

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE  
“AMEDEO AVOGADRO”**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**Corso di Laurea Magistrale in Farmacia  
TESI DI LAUREA**

***Camptotheca acuminata Decne***

**Relatrice: Prof.ssa Federica Pollastro**

**Candidato: Luciano Ferrari Aggradi**

**Anno Accademico 2025/2026  
Sessione Estiva**



## **Abbreviazioni**

ABC – ATP-Binding Cassette

ADCs – Antibody-Drug Conjugates

ATP – Adenosina trifosfato

CAGR – Compound Annual Growth Rate

CPT – Camptotecina

DMAPP – Dimetilallil pirofosfato

DNA – Acido desossiribonucleico

EMA – European Medicines Agency

EPR – Enhanced Permeability and Retention

G10H – Geraniolo 10-idrossilasi

GES – Geraniolo sintasi

GPPS – Geranil pirofosfato sintasi

HER2 – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

IPP – Isopentenil pirofosfato

IS – Iridoide sintasi

LD50 – Dose letale 50%

MEP – 2-C-metil-D-eritritolo-4-fosfato

MVA – Via del mevalonato

NCI – National Cancer Institute

SLS – Secologanina sintasi

SN-38 – Metabolita attivo dell'irinotecano

STR – Strictosidina sintasi

TDC – Triptofano decarbossilasi

TOP1 – Topoisomerasi I



## Indice

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Sommario.....                                                    | 1  |
| 2. Introduzione .....                                               | 2  |
| 2.1 <i>Camptotheca acuminata</i> Decne.....                         | 2  |
| 2.2 Etnobotanica di <i>C. acuminata</i> .....                       | 5  |
| 3. Dalla camptotheca alla camptotecina .....                        | 7  |
| 3.1 Profilo fitochimico della <i>Camptotheca acuminata</i> .....    | 7  |
| 3.2 Via biosintetica della camptotecina.....                        | 8  |
| 3.3 Fonti alternative e processi di isolamento di camptotecina..... | 10 |
| 4. Meccanismo d'azione della camptotecina e topoisomerasi I.....    | 18 |
| 4.1 La topoisomerasi I.....                                         | 18 |
| 4.2 Topoisomerasi I e camptotecina.....                             | 19 |
| 4.3 Resistenza alla camptotecina e tossicità.....                   | 21 |
| 5. Derivati semisintetici della camptotecina .....                  | 22 |
| 5.1 Topotecano e irinotecano .....                                  | 22 |
| 5.2 Processi semi-sintetici .....                                   | 24 |
| 5.3 Posologia e tossicità .....                                     | 25 |
| 5.4 Nuovi analoghi .....                                            | 27 |
| 5.5 Liposomi.....                                                   | 31 |
| 5.6 Impatto economico.....                                          | 33 |
| 6. Conclusione .....                                                | 36 |
| 7. Bibliografia & sitografia .....                                  | 38 |

## 1. Sommario

La *Camptotheca acuminata* Decne è una specie arborea endemica della Cina centro-meridionale e del Vietnam, appartenente alla famiglia delle Nyssaceae, nota per la sua ricchezza in metaboliti secondari e, in particolare, per la produzione di camptotecina, alcaloide pentaciclico. Scoperta nel contesto della medicina tradizionale cinese e successivamente introdotta in Occidente nel XX secolo, la pianta ha assunto un ruolo centrale nella ricerca oncologica moderna grazie alla presenza di questo composto altamente citotossico; il suo isolamento rappresenta una svolta nella farmacologia antitumorale, aprendo la strada allo sviluppo di una nuova classe di farmaci mirati alla topoisomerasi I.

La camptotecina è infatti un inibitore selettivo della DNA topoisomerasi I, enzima essenziale nei processi di replicazione e trascrizione del DNA. Stabilizzando il complesso di clivaggio tra enzima e DNA, la camptotecina impedisce la religazione del filamento tagliato, generando rotture a singolo e doppio filamento che conducono alla morte cellulare, soprattutto nelle cellule caratterizzate da elevata attività replicativa come quelle tumorali. Nonostante la sua potente attività citotossica, l'impiego clinico diretto della molecola è stato inizialmente limitato dalla scarsa solubilità in acqua e dall'instabilità dell'anello lattonico, ostacoli che hanno stimolato la ricerca di derivati più stabili e idrosolubili, come topotecano e irinotecano.

La tesi analizza l'evoluzione scientifica e tecnologica della camptotecina, partendo dalla biologia della *Camptotheca acuminata* e dal suo profilo fitochimico, fino alla descrizione dettagliata della via biosintetica dell'alcaloide. Vengono approfondite le tecniche di estrazione e purificazione sviluppate nel tempo, dalla macerazione tradizionale alle metodiche cromatografiche e ai processi basati sulla manipolazione del pH, insieme alle più recenti strategie biotecnologiche, tra cui colture cellulari, radici avventizie, sistemi "hairy roots" e funghi endofitici capaci di biosintetizzare CPT. Infine, viene esaminato il

meccanismo d'azione della molecola e il suo impatto nella moderna drug discovery, evidenziando come la camptotecina rappresenti un esempio paradigmatico di come un metabolita naturale possa trasformarsi in un modello per lo sviluppo di farmaci antitumorali innovativi.

## **2. Introduzione**

### **2.1 *Camptotheca acuminata* Decne**

Le Nyssaceae sono una famiglia di angiosperme, che comprendono cinque generi principali: *Nyssa*, *Davidia*, *Diplopanax*, *Mastixia* e *Camptotheca* (Oginuma et al., 2021). Quest'ultimo è rappresentato a sua volta da due specie riconosciute: la *Camptotheca acuminata* Decne e la *Camptotheca lowreyana* S.Y.Li (Zhu et al., 2023). La *Camptotheca acuminata* (Fig. 1) si presenta come albero deciduo in grado di raggiungere una grandezza di 25 m. La corteccia è grigia chiara, marcata da solchi irregolari e i giovani rami crescono rapidamente, fessurandosi progressivamente col passare del tempo. Le foglie sono alterne, leggermente pubescenti e verde pallido adassialmente, verdastre e lucide abassialmente; il picciolo può avere dimensioni di 1,5-3 cm ed è piatto superiormente, rotondo inferiormente. Il frutto è un achenio sottile e lievemente alato, raggruppato in infiorescenze globose, di colore verde nei giovani esemplari, diviene giallo-brunastro con la maturazione o l'essiccazione (Zhu et al., 2023). Quest'ultimo ricorda un piccolo casco di banana ed è motivo per cui nella letteratura è talvolta indicato come wild banana (Li & Zhang, 2014). Le peculiari caratteristiche morfologiche di questa pianta sono un esempio di adattamento all'ambiente esterno cui questa specie vive, infatti i solchi la proteggono da variazioni termiche e di umidità, le ampie foglie assicurano una corretta fotosintesi anche in condizioni di luce diffusa, la pubescenza isola da una eccessiva insolazione (Wang et al., 2025). La fioritura avviene a maggio-luglio, la fruttificazione a settembre. Un ruolo chiave per questi ultimi processi è ovviamente giocato dall'habitat,

ristretto al bacino medio inferiore del fiume Yangtze, nelle aree meridionali della Cina e del nord del Vietnam (Zhu et al., 2023).

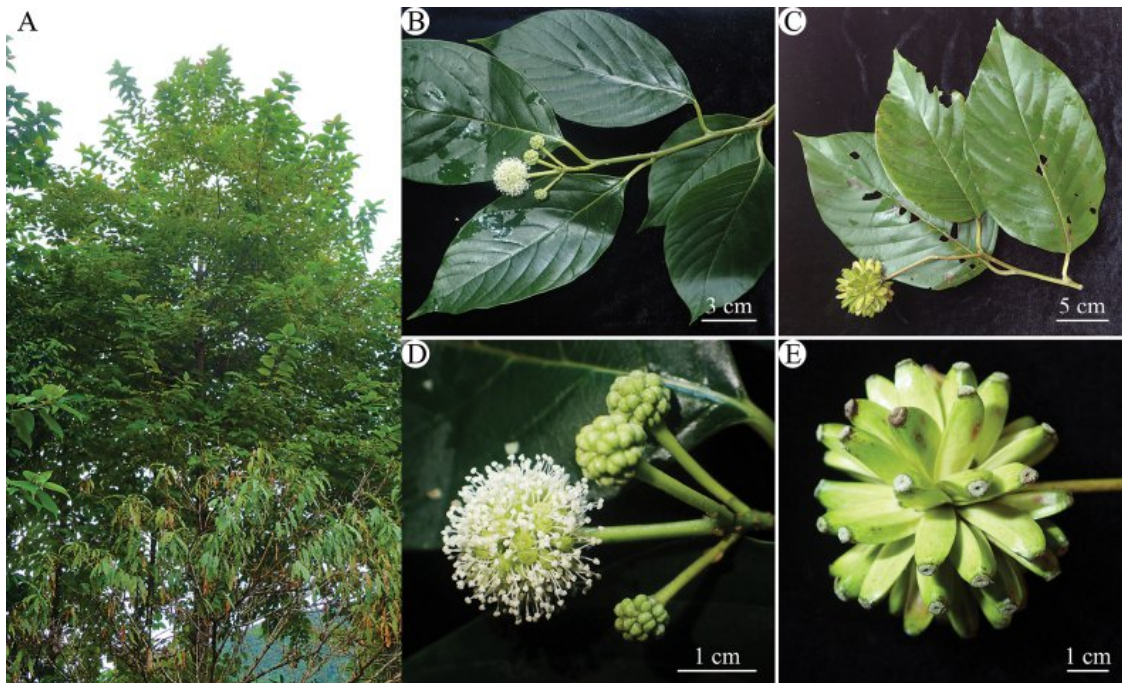


Fig. 1: *Camptotheca acuminata* Decne: A) habitat e portamento B) ramo fiorito C) ramo fruttifero D) infiorescenze E) frutti.

La limitata distribuzione geografica di questa specie (Fig. 2) dipende da fattori legati all'attività umana, da quelli ecologici-ambientali oltre che da quelli climatici; questi, purtroppo, contribuiscono a renderla una delle 120 piante selvatiche con una popolazione estremamente ridotta nel paese e porla sull'orlo dell'estinzione, a discapito del suo principio attivo più importante: la camptotecina (Fig. 3) (Wang et al., 2025). Le condizioni ambientali ottimali prevedono infatti delle temperature specifiche, tra 1 e 7 °C, proprie dei climi subtropicali temperati, unitamente a un'elevata umidità ambientale (Wang et al., 2025). La pianta cresce quindi meglio su terreni leggermente inclinati, che garantiscono un adeguato drenaggio del suolo senza eccessiva erosione, con un'altitudine medio-bassa (200-1000 m) (Feng et al., 2020). Proprio per questi motivi sono stati mappati e confrontati quattro possibili habitat idonei alla crescita della pianta: le aree altamente

idonee risultano concentrate tra le latitudini 25° e 33° N, che corrispondono a circa il 2,7% della superficie terrestre del Paese. In queste zone il clima è caldo-umido, le precipitazioni sono abbondanti anche nei mesi più secchi, i terreni hanno una pendenza moderata e la presenza di attività umana è molto scarsa. Le zone moderatamente idonee si collocano in prossimità delle precedenti e rappresentano circa l'8,3% del territorio, mentre quelle scarsamente idonee, poste a maggiore distanza, coprono una percentuale pari al 7,2%. Infine, i terreni non adatti alla crescita della pianta costituiscono la parte più consistente, pari all'81,8% della superficie analizzata (Feng et al., 2020; Wang et al., 2025).

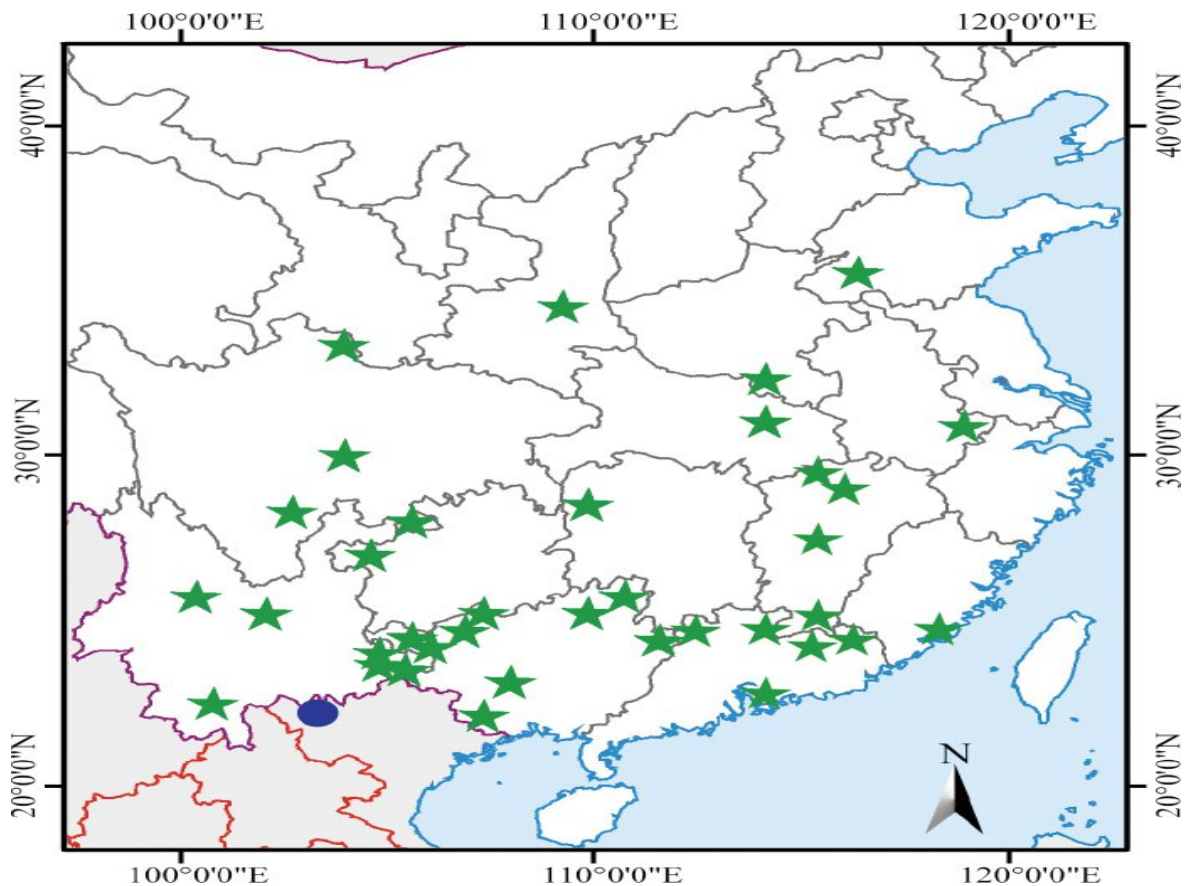


Fig. 2: Distribuzione di *Camptotheca acuminata* in Cina (stelle verdi) e Vietnam (cerchio blu).

## **2.2 Etnobotanica di *C. acuminata*: dalla medicina tradizionale cinese alla camptotecina**

L'etnobotanica, quale scienza interdisciplinare che si occupa dello studio delle relazioni tra l'essere umano e le piante, ha un ruolo fondamentale nell'individuare potenziali risorse vegetali interessanti da un punto di vista farmaceutico-farmacologico al fine di identificare molecole ad attività terapeutica (Li & Zhang, 2014). Il genere *Camptotheca* è stato scoperto e definito da Joseph Decaisne, direttore del Jardin des Plantes di Parigi, nel 1873, sulla base di campioni raccolti dal missionario e naturalista Padre Armand David durante la sua spedizione botanica in Cina (Decaisne, 1873; Zhu et al., 2023). Il nome del genere deriva dai termini greci “campto” (piegato, curvo) e “theca” (astuccio, custodia), in riferimento alla particolare forma delle antere, ricurve verso l'interno in modo caratteristico. Il nome specifico “*acuminata*” fa invece riferimento all'apice acuminato delle foglie (Zhu et al., 2023). È tuttavia doveroso ricordare che la prima menzione della pianta in letteratura viene effettuata nel 1848 da Zhi Wu Ming Shi Tu Kao, con il termine Han Lian (Li & Zhang, 2014). Il soprannome ad oggi più utilizzato è tuttavia Xi Shu (Happy tree), di origine incerta, sebbene si pensi abbia a che fare con il sollievo che genera nei pazienti affetti da altri disturbi respiratori (Li & Zhang, 2014).

Essendo una specie endemica della Cina centro-meridionale, la *C. acuminata* è associata al contesto della medicina tradizionale cinese (Unschuld, 1986) la cui trasmissione delle conoscenze fitoterapiche avveniva prevalentemente per via orale, lasciando spazio a varie interpretazioni e rendendo complessa una corretta interpretazione moderna (Hsu & Harris, 2010). In uno studio condotto da Li e Zhang nel 2014 vennero riportate le testimonianze di due medici, operanti nella provincia rurale del Guangdong, che ne confermano l'utilizzo medicinale da tempo immemore, ricordando però che solo pochi esemplari della pianta sopravvivono in natura e non sono state sviluppate piantagioni. Essi raccontano inoltre che nella loro comunità si preparava una pasta a partire da foglie o frutti freschi, oppure una polvere ottenuta da materiale secco proveniente da qualsiasi

parte dell'albero, che veniva poi mescolata con vino di riso per curare diverse malattie ostinate, tra cui foruncolosi, affezioni cutanee e persino "liu" (probabilmente un tipo di tumore) (Li & Zhang, 2014). È importante inoltre ricordare che l'utilizzo del vino mostra una comprensione precoce delle proprietà estrattive dell'alcol, associata al fatto che la maggior parte dei principi attivi contenuti nella pianta, tra cui la camptotecina, sono insolubili in acqua ma solubili in alcol (Oberlies, 2004). Oltre ai precedenti utilizzi, la *camptotheca* è utilizzata da contadini locali anche come fertilizzante nelle piantagioni di riso: si ritiene infatti poter agire da biopesticida ad azione allelopatica, in grado quindi di limitare la crescita di piante antagoniste. Il legno invece, morbido, leggero e inodore, viene utilizzato per materiali da confezionamento, arredi o per supporti in cave o miniere (Li & Zhang, 2014).

Pare che l'introduzione della pianta nell'orticoltura occidentale risalga al 1934, quando l'università di Nanjing spedisce un seme alla USDA Plant Introduction Station, a Chico, in California. Da qui viene distribuita ai giardini del sud California e degli stati nella regione sud-est americana, grazie al clima idoneo per la sua crescita, simile d'altronde anche a quello Sud-Europeo: è infatti presente anche in Italia, con l'Orto botanico di Padova che ne ospita un esemplare (Grimshaw et al., 2009). La vera e propria efficacia terapeutica viene dimostrata però negli anni '50, con il National Cancer Institute (NCI), che avvia un programma per testare estratti vegetali alla ricerca di attività antitumorale: in questa occasione gli estratti di *camptotheca acuminata* mostrano una forte attività in vivo contro modelli murini di adenocarcinoma, generando un iniziale interesse (Oberlies, 2004). Nel 1966 il gruppo di ricerca guidato dal Dr. Monroe E. Wall e dal Dr. Mansukh C. Wani riesce quindi a isolare la camptotecina, la quale si rivela dotata di una potente attività citotossica (Wall & Wani, 1966). Attraverso la cristallografia a raggi X ne viene individuata la complessa struttura pentaciclica e si viene a conoscenza della solubilità della molecola, che causa di fatto un primo ostacolo allo sviluppo farmacologico: la dissoluzione in acqua risulta molto scarsa, rendendo difficile la formulazione di una forma farmaceutica efficace (Oberlies, 2004). L'interesse verso la molecola viene riacceso solo negli anni '80, con la scoperta del meccanismo di azione: essa è infatti un inibitore della DNA topoisomerasi I, un enzima fondamentale nei processi di replicazione e trascrizione del DNA, centrali nello

sviluppo tumorale (Wall & Wani, 1995). A partire da questa scoperta vengono sviluppati analoghi di prima generazione più idrosolubili e farmacologicamente stabili, tra cui topotecano e irinotecano (Oberlies, 2004; Wang et al., 2025).

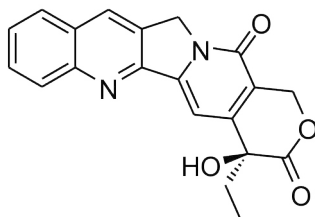


Fig. 3: Struttura chimica pentaciclica della camptotecina.

### 3. Dalla *Camptotheca* alla camptotecina

#### 3.1 Profilo fitochimico della *Camptotheca acuminata*

Dal punto di vista fitochimico, la *Camptotheca acuminata* è una pianta complessa, ricca di metaboliti secondari appartenenti rispettivamente alle famiglie di: alcaloidi, composti fenolici e polichetidici (acidi ellagici, flavonoidi, tannini) e terpenoidi. Genericamente i metaboliti secondari hanno il compito di regolare i rapporti di comunicazione e difesa nei confronti di stimoli esterni, di parassiti e competitor. La camptotecina è presumibilmente biosintetizzata dalla pianta a scopo di difesa essendo un alcaloide dotato di tossicità verso la topoisomerasi I animale. La pianta sorprendentemente ne risulta illesa perché esistono mutazioni specifiche nel gene della sua topoisomerasi I che la rendono resistente alla sua stessa molecola. (Waller et al., 1978). Questi ultimi sono composti organici contenenti atomi di azoto, molto spesso eterociclici e dotati di varie attività farmacologiche, presenti solo nel 20% delle piante fino ad ora note (Bribi et al., 2018). Una pianta non biosintetizza un solo alcaloide ma miscele molto complesse presentanti diversità strutturali tra di loro anche notevoli. All'interno di tutti questi derivati esiste un alcaloide dominante o per effetto

biologico oppure per quantità. Inoltre, la concentrazione di alcaloidi non è omogenea in ogni parte della pianta e la zona del loro accumulo è specie-specifica. Nella *C. acuminata* essi si trovano principalmente nella corteccia, nella radice, nel frutto ma soprattutto nelle foglie, specialmente in quelle giovani (Zhang et al., 2017). La camptotecina ha una struttura pentaciclica, costituita da un anello principale pirrolchinolinico, una porzione piridonica coniugata e un lattone che contiene un centro chirale la cui conformazione S è fondamentale per l'interazione con la DNA topoisomerasi I (Wall et al., 1966) (Fig. 3). Esistono anche molti derivati che mantengono lo scheletro della molecola con modificazioni biosintetiche a carico dei carboni C-10, C-11, C-18 e C-20, tra cui 10-idrossicamptotecina, 10- metossicamptotecina, 10-idrossi-20-deossicamptotecina, 10-metossi-20-O- acetilcamptotecina, 11-metossicamptotecina, 11-idrossicamptotecina, 18 idrossicamptotecina e 20-deossicamptotecina. Nella pianta sono presenti anche altri alcaloidi, sebbene in misura molto minore, come l'angustolina, la camptacumotina, la camptacumanina e la naucleficina (Li et al., 2014).

### **3.2 Via biosintetica della camptotecina**

Per quanto riguarda il quantitativo di camptotecina contenuto nella pianta, questo si concentra soprattutto nelle foglie giovani, ovvero quelle che hanno meno di una settimana di vita; qui la percentuale dell'alcaloide rispetto alla massa totale della foglia disidratata è pari a circa lo 0,25% e tende a diminuire durante la vita vegetativa della stessa foglia. Ne è presente una quantità inferiore in giovani radici e frutti maturi, che sono utilizzati per i processi estrattivi al fine di aumentare la resa di ottenimento della molecola e poiché l'estrazione e l'isolamento della molecola dalla fonte vegetale continua a rappresentare un metodo economicamente vantaggioso e sostenibile rispetto alla sintesi totale (Zhang et al., 2017; Jadhav et al., 2025).

La biosintesi della camptotecina all'interno della pianta è un processo molto complesso che richiede l'intervento di diverse reazioni chimiche catalizzate da altrettanti enzimi. Nello specifico, il pathway biosintetico può suddividersi in tre fasi principali: la fase pre-strictosidina, che comprende la sintesi dei precursori triptamina e secologanina; la sintesi

della strictosidina, ottenuta tramite condensazione catalizzata dall'enzima strictosidina sintasi (STR); e la fase post-strictosidina, in cui la strictosidina viene trasformata, attraverso ciclizzazioni e ossidazioni, nella camptotecina (Lu et al., 2009; Kai et al., 2015; Kumar et al., 2024).

La fase pre-strictosidina della biosintesi della camptotecina coinvolge la formazione di due precursori fondamentali: la triptamina e la secologanina. La triptamina deriva dal triptofano, un amminoacido sintetizzato attraverso la via dello shikimato, che viene successivamente decarbossilato dall'enzima triptofano decarbossilasi (TDC); parallelamente, la secologanina, un monoterpenoide, è ottenuta dalla condensazione di IPP (isopentenil pirofosfato) e DMAPP (dimetilallil pirofosfato), prodotti rispettivamente dalle vie MEP (2-C-metil-D-eritritolo-4-fosfato, localizzata nei plastidi) e MVA (mevalonato, attiva nel citoplasma). La biosintesi della secologanina procede attraverso una sequenza enzimatica ben definita: la geranil pirofosfato sintasi (GPPS) catalizza la formazione del geranil pirofosfato, la geraniolo sintasi (GES) lo converte in geraniolo; la geraniolo 10-idrossilasi (G10H) e la 10-idrossigeraniolo ossidoreduttasi (10HGO) portano invece alla formazione di loganina, che a sua volta permette l'azione della iridoide sintasi (IS) e della secologanina sintasi (SLS), che completano la trasformazione in secologanina (Kai et al., 2015; Kumar et al., 2024).

Questi due precursori, ovvero secologanina e triptamina, convergono successivamente nella sintesi della strictosidina, nodo centrale del pathway biosintetico della camptotecina; essa si forma tramite una reazione di tipo Pictet-Spengler tra triptamina e secologanina, catalizzata dall'enzima strictosidina sintasi (STR), localizzato nel vacuolo cellulare, il quale consente l'accumulo sicuro di metaboliti potenzialmente tossici per la vita della pianta stessa. La reazione genera inoltre un centro chirale in posizione C-21, fondamentale per la stereochimica e il meccanismo d'azione della molecola (Lu et al., 2009; Jadhav et al., 2025).

La fase post-strictosidina rappresenta invece il segmento finale e più articolato del pathway biosintetico della camptotecina, con un primo passaggio che prevede la

conversione della strictosidina in strictosamide, tramite una ciclizzazione intramolecolare. Dopo la formazione della strictosamide, la molecola subisce una serie di modificazioni strutturali che includono ossidazioni sequenziali, ciclizzazioni e rimozioni di gruppi funzionali. In particolare, si osservano l'ossidazione e la riciclizzazione degli anelli B e C, l'ossidazione dell'anello D, la defosforilazione e la rimozione del glucoside in C-21, e, infine, l'ossidazione dell'anello E, che porta alla formazione dell'  $\alpha$ -idrossi- $\delta$ -lattone, struttura essenziale per l'attività biologica della camptotecina (Kumar et al., 2024; Lu et al., 2009).

Questi ultimi passaggi, ancora in parte non completamente elucidati, sono oggetto di studio nell'ambito dell'ingegneria metabolica, con l'obiettivo di identificare gli enzimi chiave e ottimizzare la produzione della molecola in sistemi eterologhi o colture cellulari (Lu et al., 2009; Kai et al., 2015). La presenza di numerosi derivati intermedi in diverse specie vegetali, inoltre, suggerisce l'esistenza di pathway alternativi o ramificati, che potrebbero essere sfruttati per aumentare la resa biosintetica o per generare analoghi strutturali con proprietà farmacologiche migliorate.

### **3.3 Fonti alternative e processi di isolamento di camptotecina**

Nonostante la *Camptotheca acuminata* rimanga indiscutibilmente la fonte vegetale più rilevante per l'isolamento di camptotecina, studi recenti hanno infatti rivelato che questo alcaloide è presente anche in numerose altre specie appartenenti a famiglie botaniche differenti, tra cui *Nothapodytes nimmoniana*, *Ophiorrhiza pumila*, *Ophiorrhiza mungos*, *Miquelia dentata*, *Pyrenacantha volubilis* e *Mostuea brunonis*, che, seppure inferiori, mostrano contenuti variabili della molecola nei diversi organi vegetali (Jadhav et al., 2025; Kumar et al., 2024).

L'ottenimento della camptotecina dalle fonti vegetali rappresenta quindi una fase cruciale per la sua applicazione farmaceutica, sia in ambito clinico che industriale. A causa della sua instabilità e della bassa concentrazione nei tessuti vegetali, sono stati sviluppati numerosi protocolli per ottimizzare la resa, ridurre i passaggi ed incrementare la purezza del composto. I primi tentativi hanno preso in considerazione metodologie classiche come

la macerazione in solventi organici che rappresentano il processo più semplice ma lungo e non economico se i vari solventi non sono riutilizzati. Oltre a questi primi approcci sono stati sviluppati altri metodi come tecniche avanzate di isolamento cromatografico, approcci basati sulla manipolazione del pH per la separazione selettiva e, non meno importanti le strategie biotecnologiche (Oberlies et al., 2004; Kai et al., 2015).

### Estrazione tramite macerazione

L'estrazione della camptotecina attraverso semplice macerazione all'inizio ha utilizzato solventi come diclorometano e acetone che non hanno dimostrato avere una polarità sufficiente ad esaurire la droga. Un solvente maggiormente affine alla polarità della molecola risulta essere una soluzione di metanolo al 70% in acqua (v/v). Tuttavia, sebbene semplici, questi approcci, presentano limiti significativi tra cui: utilizzo di volumi elevati di solvente, lunghi tempi di estrazione e cicli ripetuti per ottenere rese accettabili. Al termine del processo che vede coinvolto il solvente è inoltre necessario un successivo processo di rimozione del solvente. Essendo presente anche acqua, la tecnica più adatta è la liofilizzazione, la quale inibisce la degradazione termica che la camptotecina potrebbe subire (Oberlies et al., 2004; Jadhav et al., 2025).

### Estrazione tramite cromatografia

L'estrazione cromatografica della camptotecina unisce i principi della cromatografia a colonna con un'estrazione dinamica a flusso controllato, consentendo di massimizzare l'efficienza estrattiva riducendo al contempo il consumo di solventi e i tempi operativi (Kai et al., 2015; Kumar et al., 2024). Con questa tecnica, il materiale vegetale essiccato e finemente polverizzato viene caricato in colonne di vetro, impaccato in modo omogeneo dove funge da fase stazionaria. Il solvente di estrazione, agendo come fase mobile, è fatto percolare attraverso la colonna in modo lento tale da garantire una distribuzione uniforme del flusso e un contatto ottimale tra solvente e matrice vegetale, favorendo la solubilizzazione della camptotecina e la sua progressiva eluizione in frazioni distinte, raccolte e analizzate per determinarne la concentrazione (Lu et al., 2009; Jadhav et al., 2025). Le frazioni vengono differenziate in base alla porzione di solvente raccolta

successivamente all'eluizione: ciascuna porzione rappresenta una frazione distinta, con concentrazione decrescente di camptotecina. La concentrazione del principio attivo mostra infatti una distribuzione decrescente lungo tali frazioni: la prima contiene in media il 70–80% del totale estratto, la seconda il 15–20%, e la terza meno del 10%. Per migliorare ulteriormente la resa e ridurre il consumo complessivo di solvente, è usato un sistema ciclico, in cui la seconda e terza frazione ancora ricche di camptotecina, sono riutilizzate come solvente di estrazione per nuovo materiale vegetale, consentendo di mantenere rese di estrazione superiori al 97% (Kumar et al., 2024; Jadhav et al., 2025).

### Purificazione della camptotecina

Una volta completato l'isolamento preliminare della camptotecina, è necessario procedere a una fase di purificazione selettiva, volta a separare il principio attivo dalle impurezze co-estratte. Tra le strategie più efficaci si annovera la manipolazione controllata del pH, che sfrutta la sensibilità strutturale della molecola per ottimizzarne l'isolamento (Lu et al., 2009; Kai et al., 2015). La camptotecina, avendo una struttura chimica caratterizzata da un anello lattonico  $\alpha$ -idrossi- $\delta$ -lattone, è estremamente sensibile alle variazioni di pH: esso infatti, in ambiente basico, tende ad aprirsi irreversibilmente, generando una forma carbossilata inattiva, mentre in ambiente acido può riconvertirsi nella forma lattonica attiva (Kumar et al., 2024, Jadhav et al., 2025).

Dopo l'estrazione preliminare tramite macerazione o tecniche cromatografiche, la soluzione grezza contenente camptotecina e altri metaboliti secondari viene sottoposta a un trattamento alcalino, portando il pH a circa 8.0. In queste condizioni, la molecola si trova prevalentemente nella sua forma carbossilata aperta, solubile in acqua, mentre molte impurezze lipofile e alcaloidi non desiderati precipitano o si separano in fase organica, consentendo una prima rimozione selettiva delle componenti indesiderate (Lu et al., 2009). Successivamente, la soluzione viene acidificata fino a pH 3.0, condizione in cui la camptotecina si riconverte nella sua forma lattonica chiusa, più lipofila e farmacologicamente attiva; in questa fase, la CPT può essere estratta selettivamente tramite ripartizione liquido/liquido, utilizzando solventi organici immiscibili con l'acqua,

come cloroformio o etil acetato (Kai et al., 2015; Kumar et al., 2024). La molecola si trasferisce quindi nella fase organica, mentre le impurezze idrosolubili rimangono nella fase acquosa, permettendo l'isolamento del solo principio attivo in forma pura ed evitando la coestrazione di composti polari o instabili (Jadhav et al., 2025).

Il processo di purificazione si conclude con la concentrazione sottovuoto e la cristallizzazione in miscele di solventi, ottenendo camptotecina in polvere e altamente pura ( $\geq 98\%$ ) (Oberlies et al., 2004; Lu et al., 2009). La manipolazione del pH, pur essendo complementare alle tecniche estrattive primarie, rappresenta dunque un passaggio cruciale per preservare la stabilità dell'anello lattonico e garantire l'efficacia terapeutica del composto (Kai et al., 2015; Kumar et al., 2024).

### Tecniche biotecnologiche

Come accennato in precedenza, la CPT viene ancora ottenuta principalmente tramite estrazione da risorse vegetali naturali, un metodo che non è in grado di soddisfare l'elevata richiesta globale; si è quindi pensato che l'evoluzione delle biotecnologie potesse offrire una soluzione al problema, grazie alla comprensione approfondita del percorso biosintetico della CPT e dei suoi meccanismi di regolazione molecolare (Lu et al., 2009).

Tra le strategie biotecnologiche più promettenti per la produzione ecosostenibile di camptotecina, l'impiego di colture vegetali in vitro rappresenta un'alternativa valida alla tradizionale raccolta da *Camptotheca acuminata*. Queste ultime possono derivare da masse indifferenziate di cellule, fatte sviluppare in capsule e successivamente trasferite in mezzi liquidi (bioreattori), dove le cellule proliferano in sospensione, permettendo una produzione continua e controllata del principio attivo. Tuttavia, non verificandosi un differenziamento cellulare vegetale, le rese sono limitate (Kai et al., 2015; Kumar et al., 2024). Le radici avventizie, invece, sono strutture radicali indotte in vitro da segmenti di pianta madre, che garantiscono una maggiore capacità biosintetica rispetto alle cellule indifferenziate, offrendo rese più elevate e stabilità genetica (Kai et al., 2015; Jadhav et al., 2025).

Ancora più efficaci sono i sistemi “hairy roots”, ottenuti mediante trasformazione genetica con *Rhizobium rhizogenes*, un batterio del suolo capace di trasferire il proprio DNA nelle cellule vegetali inducendo la formazione di radici iperproliferative e geneticamente stabili. Queste radici trasformate crescono in liquido di coltura 16 volte più velocemente in 5 settimane ed accumulano come alcaloide maggioritario la CPT con rese maggiori rispetto alla pianta (Kai et al., 2015; Jadhav et al., 2025).

Oltre ai sistemi vegetali in vitro, ci si può avvalere di approcci microbici. In particolare, l'impiego di funghi endofitici rappresenta una delle soluzioni più promettenti, grazie alla loro capacità di biosintetizzare il principio attivo in condizioni controllate. Ceppi appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Phomopsis*, isolati da piante produttrici di CPT, sono stati infatti identificati come capaci di biosintetizzare il principio attivo, rendendoli candidati ideali per la produzione industriale, con vantaggi in termini di idoneità alla produzione su larga scala, stabilità e ridotto impatto ambientale (Fig. 5) (Jadhav et al., 2025; Kumar et al., 2024).

Un ulteriore potenziamento della resa biosintetica può essere ottenuto tramite elicitori chimici e fisici, come acido salicilico, jasmonato di metile, lievito, metalli pesanti e radiazioni gamma. Gli elicitori stimolano le vie metaboliche secondarie coinvolte nella sintesi della camptotecina, solitamente attivando i meccanismi di difesa della cellula (Pu et al., 2022; Jadhav et al., 2025). In parallelo, l'alimentazione con i precursori biosintetici come triptamina, secologanina e leucina ha dimostrato di incrementare significativamente la produzione del principio attivo, agendo direttamente su molecole chiave nel pathway biosintetico (Lu et al., 2009; Kai et al., 2015).

Infine, grazie all'ingegneria metabolica e all'editing genico, è oggi possibile produrre camptotecina anche in organismi diversi dalle piante, come batteri o lieviti. Questo risultato si ottiene modificando i geni responsabili della sintesi della strictosidina, altro composto chiave nella formazione della camptotecina (Lu et al., 2009; Kai et al., 2015; Jadhav et al., 2025).

Queste strategie biotecnologiche non solo garantiscono una produzione più efficiente e sostenibile, ma contribuiscono anche alla conservazione della biodiversità, alla riduzione dell'impatto ambientale e alla standardizzazione industriale del principio attivo, rendendo la camptotecina e i suoi derivati accessibili in modo etico e scalabile per la terapia chemioterapica moderna (Jadhav et al., 2025; Kumar et al., 2024).

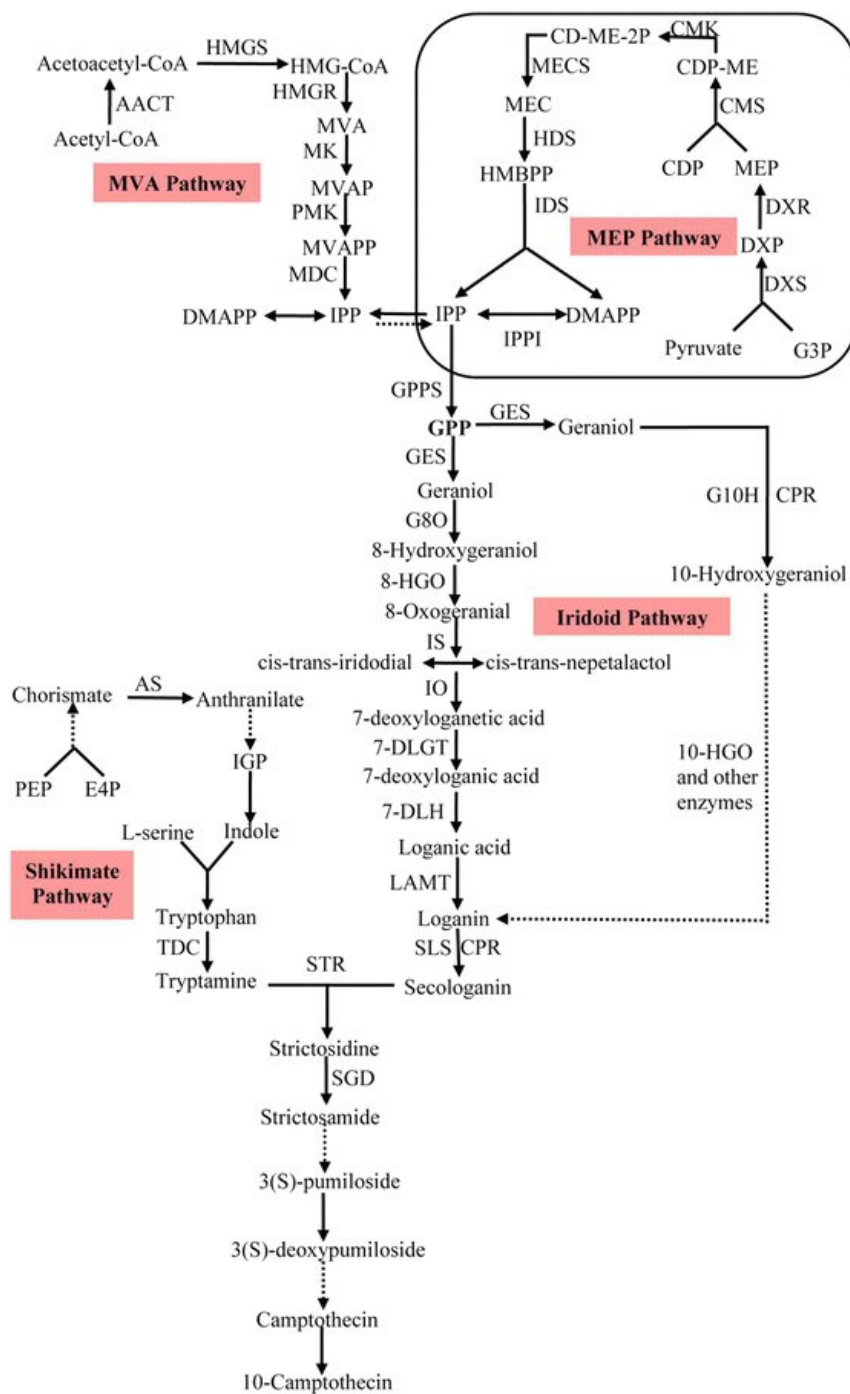


Fig. 4: Pathway biosintetico della camptotecina.

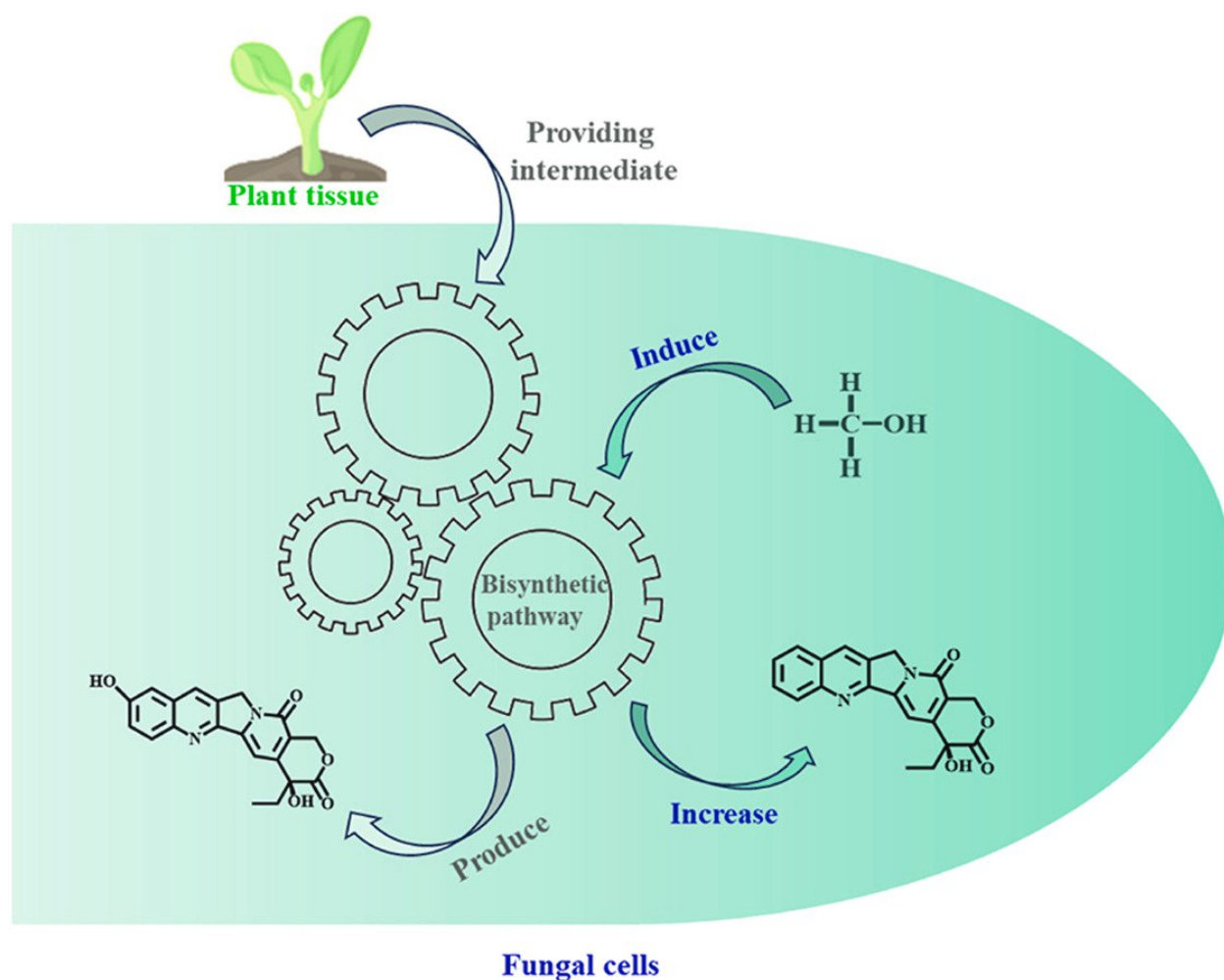


Fig. 5: Rappresentazione schematica della biosintesi della camptotecina da parte di funghi endofitici isolati da *Camptotheca acuminata* che utilizzano un pathway semplificato.

## **4. Meccanismo d'azione della camptotecina e topoisomerasi I**

### **4.1 La topoisomerasi I**

Per capire appieno il meccanismo di azione della camptotecina è indispensabile chiarire le attività del suo target: la topoisomerasi I, enzima fondamentale per la vita umana. La struttura estesa e a doppia elica del DNA rappresenta una sfida per gli organismi viventi; la sua compattazione e impacchettamento all'interno dei cromosomi richiede un determinato ordine affinché possano concretizzarsi successivi processi fondamentali quali la trascrizione, la replicazione e la riparazione dello stesso. Le topoisomerasi giocano un ruolo fondamentale proprio nel gestire quelli che sono i processi di ripiegamento del DNA, rendendolo più o meno disponibile a enzimi terzi attraverso il temporaneo clivaggio dei due filamenti che lo compongono. La topoisomerasi I, nello specifico, opera il clivaggio di un solo strand del DNA senza cofattori energetici, portando di fatto al rilassamento della doppia elica (Pommier, 2006). Essa si comporta come una pinza molecolare, che lega, attraverso un residuo di tirosina catalitica, il fosfato in posizione 3' del DNA tramite una reazione di transesterificazione. Questo legame covalente consente al filamento tagliato di ruotare attorno a quello complementare, dissipando la tensione torsionale accumulata. A questo punto, l'estremità del filamento tagliato, che presenta un gruppo ossidrilico in posizione 5', viene riallineata con precisione accanto al punto di taglio, permettendo il ripristino dell'integrità del DNA. Si garantisce quindi una corretta topologia del DNA, riferita alla sua conformazione tridimensionale nello spazio, in particolare al suo grado di superavvolgimento e ai possibili intrecci. Nei tumori, in cui meccanismi come la replicazione e trascrizione sono iperattivi, la TOP1 è certamente sovra espressa, rappresentando di fatto un bersaglio per farmaci antitumorali come la camptotecina e i suoi derivati.

### **4.2 Topoisomerasi I e camptotecina**

Le molecole che hanno come target la TOP1, tra cui la CPT operano con un meccanismo di inibizione non competitivo: esse non si legano direttamente al sito attivo dell'enzima, ma si inseriscono all'interfaccia tra TOP1 e il DNA nel momento in cui il DNA stesso è stato tagliato. Il legame risultante, quello tra camptotecina e TOP1, stabilizza il complesso di clivaggio, impedendo che l'enzima completi la religazione del DNA. Esso avviene grazie alle interazioni dell'anello pirrolchinolinico della CPT con le basi azotate del DNA clivato e soprattutto a livello dell'anello lattonico, che forma legami a idrogeno con residui amminioacidici della TOP1, come Arg364 e Asn722 (Staker et al., 2002). Questo processo blocca la forcella replicativa, genera una rottura del doppio filamento e, il danno, di fatto irreparabile, porta all'apoptosi cellulare. L'azione tuttavia, è di tipo reversibile: se il farmaco viene rimosso, il complesso può dissociarsi spontaneamente entro pochi minuti, permettendo all'enzima di richiudere il DNA.

È proprio la selettività farmacologica a rendere queste strutture ottime risorse nella terapia chemioterapica, infatti la stessa CPT ha come unico bersaglio biologico la topoisomerasi riducendo quelle che possono essere reazioni avverse dovute a interazioni off-target. Questo è provato anche dall'inefficacia del farmaco in casi in cui la TOP1 risulta essere modificata, da mutazioni puntiformi ad esempio, come dimostrato con cellule di lievito (Chrencik et al., 2004). Un'altra caratteristica fondamentale riguarda il centro chirale, che, se invertito da S a R, causa una inattivazione totale della molecola. La camptotecina inoltre, legandosi in modo reversibile al complesso di clivaggio TOP1 DNA, è uno strumento farmacologico preciso, che consente di controllare con accuratezza l'esposizione e l'intrappolamento del complesso stesso.

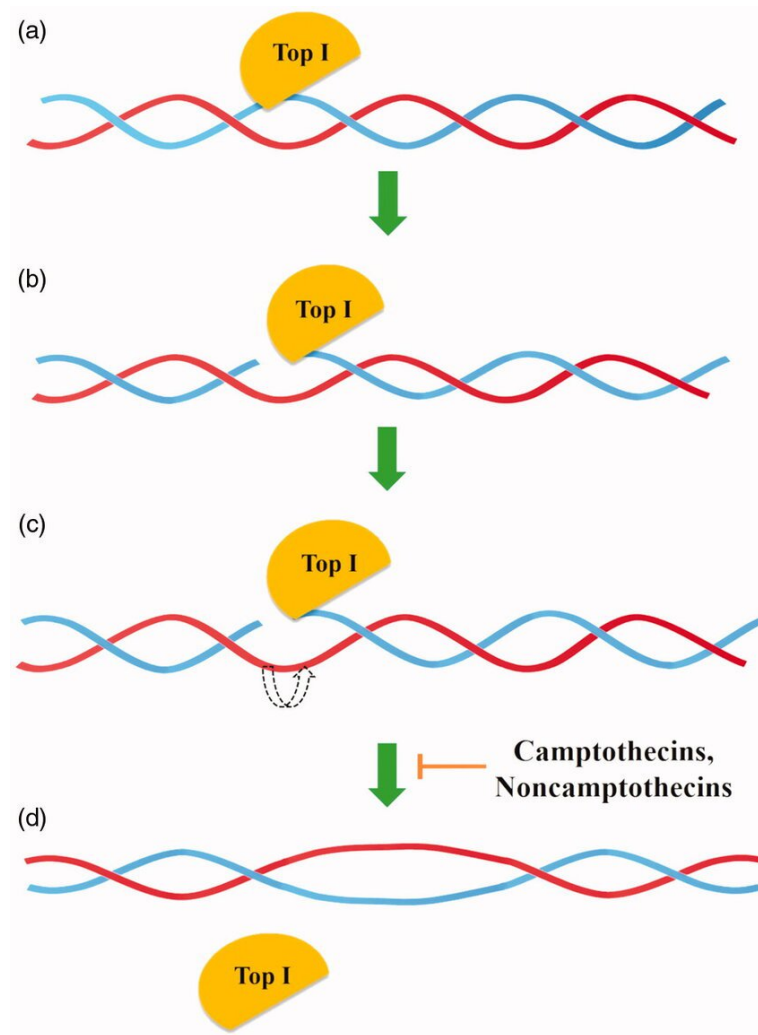


Fig. 6: Meccanismo d'azione della topoisomerasi I: (a) TOP 1 lega il DNA, (b) rottura di un singolo strand del DNA (in blu), (c) rotazione controllata dello strand integro (in rosso), (d) religazione dello strand clivato. Le camptotecine inibiscono il passaggio da (c) a (d).

### 4.3 Resistenza alla camptotecina e tossicità

Nel trattamento chemioterapico si può tuttavia verificare un fenomeno definito “resistenza” e cioè un’attitudine delle cellule tumorali a sopravvivere e a sconfiggere il trattamento, e, purtroppo, la camptotecina non fa eccezione. Sono diversi i modi con cui la molecola rischia di sviluppare resistenza: ci possono essere meccanismi pre-target, che, ad esempio, coinvolgono il profilo farmacocinetico, meccanismi che coinvolgono direttamente il target o altri che interagiscono a livello post-target, come possono esserlo processi apoptotici.

Tra la prima tipologia di meccanismo di resistenza specifico da parte delle cellule tumorali è annoverata un’aumentata attività dei trasportatori di efflusso, in particolare quelli appartenenti alla superfamiglia ABC (ATP-Binding Cassette), che sono di fatto proteine di membrana che espellono farmaci fuori dalla cellula, inclusi gli inibitori della topoisomerasi I come le camptotecine (Pommier et al., 2010).

Anche la localizzazione cellulare della topoisomerasi I è stata ipotizzata come un altro potenziale meccanismo di resistenza per i farmaci che colpiscono questo enzima target, come d’altronde anche una riduzione nell’espressione dell’enzima stesso. Affinché la topoisomerasi venga colpita deve localizzarsi nel nucleo e non deve presentare anomalie genetiche. È inoltre stato osservato che nei soggetti sottoposti a trattamento continuativo con camptotecine si verifica una down-regulation dell’espressione della topoisomerasi I, fenomeno che può ridurre progressivamente l’efficacia terapeutica. Regimi di trattamento ciclici o intermittenti potrebbero risultare più vantaggiosi nel preservare la sensibilità del tumore al farmaco e nel limitare l’insorgenza di resistenza (Garcia-Carbonero et al., 2002).

Oltre ai problemi legati alla resistenza, la camptotecina presenta una tossicità sistemica significativa che ne limita l’impiego. Diversi studi evidenziano infatti una marcata mielosoppressione nei pazienti trattati, con riduzione di leucociti, eritrociti e piastrine, che rende la molecola responsabile di un elevato rischio di infezioni e sanguinamenti. A livello gastrointestinale, la CPT provoca ulcerazioni e danni alla mucosa, dovuti alla sua

persistenza prolungata nell'intestino; queste manifestazioni si traducono spesso in fenomeni diarroici, in genere severi e persistenti (Pommier, 2006). Sono inoltre documentati effetti epatotossici, che possono causare alterazioni della funzionalità dell'organo, culminante con necrosi epatica; può inoltre essere compromesso il rene, con una riduzione della clearance renale e conseguente accumulo del principio attivo. In alcuni modelli animali sono stati osservati anche fenomeni cardiovascolari, come ipotensione e aritmie, mentre la mortalità risulta dose-dipendente, con valori di LD 50 particolarmente bassi nei cani e nei primati, specie che mostrano una sensibilità più vicina a quella umana. Questi limiti tossicologici hanno reso necessario lo sviluppo di derivati semisintetici più stabili e tollerabili, come topotecano e irinotecano, e di nuove formulazioni capaci di ridurre gli effetti collaterali mantenendo l'efficacia terapeutica (Schaeppi et al., 1974).

## **5. Derivati semisintetici della camptotecina**

### **5.1 Topotecano e irinotecano**

La camptotecina presenta delle proprietà che ne precludono un efficace utilizzo nella terapia antitumorale. Fattore critico è la sua scarsa solubilità in acqua, attribuita alla debole basicità dell'anello chinolinico, che ne limita la somministrazione per via parenterale (Thomas et al., 2004; Gong et al., 2025). Per ovviare a questo problema, è sviluppata la sua forma salina, ovvero una versione modificata in cui il gruppo carbossilico è ionizzato e associato a uno ione positivo (come il sodio), rendendola più solubile in acqua. Questa forma salificata, tuttavia, è meno attiva farmacologicamente, perché presenta la forma carbossilica, meno efficace rispetto alla forma lattonica, vera responsabile dell'interazione con la topoisomerasi I (Gong et al., 2025; Thomas et al., 2004). Nonostante alcune prove di parziale efficacia, questo farmaco è stato abbandonato anche a causa della severa e imprevedibile tossicità quale la comparsa di cistite emorragica, che è caratterizzata da infiammazione e sanguinamento della mucosa vescicale (Arora et al., 2008; Kweekel, 2008). Le innovazioni tecnologiche e la ricerca farmacologica hanno successivamente permesso di creare altri analoghi, più efficaci e

sicuri: la 9-nitrocamptotecina, la 9-amminocamptotecina, la karenitecina, ma soprattutto il topotecano e l'irinotecano (Fig. 7) (Thomas et al., 2004; Gong et al., 2025). Questi ultimi, oltre ad essere i primi analoghi approvati dalla Food and Drug Administration, sono oggi ampiamente utilizzati nella chemioterapia. In termini di impiego, l'irinotecano è indicato per il trattamento del carcinoma coloretale metastatico, mentre il topotecano viene impiegato come terapia di seconda linea per il tumore ovarico e il carcinoma polmonare a piccole cellule (Gong et al., 2025; Arora et al., 2008). Il topotecano, nello specifico, è ottenuto modificando la camptotecina in posizione C-9, dove viene introdotto un gruppo dimetilaminometilico; questa modifica conferisce alla molecola una maggiore solubilità in acqua e una maggiore stabilità della forma lattonica, rendendola più adatta alla somministrazione endovenosa (Thomas et al., 2004; Gong et al., 2025). L'irinotecano, invece, è un profarmaco; la sua struttura include una catena laterale carbammato-piperidinica in posizione C-10, che lo rende inattivo fino a quando non viene metabolizzato nell'organismo (Gong et al., 2025; Kweekel, 2008). A livello epatico, infatti, è presente una carbossilesterasi che lo converte nel metabolita attivo SN-38, caratterizzato da una potenza superiore rispetto alla camptotecina e una forma lattonica più stabile; questa strategia consente dunque di migliorare la biodisponibilità e di ridurre la tossicità sistemica (Kweekel, 2008; Arora et al., 2008).

È inoltre importante ricordare che, oltre allo stesso meccanismo d'azione, questi derivati condividono con la camptotecina l'origine naturale: sia il topotecano che l'irinotecano sono derivati semisintetici sviluppati a partire dalla camptotecina, che rappresenta il precursore indispensabile per la loro produzione (Thomas et al., 2004; Gong et al., 2025).

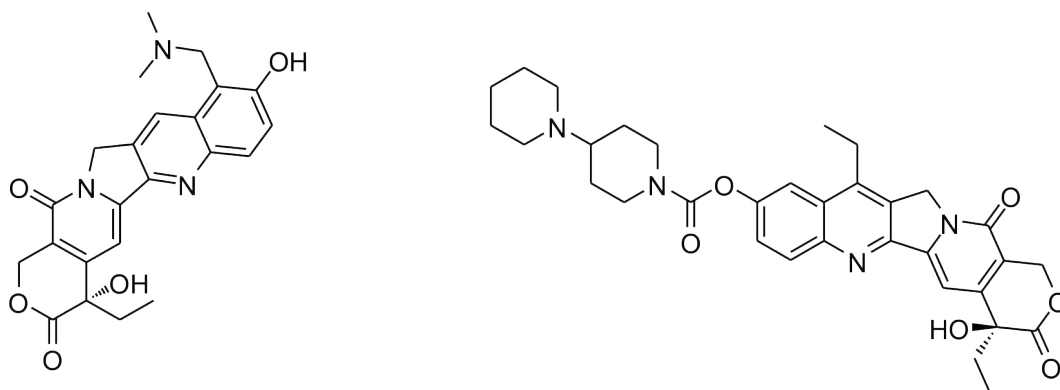


Fig. 7: Struttura chimica di topotecano e irinotecano.

## 5.2 Dalla camptotecina all'irinotecano e topotecano: processi semi-sintetici

Lo sviluppo di derivati clinicamente utilizzabili della camptotecina non si è limitato alla semplice individuazione di analoghi più solubili e meglio tollerati, ma ha richiesto la messa a punto di veri e propri processi semi-sintetici, in grado di trasformare la molecola naturale in farmaci oggi impiegati nella terapia antitumorale (Nguyen et al., 2021). Alla base di tali strategie vi è la 10-idrossicamptotecina, altro metabolita estraibile dalla pianta, che rappresenta il punto di partenza indispensabile per la sintesi di topotecano e irinotecano; questa molecola, oltre a condividere con la camptotecina la stessa origine botanica, va incontro a processi estrattivi analoghi (Mahendran et al., 2020).

Le tecniche precedentemente descritte per l'estrazione della camptotecina trovano dunque applicazione anche in questo caso, sebbene siano richieste metodologie più raffinate o approcci biotecnologici a causa della concentrazione più ridotta della 10-idrossicamptotecina nella pianta; essa si riscontra infatti in quantità pari allo 0,01–0,05% della massa secca, rispetto a circa lo 0,25% rilevato per la camptotecina (Mahendran et al., 2020). Tra tali tecniche si annoverano metodologie di estrazione assistita da ultrasuoni o microonde, l'impiego di solventi innovativi come liquidi ionici e, in prospettiva, approcci biotecnologici basati sulla coltivazione di endofiti fungini capaci di biosintetizzare direttamente l'alcaloide (Nguyen et al., 2021).

Una volta ottenuta la 10-idrossicamptotecina, la semi-sintesi procede con modificazioni mirate in posizioni chiave della molecola: nel caso del topotecano, si assiste all'introduzione di un gruppo dimetilaminometilico in posizione C-9 mediante una reazione di tipo Mannich, ottenuta tramite trattamento con formaldeide e dimetilammina (Nguyen et al., 2021). Per l'irinotecano, invece, l'esterificazione con una catena carbammato-piperidinica in posizione C-10 avviene trattando la 10-idrossicamptotecina con un opportuno derivato piperidinico carbammato, reagente chiave nella formazione del legame estereo; il prodotto finale è un profarmaco che viene successivamente convertito nel metabolita attivo SN-38 ad opera delle carbossilesterasi epatiche e intestinali (BOC Sciences, 2024).

È inoltre doveroso specificare che la scelta delle posizioni C-9 e C-10 come siti di intervento non è casuale, ma risponde a una precisa logica strutturale: entrambe rappresentano punti reattivi strategici che permettono di introdurre gruppi funzionali senza alterare l'integrità del nucleo pentaciclico, consentendo al contempo di modulare proprietà essenziali quali solubilità, stabilità della forma lattonica e profilo farmacocinetico, con un conseguente impatto sul miglioramento delle caratteristiche farmacologiche dei derivati della camptotecina (Nguyen et al., 2021; BOC Sciences, 2024).

### **5.3 Posologia e tossicità**

La chemioterapia rappresenta una delle principali strategie terapeutiche nella lotta contro il cancro, basata sull'impiego di farmaci citotossici capaci di interferire con la proliferazione cellulare (Arora et al., 2008; Gong et al., 2025). Il trattamento è generalmente suddiviso in cicli, ciascuno dei quali prevede una fase di somministrazione seguita da un intervallo di riposo, necessario per permettere all'organismo di recuperare dagli effetti tossici provocati dalla terapia stessa (Arora et al., 2008; Kweekel, 2008). La durata e la frequenza dei cicli dipendono da molteplici fattori, come il tipo di tumore, i farmaci utilizzati e la risposta del paziente. Irinotecano e topotecano non fanno eccezione, in quanto il loro

meccanismo d'azione, pur essendo predisposto maggiormente contro le cellule tumorali, comporta inevitabilmente danni anche alle cellule sane ad alta proliferazione, rendendo necessaria una pianificazione attenta dei cicli di somministrazione per contenere la tossicità (Gong et al., 2025; Thomas et al., 2004).

Entrando nel dettaglio, l'irinotecano viene somministrato per via endovenosa, generalmente con infusioni di 30–90 minuti ogni 1–3 settimane, spesso in combinazione con altri farmaci come 5-fluorouracile (Kweekel, 2008; Gong et al., 2025). Quest'ultima è una molecola con funzione antimetabolita, che inibisce quindi la sintesi di DNA e RNA, e la sua associazione con l'irinotecano permette di incrementare l'efficacia del trattamento. I diversi meccanismi d'azione permettono, infatti, un'azione diretta su più fronti della cellula tumorale (Gong et al., 2025; Arora et al., 2008). Il topotecano, invece, non essendo una pro-drug, è attivo direttamente e può essere somministrato sia per via endovenosa che orale; la somministrazione solitamente prevede infusioni giornaliere per 5 giorni consecutivi ogni 3 settimane (Thomas et al., 2004; Gong et al., 2025).

Come anticipato precedentemente, irinotecano e topotecano agiscono con un meccanismo citotossico non selettivo, colpendo non solo le cellule tumorali maligne ma anche quelle sane ad alta proliferazione, comprese quelle del midollo osseo, del tratto gastrointestinale e dei follicoli piliferi (Arora et al., 2008; Gong et al., 2025). Il loro profilo tossicologico è dipendente dalla dose e dallo schema di somministrazione; per quanto riguarda l'irinotecano le due principali tossicità dose-limitanti sono rappresentate dalla dissenteria e dalla neutropenia, che possono manifestarsi con severità variabile a seconda del regime terapeutico (Kweekel, 2008; Arora et al., 2008). La dissenteria si può presentare in due forme distinte: una acuta, di origine colinergica, che può essere efficacemente prevenuta con atropina, e una ritardata, che insorge oltre le 24 ore dalla somministrazione e può diventare potenzialmente letale a causa di disidratazione e conseguenti squilibri elettrolitici (Kweekel, 2008; Gong et al., 2025). I pazienti più vulnerabili includono gli anziani, i soggetti sottoposti a precedenti trattamenti radioterapici e quelli con funzionalità epatica ridotta; è importante ricordare che anche l'assunzione concomitante di farmaci o integratori può alterare il metabolismo del farmaco,

aumentando il rischio di effetti avversi (Arora et al., 2008; Kweekel, 2008). In presenza di più fattori di rischio, persino una dose iniziale ridotta può risultare non sicura, rendendo necessaria la considerazione di alternative terapeutiche (Kweekel, 2008; Gong et al., 2025). La mielosoppressione, invece, è un effetto avverso che riguarda anche il topotecano; in particolare, la neutropenia rappresenta una delle manifestazioni più comuni e clinicamente rilevanti, poiché comporta una riduzione significativa dei neutrofili circolanti, aumentando il rischio di infezioni e complicanze febbrili, soprattutto nei pazienti sottoposti a cicli ravvicinati o con riserva midollare compromessa (Arora et al., 2008; Gong et al., 2025).

#### **5.4 Oltre irinotecano e topotecano: nuovi analoghi per una chemioterapia più selettiva e tollerabile**

Negli ultimi decenni l'interesse verso le camptotecine si è consolidato grazie alla loro efficacia nel trattamento di diversi tumori solidi attraverso i derivati semisintetici irinotecano e topotecano (Gong et al., 2025; Thomas et al., 2004). Il loro impiego clinico può però essere limitato dai citati problemi di tossicità legati alla scarsa selettività e instabilità chimica (Arora et al., 2008; Kweekel, 2008). Queste criticità hanno spinto la ricerca farmacologica verso la progettazione di nuove molecole che mantengano il meccanismo d'azione originario, ma con profili terapeutici più favorevoli. Le prospettive future nella ricerca sulle camptotecine tendono dunque a concentrarsi sullo sviluppo di nuovi derivati strutturalmente modificati, in grado di migliorare selettività, potenza e profilo di sicurezza rispetto ai farmaci attualmente in uso (Gong et al., 2025; Thomas et al., 2004).

Tra i nuovi derivati in fase di sviluppo o già oggetto di sperimentazione clinica, sono presenti molecole come belotecan, gimatecan, exatecan e il coniugato trastuzumab deruxtecan (Gong et al., 2025; FPRC, 2024). Questi composti mantengono l'inibizione della topoisomerasi I ma presentano modifiche strutturali mirate a migliorare la farmacocinetica, la selettività e la tollerabilità (Pommier, 2006; Chrencik et al., 2004).

Il belotecan (fig. 8), ad esempio, è un altro analogo semisintetico, sviluppato con l'obiettivo di migliorare la solubilità e ridurre la tossicità tipica della camptotecina. La sua struttura chimica deriva da modificazioni a carico dell'anello lattonico e della porzione piridone, con l'introduzione di un gruppo isopropilammino-etilico in posizione C-11 e di un residuo etilico in C-4, che conferiscono maggiore stabilità e biodisponibilità sistemica. Queste modifiche permettono il mantenimento della classica attività di inibizione della topoisomerasi I, ma con un profilo farmacocinetico più favorevole e una ridotta incidenza di effetti collaterali gastrointestinali (Kim et al., 2004). Esso mostra un'efficacia clinica significativa, particolarmente elevata nei pazienti naïve alla chemioterapia, mentre la tossicità osservata è stata prevalentemente di tipo ematologico: la neutropenia rappresenta l'effetto collaterale più frequente e dose-limitante, seguita da trombocitopenia e anemia; per contro, gli eventi avversi non ematologici si sono rivelati generalmente lievi (Lee et al., 2008).

Agisce in maniera simile il gimatecan (fig. 9), ottenuto a sua volta attraverso la sostituzione in posizione C-7 con un gruppo lipofilo (trimetilsilil-etossimetile), il quale conferisce una maggiore stabilità chimica e riduce la tendenza all'apertura del lattone, processo che, come discusso, limita l'attività della camptotecina. Questa modifica incrementa anche la biodisponibilità orale, favorendo un assorbimento più efficiente e una distribuzione tissutale più ampia. A differenza di altri derivati come il topotecano e l'irinotecano, il gimatecano mantiene un'elevata affinità per la topoisomerasi I, ma con un profilo farmacocinetico più favorevole e una ridotta incidenza di dissenteria severa, grazie alla sua maggiore stabilità e lipofilia (Rutella et al., 2005). A livello di impiego, esso ha mostrato un'efficacia antitumorale significativa in diversi modelli preclinici e clinici, risultando superiore a irinotecano e topotecano in termini di attività citotossica, soprattutto nei tumori solidi come il carcinoma esofageo e il neuroblastoma (Zou et al., 2018; Rutella et al., 2005).

A differenza della camptotecina e dei derivati finora elencati e mantenenti la tipica struttura pentaciclica, exatecano (fig. 10) si distingue per la presenza di un sistema esaciclico. Questa modifica strutturale, ottenuta mediante l'aggiunta di un sesto anello, è stata

concepita per stabilizzare l'anello lattonico e ridurre la sua rapida idrolisi a pH fisiologico, migliorando sempre la persistenza della forma attiva. In particolare, al C-7 è stato introdotto un gruppo metossi-dietilamminico che conferisce maggiore idrosolubilità, al C-9 è stato inserito un sostituito carbossamidico che contribuisce alla stabilità chimica, al C-10 sono state apportate modifiche con gruppi polari (come catene carbossamidiche sostituite) che incrementano la biodisponibilità sistemica e favoriscono una distribuzione tissutale più ampia, mentre la porzione lattonica in C-11 viene stabilizzata grazie alla conformazione esaciclica. Negli studi clinici, esso dimostra un'efficacia chemioterapica significativa in pazienti con tumori solidi avanzati, come il carcinoma polmonare e quello gastrico, con una tossicità prevalentemente di tipo ematologico: la neutropenia e la trombocitopenia sono risultate gli eventi dose-limitanti, mentre gli effetti non ematologici, come nausea e diarrea, si sono rivelati generalmente più gestibili (Royce et al., 2000; Rowinsky, 2003).

L'exatecano, grazie all'innovativa struttura esaciclica, rappresenta inoltre il punto di partenza ideale per la progettazione di nuovi sistemi terapeutici più complessi; tra questi, il più rilevante è il trastuzumab deruxtecan, un anticorpo farmaco-coniugato (Zouein et al., 2024). Per questo genere di farmaci si intende la combinazione di un anticorpo monoclonale, capace di riconoscere in modo selettivo un bersaglio tumorale, con un agente citotossico legato tramite un linker chimico, che permette quindi di unire targeting specifico e potenza chemioterapica in un'unica strategia terapeutica. Nello specifico, la porzione citotossica è rappresentata dal deruxtecan, ottenuto attraverso l'introduzione di gruppi polari addizionali, principalmente catene carbossamidiche e sostituenti ossigenati, che aumentano la solubilità e la stabilità in ambiente fisiologico; sono proprio questi a consentire il successivo aggancio del linker tetrapeptidico clivabile, il quale garantisce un rilascio intracellulare controllato (Jang et al., 2025). La componente anticorpale è costituita invece dal trastuzumab, un anticorpo monoclonale già ampiamente utilizzato come terapia mirata nei tumori HER2-positivi; la sua funzione è quella di riconoscere in modo selettivo il recettore HER2, sovraespresso in numerosi carcinomi, tra cui quello mammario, quello gastrico e quello polmonare, e di legarsi con elevata affinità alla sua

porzione extracellulare. Il legame risultante blocca direttamente i segnali proliferativi mediati da HER2 e consente anche l'internalizzazione del complesso anticorpo-recettore all'interno della cellula tumorale; questo processo rende quindi possibile il rilascio intracellulare del deruxtecan, garantendo dunque un targeting selettivo e riducendo la tossicità sistemica. L'anticorpo funge quindi da vettore per il trasporto del farmaco citotossico fino al sito d'azione, assicurando che la potenza dell'exatecano modificato venga sfruttata nelle sole cellule tumorali HER2-positive (Modi et al., 2020; EMA, 2023).

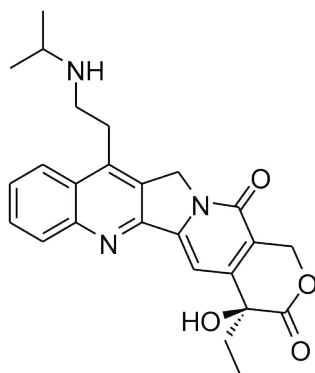


Fig. 8: Struttura chimica di Belotecan

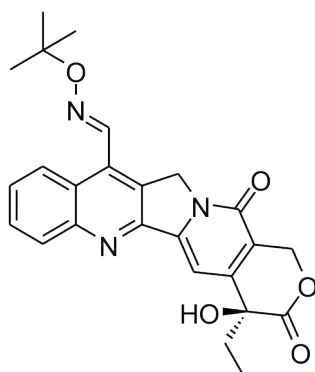


Fig. 9: Struttura chimica di Gimatecan

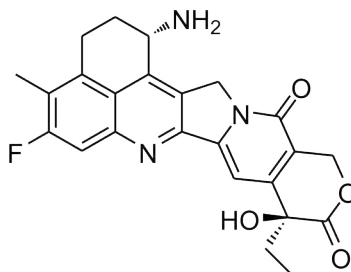


Fig. 10: Struttura chimica di Exatecan

### 5.5 Liposomi come sistemi avanzati di drug delivery per irinotecano e topotecano

I liposomi sono sistemi di drug delivery costituiti da vescicole sferiche formate da uno o più doppi strati fosfolipidici, capaci di incapsulare molecole idrofile e lipofile. È proprio grazie alla loro biocompatibilità e alla somiglianza strutturale con le membrane cellulari che trovano ampio impiego in ambito oncologico, dove vengono utilizzati per migliorare la distribuzione tissutale dei farmaci e ottimizzarne il profilo farmacocinetico (Hanna et al., 2022).

In questo contesto, la formulazione liposomiale di inibitori della topoisomerasi I, quali irinotecan e topotecan, rappresenta una strategia sviluppata per superare i noti limiti farmacocinetici e di tollerabilità dei composti convenzionali; l'incapsulamento del farmaco all'interno di liposomi fosfolipidici consente infatti di proteggere il principio attivo nel circolo sistemico, determinando un prolungamento dell'emivita plasmatica e una riduzione dei picchi di concentrazione libera (Drummond et al., 2017; Wang et al., 2017).

Tale comportamento favorisce l'accumulo preferenziale del farmaco nel tessuto tumorale attraverso il cosiddetto effetto di enhanced permeability and retention (EPR), tipico dei tumori solidi caratterizzati da vascolarizzazione disorganizzata e drenaggio linfatico inefficiente. La persistente neoangiogenesi presente in questi tessuti, unita alla scarsa efficienza del drenaggio linfatico, ostacola la rimozione delle macromolecole,

consentendo così un'azione prolungata dei sistemi liposomiali nel microambiente tumorale e garantendo una maggiore efficacia del trattamento (Maeda et al., 2013).

Ciò è stato confermato anche da studi preclinici, i quali hanno dimostrato che le formulazioni liposomiali di irinotecan e topotecan garantiscono un'esposizione tumorale più prolungata e una più sostenuta inibizione della topoisomerasi I rispetto ai farmaci non incapsulati, traducendosi in una maggiore attività antitumorale (Drummond et al., 2017; Burke et al., 1996; Springer et al., 2023; Cancers et al., 2020).

La sintesi di questi sistemi si basa sulla capacità dei fosfolipidi anfipatici di assemblarsi spontaneamente in ambiente acquoso formando strutture a doppio strato. In condizioni appropriate, l'interazione tra le teste polari idrofile e l'acqua, insieme all'associazione delle catene idrofobiche, porta alla formazione di vescicole chiuse che racchiudono al loro interno un compartimento acquoso (Lasic et al., 1993).

I metodi di preparazione più utilizzati prevedono inizialmente la solubilizzazione dei lipidi in un solvente organico, la rimozione di quest'ultimo e la successiva idratazione del film lipidico, processo che induce la formazione delle vescicole. Parametri quali composizione lipidica, temperatura, condizioni di idratazione e fasi di omogeneizzazione influenzano in modo significativo dimensione, lamellarità e stabilità dei liposomi, consentendo l'ottimizzazione del sistema in funzione dell'applicazione terapeutica (Lasic et al., 1993).

È tuttavia importante ricordare che, sebbene i trattamenti liposomiali di irinotecan e topotecan mostrino generalmente una maggiore efficacia rispetto alle formulazioni convenzionali, gli effetti di questo approccio possono risultare variabili in funzione dell'eterogeneità del microambiente tumorale e del suo grado di vascolarizzazione, fattori che possono limitare l'accumulo e la ritenzione dei liposomi nel tessuto neoplastico (Hanna et al., 2022; Wang et al., 2017).

## **5.6 Dalla pianta al mercato globale: l'impatto economico delle camptotecine**

Il mercato globale delle camptotecine rappresenta un settore di rilevante importanza economica e strategica nell'ambito della terapia oncologica. Questi farmaci, tutti derivati dalla *Camptotheca acuminata* e successivamente sviluppati come analoghi più solubili e clinicamente utilizzabili, sono fondamentali nel trattamento di tumori solidi, tra cui il carcinoma del colon-retto e i tumori polmonari e ginecologici, costituendo un pilastro dello sviluppo di nuove formulazioni con profili farmacocinetici e di tollerabilità migliorati.

Il mercato delle camptotecine si attesta intorno a 1,2 miliardi di dollari nel 2023, con proiezioni di crescita fino a 2,8 miliardi di dollari entro il 2032, spinte dall'aumento della domanda di terapie anticancro più efficaci, dall'introduzione di tecnologie di drug delivery come formulazioni liposomiali e nanoparticellari e dall'espansione dei mercati emergenti (DataIntel, 2023).

Le vendite combinate di farmaci come irinotecano (commercializzato tradizionalmente sotto il marchio Camptosar di Pfizer) e topotecano (Hycamtin di GlaxoSmithKline) superano infatti il miliardo di dollari, riflettendo l'importanza economica di questi composti. Tali prodotti sono realizzati e distribuiti da aziende farmaceutiche globali con solide infrastrutture commerciali e reti di vendita internazionali. Grandi gruppi come Novartis, Pfizer, Roche, AstraZeneca, Merck & Co. e Bristol-Myers Squibb competono inoltre in un mercato oncologico più ampio, influenzando indirettamente la domanda e la valorizzazione economica delle terapie camptoteciniche.

Il segmento più esteso degli inibitori della topoisomerasi I, che comprende le camptotecine e i loro analoghi, registra un valore di mercato di circa 5,18 miliardi di dollari nel 2024, con una crescita prevista fino a quasi 6,9 miliardi di dollari entro il 2029 (The Business Research Company, 2025) (Fig 11). Ciò evidenzia come questi composti rappresentino non solo una componente chiave della farmacoterapia oncologica, ma anche un asset economico strategico per l'industria farmaceutica globale. Tra i principali fattori trainanti figurano la crescente incidenza dei tumori solidi, l'integrazione di trattamenti combinati con terapie mirate e immunoterapiche, l'adozione di farmaci generici

e biosimilari nei mercati emergenti e la maggiore disponibilità di prodotti nei sistemi sanitari con copertura universale.

Oltre all'importanza economica diretta, le camptotecine stimolano un significativo investimento in ricerca e sviluppo, contribuendo all'espansione dei portafogli aziendali e alla competitività delle case farmaceutiche nel settore oncologico. Le innovazioni tecnologiche, come i sistemi di somministrazione nanomedicinali (inclusi i liposomi) e i coniugati anticorpo-farmaco, aumentano i costi di sviluppo ma ampliano al contempo le opportunità di ingresso in segmenti di mercato ad alto valore, estendendo la durata della protezione brevettuale e consentendo prezzi più elevati per indicazioni specialistiche. In questo scenario, il valore economico delle camptotecine si colloca non solo nelle vendite dirette dei farmaci, ma anche nel loro ruolo di motori di innovazione tecnologica e di sviluppo di nuove piattaforme terapeutiche, sottolineando la loro rilevanza strategica nel panorama farmaceutico moderno.

## Topoisomerase I Inhibitors Global Market Report 2025

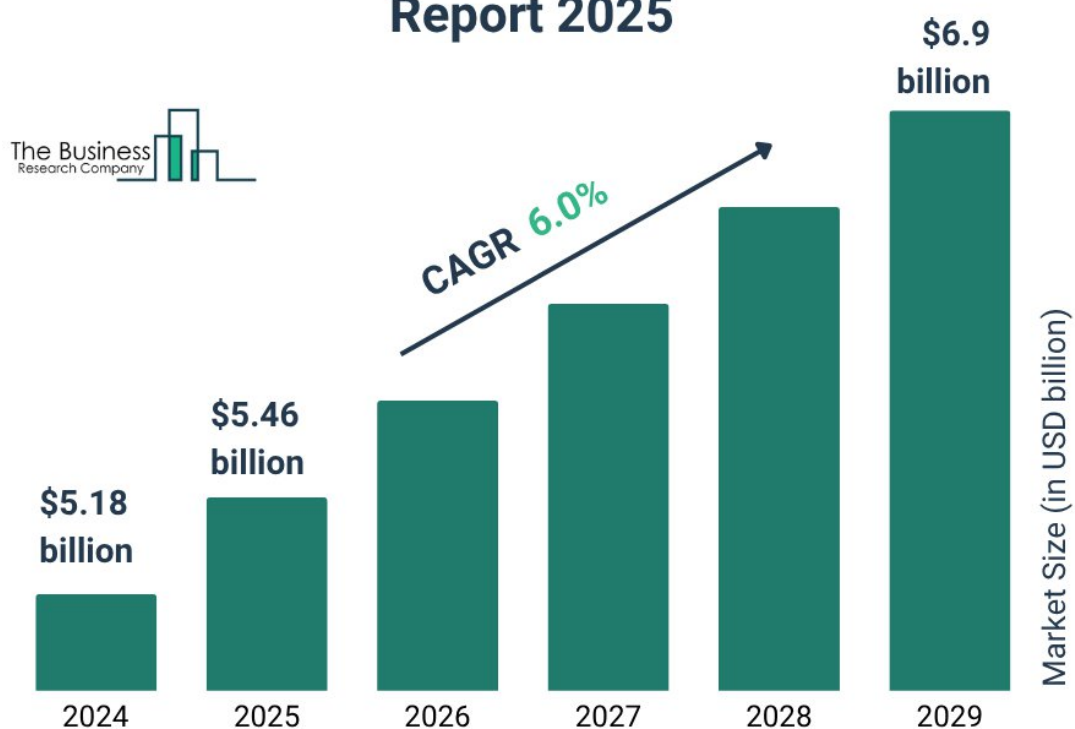


Fig. 11: Crescita prevista del mercato globale degli inibitori della topoisomerasi I dal 2024 al 2029. Il grafico riporta anche il CAGR (Compound Annual Growth Rate), indicatore che esprime la crescita media del mercato nel tempo.

## 6. Conclusione

In questo lavoro di tesi è stata ricostruita l'evoluzione della camptotecina, dall'isolamento originario a partire dalla *Camptotheca acuminata* fino al suo ruolo nella moderna farmacologia oncologica. La storia di questa molecola, scoperta oltre mezzo secolo fa, rappresenta un esempio emblematico di come un metabolita naturale possa trasformarsi in un pilastro della ricerca antitumorale; la camptotecina, inizialmente identificata come semplice alcaloide vegetale dotato di attività citotossica, si è infatti rivelata nel tempo un composto di straordinaria rilevanza biologica grazie alla sua capacità di inibire selettivamente la DNA topoisomerasi I, enzima cruciale nei processi di replicazione e trascrizione del DNA. Questa scoperta ha aperto la strada allo sviluppo di una nuova classe di farmaci mirati, contribuendo in modo significativo all'avanzamento della chemioterapia moderna.

Nonostante il suo potenziale terapeutico, la camptotecina presenta ancora oggi numerose criticità che ne limitano l'impiego clinico diretto. La scarsa solubilità in acqua, l'instabilità dell'anello lattonico, la ridotta biodisponibilità e le difficoltà di somministrazione rappresentano sfide tuttora aperte. Questi limiti hanno tuttavia stimolato la ricerca di derivati più stabili e idrosolubili, come topotecano e irinotecano, i quali hanno permesso di tradurre l'attività biologica della molecola in applicazioni terapeutiche concrete. Parallelamente, la crescente domanda di camptotecina ha reso necessario lo sviluppo di strategie estrattive e biotecnologiche sempre più efficienti: dalle tecniche tradizionali di macerazione alle metodiche cromatografiche, dalla manipolazione del pH fino ai sistemi in vitro basati su colture cellulari, radici avventizie, "hairy roots" e funghi endofitici capaci di biosintetizzare la molecola.

La *Camptotheca acuminata* emerge così non come una pianta relegata al passato, ma come una risorsa oncologica attuale e strategica. La sua ricchezza fitochimica, la complessità della via biosintetica della camptotecina e la possibilità di sfruttarne i meccanismi naturali attraverso l'ingegneria metabolica la rendono un modello di studio ancora oggi estremamente rilevante. La comprensione dei suoi metaboliti, dei pathway

biosintetici e delle interazioni molecolari che ne regolano la produzione offre prospettive concrete per l'ottimizzazione della resa e per la generazione di nuovi analoghi strutturali con proprietà farmacologiche migliorate.

La camptotecina, dunque, continua a rappresentare un ponte tra tradizione botanica e innovazione farmacologica. La sua storia dimostra come l'osservazione etnobotanica, la ricerca fitochimica e le moderne tecnologie biotecnologiche possano convergere nella creazione di strumenti terapeutici avanzati. In un panorama oncologico in continua evoluzione, la *Camptotheca acuminata* e i suoi metaboliti non costituiscono un capitolo chiuso, ma una fonte ancora viva di ispirazione scientifica, capace di guidare lo sviluppo di nuove strategie antitumorali e di contribuire alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della proliferazione cellulare.

## 7. Bibliografia & sitografia

- Arora, S., et al. (2008). Toxicity of anticancer drugs and its management.
- BOC Sciences. (2024). Camptothecin derivatives: structure, mechanism and pharmacological properties.
- Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids: A review.
- Burke, T. et al. (1996). Liposomal encapsulation increases the activity of the topoisomerase I inhibitor topotecan.
- Cancers, Basel. (2020). Liposomal irinotecan for treatment of colorectal cancer in a preclinical model.
- Cao, G., et al. (1986). Toxicological effects of Camptotheca alkaloids in animal models.
- Chrencik, J. E., et al. (2004). Structural mechanisms of camptothecin resistance by mutations in human topoisomerase I.
- DataIntel. (2023). Camptothecin Market Report – Global Forecast from 2025 to 2033.
- Decaisne, J. (1873). Camptotheca acuminata description. Jardin des Plantes.
- Drummond, D. et al. (2017). Extended topoisomerase I inhibition through liposomal irinotecan results in improved efficacy over topotecan and irinotecan in models of small-cell lung cancer.
- EMA (2023). Enhertu – Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto.
- Feng, L., et al. (2020). Predicting suitable habitats of Camptotheca acuminata considering both climatic and soil variables. Ecological Indicators.
- FPRC. (2024). La sinergia vincente: Trastuzumab e Deruxtecan.

- Garcia-Carbonero, R., & Supko, J. G. (2002). Clinical experience and development of camptothecins.
- Gong, J., et al. (2025). Camptothecin-based anticancer therapies and strategies to improve their therapeutic index.
- Grimshaw, J., & Bayton, R. (2009). New Trees: Recent Introductions to Cultivation. International Dendrology Society.
- Hanna, N. et al. (2022). Liposomal irinotecan (Onivyde): Exemplifying the benefits of nanotherapeutic drugs.
- Hsu, E., & Harris, M. (2010). Plants, Health and Healing: On the Interface of Ethnobotany and Medical Anthropology.
- Iyer, L., & Ratain, M. J. (1998). Clinical pharmacology of camptothecins.
- Jadhav, R. R., et al. (2025). Enhancing camptothecin yields: Innovative approaches for sustainable anticancer drug production.
- Jang, J. Y., et al. (2025). Antibody–Drug Conjugates powered by Deruxtecan. International Journal of Molecular Sciences.
- Kai, G., et al. (2015). Biosynthesis and biotechnological production of anti-cancer drug camptothecin.
- Kim, S., et al. (2004). Preclinical pharmacology of CKD-602 (belotecan). Cancer Chemotherapy and Pharmacology.
- Kumar, A., et al. (2024). Biotechnological approaches for the production of camptothecin.
- Kweekel, D. (2008). Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity.
- Lasic, D. et al. (1993). Liposomes: from physics to applications.

- Lee, D. H., et al. (2008). Belotecan in small-cell lung cancer: Early phase II study. *Annals of Oncology*.
- Li, S. (2014). *Phytochemistry of Camptotheca Decaisne*.
- Li, S., & Zhang, W. (2014). *Ethnobotany of Camptotheca Decaisne: New discoveries of old medicinal uses*. Stephen F. Austin State University.
- Lu, Y., et al. (2009). Molecular regulation of camptothecin biosynthesis in *Camptotheca acuminata*.
- Maeda, H. et al. (2013). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor targeting: history and future perspectives.
- Mahendran, G. et al. (2020). Biosynthesis and natural occurrence of camptothecin and its hydroxylated analogues.
- Modi, S., et al. (2020). Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*.
- Nguyen, T. et al. (2021). Advances in the semi-synthetic development of camptothecin derivatives.
- Oberlies, N. H., & Kroll, D. J. (2004). Camptothecin and Taxol: Historic achievements in natural products research. *Journal of Natural Products*.
- Oberlies, N. H., et al. (2004). Camptothecin and analogues: Extraction, biosynthesis and prospects.
- Oginuma, K., et al. (2021). Karyomorphology and chromosome evolution in Nyssaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond.
- Pommier, Y., et al. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs.

- Rowinsky, E. K. (2003). Preclinical and clinical development of exatecan (DX-8951f). In *Camptothecins in Cancer Therapy*. Humana Press.
- Royce, M. E., et al. (2000). Phase I and pharmacokinetic study of exatecan mesylate (DX-8951f).
- Rutella, S., et al. (2005). Gimatecan is very active in vitro in human neuroblastoma.
- Schaeppi, U., et al. (1974). Toxicity profile of camptothecin.
- Springer, F. et al. (2023). Quantification of unencapsulated drug in target tissues demonstrates pharmacological properties and therapeutic effects of liposomal topotecan (FF-10850).
- Staker, B. L., et al. (2002). The mechanism of topoisomerase I poisoning by camptothecin.
- The Business Research Company. (2025). *Topoisomerase I Inhibitors – Global Market Report 2025*.
- Thomas, C. J., et al. (2004). Camptothecin: Current perspectives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.
- Unschuld, P. (1986). *Medicine in China: A History of Pharmaceuticals*. University of California Press.
- Wall, M. E., & Wani, M. C. (1966). Camptothecin: Discovery and development of a novel anticancer agent.
- Wall, M. E., et al. (1966). Structure elucidation of camptothecin.
- Waller, D. P., & Nowacki, E. K. (1978). Natural defense mechanisms in plants.
- Wang, T., et al. (2025). Study on the influence of ecological factors on the distribution models of *Camptotheca acuminata* for conservation and management. *Journal of Ethnopharmacology*.

- Wang, Y. et al. (2017). Population pharmacokinetics of liposomal irinotecan in patients with cancer.
- Zhang, J., et al. (2017). Extraction and composition of anti-cancer alkaloids in *Camptotheca acuminata*.
- Zhu, Z.-H., et al. (2023). First record of the genus *Camptotheca* (Nyssaceae) in Vietnam and the lectotypification of *C. acuminata*. *Phytotaxa*.
- Zou, J., et al. (2018). Gimatecan exhibits superior antitumor efficacy in esophageal carcinoma models.
- Zouein, J., et al. (2024). Trastuzumab-Deruxtecan: Redefining HER2 as a tumor-agnostic biomarker. *Targeted Oncology*.

### Sitografia

- Grimshaw et al. (2009). Trees and Shrubs Online. *Camptotheca acuminata*.  
<https://treesandshrubsonline.org/articles/camptotheca/camptotheca-acuminata/>
- Taylor et al. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*.  
[https://www.researchgate.net/figure/General-mechanism-of-action-of-topoisomerase-I-a-Top-I-binds-to-the-DNA-b\\_fig1\\_344397451](https://www.researchgate.net/figure/General-mechanism-of-action-of-topoisomerase-I-a-Top-I-binds-to-the-DNA-b_fig1_344397451)
- <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/her2-positive>
- <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/topoisomerase-i-inhibitors-global-market-report>