco F., Ceruti M., Filipello Marchisio V., Antifungal and cytotoxic activity of two inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase. International Symposium 2nd Trends in Medical Mycology, Berlino, Germania, 23-26 ottobre 2005, pag. 44, Blackwell Ed.
- 80* Cattel L., Ceruti M., Arpicco S., Stella B., Dosio F., Synthesis and characterization of PEG-Folate conjugates for active targeting of antitumoral drugs. 47° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 13-15 giugno 2007, pag. 207.
- 81* Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., Rocco F., Ceruti M., Conjugation of Acyclovir with squalene as a tool to enhance its interaction with biomembrane models: a differential scanning calorimetry study. 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Barcellona (Spagna) 7-10 Aprile 2008, pag. 44-45.
- 82* Vono M., Cosco D., Molinaro R., Rocco F., Celia C., Costa N., Paolino D., Ceruti M., Fresta M., Preparation, characterization and biological evaluation of squalene-cytarabine conjugates self-assembled in nanoaggregates. XII Workshop on apoptosis in Biology and Medicine, Parghelia (Vibo Valentia), 20-22 Maggio 2009, pag. 30-31, Rombolà L., Amantea D., Russo R., Berliocchi L., Fico N. Eds.
- 83* Sarpietro M.G., Micieli D., Giuffrida M.C., Rocco F., Ceruti M., Castelli F., Calorimetric evidence of the interaction of a lipophilic conjugate of cytarabine with biomembrane models. 49° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 10-12 giugno 2009, pag. 187.
- 84* Rocco F., Cosco D., Vono M., Paolino D., Ceruti M., Fresta M., Biopharmaceutical characterization of squalenoyl-cytarabine nanoparticles. 49° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 10-12 giugno 2009, pag. 202 (comunicazione orale).
- 85* Craparo E.F., Ognibene M.C., Rocco F., Ceruti M., Giammona G., Novel amphiphilic copolymers based on polyaspartamide graft with squalene residues to obtain micelles as colloidal drug carriers. CRS International 36th Annual Meeting, Copenhagen, 18-22 luglio 2009, pag. 846-847, CRS International Ed., St. Paul, Minnesota, USA.
- 86* Ognibene M.C., Rocco F., Craparo E.F., Picone P., Ceruti M., Giammona G., Biocompatible micelles based on amphiphilic polyaspartamide-squalene derivatives as potential colloidal drug carriers. Simposio Polymerfest, Palermo, 30 Agosto-2 Settembre 2009, pag. 179-180 (premiato come miglior poster), University of Palermo Ed.
- 87* Rocco F., Paolino D., Vono M., Cosco D., Molinaro R., Celia C., Costa N., Fresta M., Ceruti M., Synthesis, antitumor activity and biodistribution of squalenoyl-cytarabine nanoparticles. XXI Simposio A.D.R.I.T.E.L.F., Veicolazione dei farmaci: aspetti tecnologici innovativi, Cagliari, 10-13 Settembre 2009, PA 27.

- 88* Ognibene M.C., Rocco F., Craparo E.F., Picone P., Ceruti M., Giammona G., Novel amphiphilic copolymers based on polyaspartamide graft with squalene residues to obtain micelles as colloidal drug carriers. XXI Simposio A.D.R.I.T.E.L.F., Veicolazione dei farmaci: aspetti tecnologici innovativi, Cagliari, 10-13 Settembre 2009, PA 38.
- 89* Sarpietro M.G., Ottimo S., Giuffrida M.C., Rocco F., Ceruti M., Castelli F., Interaction of acyclovir and its squalenoyl-acyclovir prodrug with DMPC in monolayers at the air/water interface. 50° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 9-11 giugno 2010, pag. 263.
- 90* Rocco F., Cosco D., Vono M., Molinaro R., Fresta M., Ceruti M., Paolino D. Nanoaggregati di squalenoyl-citarabina: sistemi colloidali innovativi per la terapia antitumorale. 50° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 9-11 giugno 2010, pag. 309.
- 91* Scialabba C., Licciardi M., Rocco F., Ceruti M., Giammona G., Sistemi direzionati contenenti derivati squalenici per il direzionamento di farmaci al sistema nervoso centrale. Convegno Materiali polimerici per dispositivi medici impiantali. Alessandria, 3 Marzo 2011, p 16.
- 92* Scialabba C., Licciardi M., Rocco F., Ceruti M., Giammona G., Polymeric micelles containing squalenyl chains for the delivery of drugs to the central nervous system. 51° Simposio AFI, con la partecipazione della CRS. Rimini, 8-10 giugno 2011, pag. 227.
- 93* Ceruti M., Rocco F., Di Pietro M.E., De Luca G., Tocci E., Comparison of NMR data with molecular dynamic calculations for squalenoyl-gemcitabine and derivatives. XXII Simposio ADRITELF. Firenze 13-16 Settembre 2012, pag. 73.