



Università del Piemonte Orientale
Dipartimento di Scienze e Innovazione
Tecnologica (DISIT)

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE

XXVII CICLO

Tesi di dottorato

CANDIDATI PROFARMACI ANTITUMORALI
DI Pt(IV): SINTESI, ATTIVITA'
ANTIPROLIFERATIVA E QUANTITATIVE
STRUCTURE-PROPERTY RELATIONSHIPS

Relatore: Prof. Domenico OSELLA

Coordinatore: Prof. Domenico OSELLA

Candidata: Dott.ssa Sabrina BIANCO

Indice

Capitolo 1: Introduzione	4
1.1 La neoplasia	5
1.2 La terapia antitumorale	8
1.3 Farmaci antitumorali a base di Pt(II): il cisplatino	13
1.3.1 Meccanismo d'azione	16
1.3.2 Effetti collaterali	19
1.3.3 Relazione struttura/attività	20
1.3.4 Derivati del cisplatino	22
1.4 Farmaci antitumorali a base di Pt(IV)	24
1.4.1 Meccanismo d'azione	28
1.5 Obiettivo della tesi	30
Capitolo 2: Determinazione della lipofilità di complessi di Pt(IV): modelli QSRR a confronto	32
2.1 Descrizione del lavoro	33
2.2 Coefficiente di partizione $\log P_{o/w}$	33
2.3 Determinazione di $\log P_{o/w}$ mediante RP-HPLC	36
2.4 Quantitative Structure Property Relationship (QSPR)	40
2.5 Strategia di sintesi	44
2.6 Sintesi degli intermedi di reazione <i>cis</i> -[Pt(am) ₂ I ₂]	46
2.7 Sintesi dei complessi di Pt(II) con legante cloruro	46
2.8 Sintesi dei complessi di Pt(II) con legante dicarbossilato	47
2.9 Ossidazione dei complessi di Pt(II) a Pt(IV)	48
2.10 Procedure generali di caratterizzazione	49
2.11 Determinazione dei fattori di capacità $\log k'_0$	55
2.12 Modelli QSRR a confronto	58
2.13 Conclusioni	68
Capitolo 3: Sintesi di nuovi pro-farmaci antitumorali di Pt(IV)	69
3.1 Descrizione del lavoro	70
3.2 Strategia di sintesi e caratterizzazione	71
3.2.1 Sintesi dei complessi di Pt(IV) con carbossilati aromatici	71
3.2.2 Caratterizzazione di 3	73
3.2.3 Caratterizzazione di 1a	75
3.2.4 Caratterizzazione di 1b	79
3.2.5 Caratterizzazione di 1c	84
3.2.6 Caratterizzazione di 4	88
3.2.7 Caratterizzazione di 2a	90
3.2.8 Caratterizzazione di 2b	95
3.2.9 Caratterizzazione di 2c	99

Capitolo 4: Proprietà chimico-fisiche e biologiche dei complessi 1a-1c e 2a-2c	104
4.1 Descrizione del lavoro	105
4.2 Lipofilicità	105
4.3 Solubilità	108
4.4 Meccanismo d'azione intracellulare dei complessi di Pt(IV): attivazione mediante riduzione	110
4.5 Test di vitalità cellulare	115
4.5.1 Mesotelioma pleurico maligno MPM	116
4.5.2 Colture cellulari	117
4.5.3 Saggio della resazurina	118
4.5.4 Risultati	121
4.6 <i>Accumulation</i> cellulare	123
4.7 <i>Trans,cis,cis</i> -[Pt(C ₆ H ₅ CO ₂) ₂ Cl ₂ (1,2-dach)]: potenziale candidato per il trattamento del carcinoma del colon-retto	128
4.8 Conclusioni	134
Capitolo 5: Sviluppo di sistemi di inclusione per i complessi 1a-1c e 2a-2c con le ciclodestrine	135
5.1 Descrizione del lavoro	136
5.2 Ciclodestrine: sistemi <i>drug delivery</i>	136
5.3 Studi di solubilità	139
5.4 Formulazione del complesso di inclusione e sua caratterizzazione	146
5.5 <i>Molecular modelling</i>	153
5.6 Studi biologici in vitro	156
5.7 <i>Dynamic Light Scattering</i>	158
5.8 Conclusioni	159

Capitolo 1
Introduzione

1.1 La neoplasia

Il tumore, detto anche neoplasia o cancro, è una malattia caratterizzata da un'incontrollata riproduzione di alcune cellule dell'organismo, che smettono di rispondere ai meccanismi fisiologici di controllo cellulare a seguito di danni al loro patrimonio genetico.

Si ritiene che la trasformazione da cellula normale a neoplastica avvenga per stadi, secondo un processo chiamato evoluzione clonale. In primo luogo, una cellula figlia subisce una mutazione irreversibile del proprio DNA (una modificazione stabile nella sequenza nucleotidica del genoma) che viene trasmessa alla sua progenie; un membro di quest'ultima a sua volta ne svilupperà una seconda che si tramanderà alle discendenti e così via.

Le cellule neoplastiche presentano alcune caratteristiche peculiari:

- anaplasia: la normale differenziazione cellulare risulta assente;
- autonomia: la crescita delle cellule tumorali è completamente svincolata dai meccanismi di regolazione;
- assenza di inibizione della crescita da elevata densità cellulare: le cellule normali

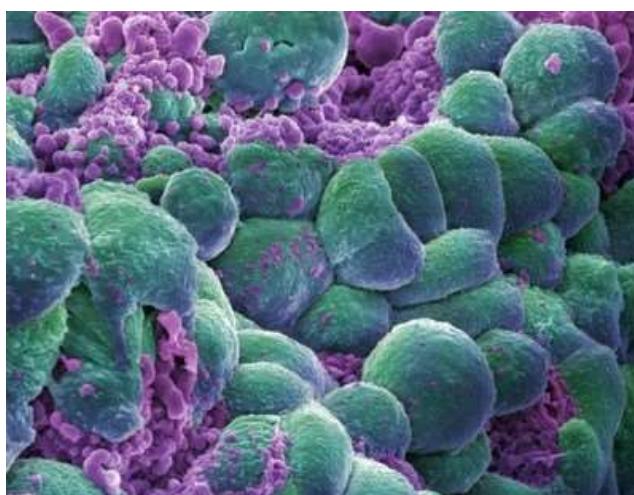


Figura 1.1 Carcinoma prostatico metastatico

- diventano quiescenti nel momento in cui rilevano nei loro dintorni un'elevata presenza di cellule, mentre il clone tumorale continua a replicarsi in modo incontrollato;
- riduzione o perdita di controllo apoptotico: i cloni tumorali innescano con difficoltà oppure perdono la possibilità di andare incontro ad apoptosi;
- angiogenesi: all'interno della massa tumorale si possono formare nuovi vasi sanguigni per il recupero e la distribuzione di sostanze nutrienti;
- invasività e capacità a metastatizzare: le cellule tumorali sono in grado di staccarsi dal tessuto, di spostarsi all'interno del corpo passando attraverso la

matrice extracellulare, e di colonizzare nuove aree, dando origine a tumori secondari (metastasi).

Le mutazioni coinvolte nella formazione di una cellula neoplastica vanno a colpire specifici geni deputati al controllo di alcune funzioni fondamentali: i geni protooncogeni, che promuovono la crescita cellulare, i geni oncosoppressori, che codificano i messaggeri chimici atti all'inibizione della mitosi, i geni DNA-*repair*, che riparano i danni al doppio filamento, e i geni che regolano l'apoptosi.

Finché le cellule neoplastiche restano raggruppate insieme in un'unica massa ben delimitata e circondata da una capsula di tessuto connettivo, il tumore viene detto benigno. Quando invece tali cellule acquistano la capacità di infiltrare gli altri tessuti e di formare metastasi, ovvero lasciare il sito di origine (attraverso i vasi sanguigni, il sistema linfatico o per semplice diffusione attraverso le cavità corporee) per sviluppare tumori secondari, allora si parla di tumore maligno. La maggior parte dei tumori maligni originano dall'evoluzione di tumori benigni¹.

In genere, la classificazione dei tumori viene effettuata valutando i parametri di gradazione e stadiazione. La gradazione misura l'attività proliferativa delle cellule e viene indicata attribuendo un valore da 1 a 3 alla neoplasia. I tumori ben differenziati (di I grado) sono quei tumori nei quali viene mantenuta un'architettura cellulare fisiologica e le cellule hanno una bassa velocità di duplicazione. Al contrario, i tumori indifferenziati (di III grado) sono costituiti da cellule che si sono modificate così tanto rispetto a quelle normali da aver perso completamente le loro funzioni specifiche; essi tendono a crescere più rapidamente e ad essere più aggressivi rispetto alle neoplasie di grado inferiore.

La stadiazione rappresenta invece un indice di invasività: viene valutata la grandezza del tumore a partire dalla dimensione minima rilevabile (parametro T, da 1 a 4), l'invasione dei linfonodi (N, da 0 a 2) e la presenza o meno di metastasi (M, da 0 a 2).

I tumori presentano una vasta gamma di evoluzioni e sintomatologie, ma in tutti resta comunque costante la parziale e lenta crescita delle cellule cancerose all'inizio, che accelera all'aumentare della loro massa.

Si possono distinguere otto principali categorie di tumori maligni:

- i carcinomi, che si originano dalle cellule costituenti gli epitelii, ossia i rivestimenti delle superfici corporee e dei vari organi interni, e che a seconda

¹ Lambertini, Capire il cancro, 1° ed. Milano, Alpha Test s.r.l. (2004)

della loro natura prendono il nome di carcinoma squamoso, a cellule di transizione, a piccole cellule e adenocarcinoma;

- i sarcomi, che interessano i tessuti di sostegno, piuttosto che quelli di rivestimento, come il tessuto osseo, adiposo e muscolare;
- i linfomi, che si originano dai linfociti diffusi a livello dei linfonodi e del torrente circolatorio e si dividono in “*Hodgkin*” e “*non-Hodgkin*”, a seconda del tipo di cellule che li costituiscono;
- le leucemie, che derivano da cellule del midollo osseo che danno origine ad una produzione incontrollata di globuli bianchi anomali;
- i mielomi, che derivano da particolari cellule prodotte nel midollo osseo, le plasmacellule, che producono gli anticorpi, ossia le proteine che aiutano a combattere le infezioni;
- i tumori delle cellule germinali, che si sviluppano a partire dalle cellule presenti nei testicoli e nelle ovaie, responsabili della produzione di spermatozoi e ovociti;
- i melanomi, che derivano dai melanociti, le cellule che producono il pigmento cutaneo;
- i gliomi, che si sviluppano a partire dal tessuto di sostegno del cervello e del midollo spinale².

² R.B.J. King, *Cancer biology*, Pearson Education, Harlow UK (2000).

1.2 La terapia antitumorale

Nel corso degli anni sono state sviluppate alcune tecniche terapeutiche atte ad eliminare o bloccare la crescita delle cellule tumorali. La terapia antitumorale prevede diversi tipi di interventi: il trattamento chirurgico, l'immunoterapia, l'ormonoterapia, la terapia radiante, la terapia fotoradiattiva ed infine la chemioterapia.

Il termine chemioterapia è stato coniato da Herlich all'inizio del 1900 per indicare la terapia medica che utilizza composti chimici di sintesi a scopo antimicrobico. Nel corso degli anni il suo significato è stato esteso anche all'uso di antibiotici e di tutti i composti antiproliferativi o citotossici.

Gli agenti citotossici sono quei farmaci la cui attività consiste nella distruzione di cellule o nell'inibizione della replicazione cellulare. Pertanto essi interagiscono con il ciclo cellulare, cioè quella serie di eventi che si verificano in successione in tutte le cellule in proliferazione.

Il ciclo cellulare di una tipica cellula eucariotica in coltura ha una durata di circa 24 ore e si articola in quattro fasi: mitosi (M), *gap* 1 (G1), sintesi (S) e *gap* 2 (G2). Inoltre, le cellule vitali e metabolicamente attive che si trovano in una condizione quiescente per quanto riguarda la divisione mitotica (non proliferativa), e quindi al di fuori del ciclo cellulare, sono dette in fase G0 (Figura 1.2).

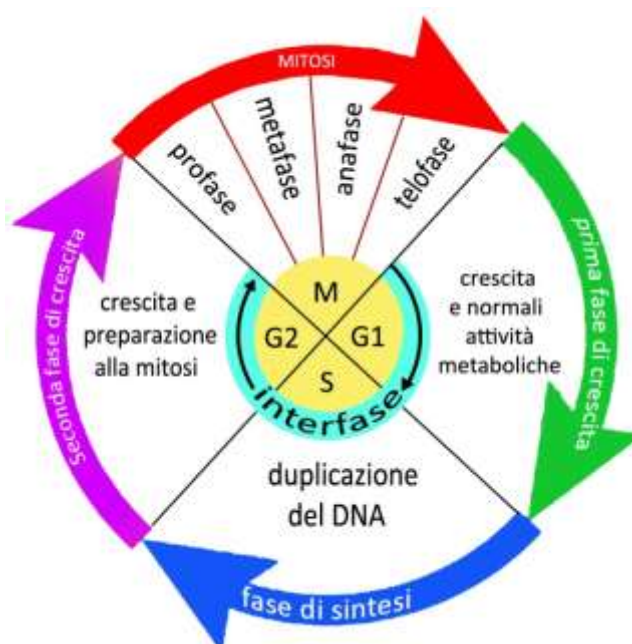


Figura 1.2 Le fasi del ciclo cellulare con le sue principali caratteristiche peculiari.

Subito dopo essere stata prodotta per mitosi la cellula va incontro ad una fase G1, durante la quale avviene la sintesi del corredo enzimatico necessario alla duplicazione del DNA, che si svolge in fase S. Quest'ultima è seguita dalla fase G2, altrettanto importante in quanto assicura alla cellula un considerevole aumento di volume, necessario al corretto svolgimento della mitosi. Durante la fase M si rompe l'involucro nucleare, si forma il fuso mitotico e avviene la duplicazione dei cromosomi. In seguito attorno ad ogni set di cromosomi si formerà una membrana nucleare, mentre una strozzatura sempre più profonda del citoplasma finirà per dividere la cellula nelle due cellule figlie, ognuna delle quali sarà fornita di un corredo cromosomico completo e identico a quello della cellula madre.

I tempi e la successione delle varie fasi del ciclo cellulare sono regolati da una famiglia di proteine chinasi, a loro volta regolate da segnali extracellulari che permettono alla cellula di adattare il proprio stato proliferativo alle condizioni esterne, per esempio il tessuto in cui si trova. Questi enzimi sono costituiti da una subunità regolatrice, detta ciclina, e da una subunità catalitica, che prende il nome di proteina chinasi ciclina-dipendente (CDK). Le CDK sono inattive in assenza della subunità ciclina e diventano attive solo nelle condizioni in cui questa si lega alla subunità catalitica³.

Occorre tenere presente che molte altre attività devono indurre la cellula a dividersi, a seconda del momento funzionale e/o del livello di differenziamento raggiunto. Ad esempio, le cellule che hanno raggiunto uno stato differenziato terminale (cellule nervose o muscolari) cessano di replicarsi ed entrano in fase G0 rispondendo a specifici stimoli. Tuttavia anche le cellule differenziate, una volta sottoposte a stimoli diversi, possono perdere in parte il loro stato differenziato ed entrare nuovamente nel ciclo replicativo, passando dalla fase G0 alla fase G1.

La crescita di un tumore è ben espressa graficamente dalla curva di Gompertz, dove vengono individuate due fasi principali: una prima fase logaritmica dove le cellule crescono in modo esponenziale e una di rallentamento tendente ad un plateau. In ogni popolazione cellulare neoplastica riconosciamo tre compartimenti cellulari distinti in base alla capacità proliferativa: il compartimento A è costituito da cellule proliferanti in fase G1, il compartimento B è costituito da cellule quiescenti in fase G0 e infine il compartimento C contiene cellule in necrosi o differenziate. Di questi tre gruppi di cellule il più suscettibile ai farmaci citotossici è il compartimento A, mentre il

³ Stefano-Taddei, *Percorsi di biochimica*, Zanichelli.

compartimento B è un ostacolo alla completa distruzione del tumore perché resiste di più alla chemioterapia e può rientrare in ciclo quando la massa tumorale viene ridotta, ad esempio per via chirurgica. Durante la fase di crescita logaritmica la quasi totalità delle cellule appartiene al compartimento A (la frazione di crescita è vicina al 100%) per cui in teoria sarebbe questa la fase dell'evoluzione naturale di una neoplasia più semplice da colpire in chemioterapia. Tuttavia, l'espressione clinica del tumore avviene di solito in una fase molto più avanzata, quando la massa tumorale ha notevolmente ridotto il proprio potenziale di crescita.

Queste circostanze sfavorevoli richiedono almeno all'inizio l'impiego di farmaci attivi anche su cellule in fase G0 associati a terapia chirurgica o radioterapia finalizzate a ridurre il cosiddetto "*burden tumor*" (la massa tumorale iniziale) in modo da aumentare la frazione di cellule in ciclo e potenziare l'efficacia della successiva chemioterapia.

In base al rapporto tra attività citotossica e ciclo cellulare, i farmaci antitumorali possono essere suddivisi in tre classi:

- agenti ciclo-aspecifici, tossici sia per le cellule che si dividono che per quelle quiescenti (fase G0);
- agenti ciclo-specifici e fase-aspecifici, che distruggono le cellule che si dividono, a prescindere dalla fase del ciclo cellulare (esempi: antracicline, mitoxantrone);
- agenti ciclo-specifici e fase-specifici, che distruggono le cellule che si dividono, in fasi particolari del ciclo cellulare (esempi: antimetaboliti, bleomicina).

La terapia antineoplastica è efficace quando un farmaco riduce la massa tumorale ad un livello minimo su cui il sistema immunitario è in grado di agire, eliminando le cellule rimanenti. I farmaci chemioterapici antitumorali attualmente utilizzati mancano di selettività e pertanto necessitano di alti dosaggi per esprimere la loro azione citotossica. Ciò si traduce però anche nell'insorgenza di effetti tossici indesiderati che costituiscono un aspetto importante di questo trattamento medico.

La sensibilità degli organi sani sui vari farmaci chemioterapici determina la comparsa di una moltitudine di effetti collaterali che si manifesta soprattutto a livello dei tessuti ad alto indice proliferativo: midollo osseo (leucopenia, piastrinopenia, anemia, immunosoppressione, infezioni), mucosa gastrointestinale (stomatite, enterite, diarrea), cute ed annessi cutanei (alopecia), gonadi (amenorrea).

Il fenomeno della resistenza al trattamento farmacologico è un altro fattore che può compromettere in maniera determinante la terapia antitumorale. Le cause per le quali una cellula neoplastica può risultare resistente possono essere riassunte come:

- aumento dell'inattivazione del farmaco
- riduzione della capacità di attivazione
- alterata quantità di target specifici
- riduzione dell'affinità del farmaco verso il target
- aumento del sistema di riparazione del DNA
- aumentata espressione di trasportatori.

Inoltre, la resistenza multipla è la più problematica in quanto può insorgere a piccole concentrazioni ed anche con un carico tumorale basso. Le cellule neoplastiche possono presentare infatti un'aumentata espressione di trasportatori capaci di ridurre attivamente le concentrazioni intracellulari di vari farmaci e di conferire al tumore proprietà di farmaco-resistenza multipla.

L'effetto terapeutico atteso da un farmaco antiproliferativo è la distruzione di una frazione massima di cellule tumorali con un livello di tossicità tollerabile dall'organismo. Questo obiettivo può essere raggiunto solo conoscendo la dose massima tollerabile DMT (la massima dose di farmaco che può essere somministrata senza indurre tossicità irreversibili), e la dose minima efficace DME. Questi due valori, definiscono l'indice terapeutico, ovvero il rapporto DMT/DME, importante stima approssimativa di un *range* di sicurezza entro il quale il farmaco può essere somministrato con rischi minimi.

A seconda del meccanismo d'azione utilizzato, i farmaci citotossici possono essere suddivisi in due categorie principali: gli agenti alchilanti e gli antimetaboliti.

Gli agenti alchilanti interagiscono direttamente con il DNA formando un legame covalente grazie ad una reazione di alchilazione tra la forma attivata del farmaco (specie elettrofila) e le basi azotate del DNA (strutture nucleofile).

Inoltre, gli alchilanti bifunzionali possono formare dei legami a ponte (*cross-link*) tra due filamenti di DNA o anche all'interno dello stesso, provocando la rottura completa del segmento nucleotidico oppure un blocco nella sua trascrizione e duplicazione.

Appartengono invece alla categoria degli antimetaboliti tutte quelle sostanze la cui struttura chimica è simile ad altri metaboliti normali presenti nell'organismo. Questa analogia strutturale permette l'interazione del farmaco con la via biosintetica dei

precursori del DNA e dell'RNA, comportando o il blocco di un sistema enzimatico di cui il metabolita funge da substrato o la sintesi di un prodotto inattivo o con diversa funzione.

Gli agenti alchilanti e gli antimetaboliti a seconda delle loro caratteristiche strutturali possono essere suddivisi a loro volta in otto classi (Tabella 1.1).

AGENTI ALCHILANTI	<ul style="list-style-type: none"> - Mostarde azotate - Nitrosuree - Alchilsolfonati - Aziridine - Triazeni
ANTIMETABOLITI	<ul style="list-style-type: none"> - Antagonisti dell'acido folico - Analoghi delle purine - Analoghi delle pirimidine

Tabella 1.1 Classificazione degli agenti citotossici

Un'ulteriore categoria di agenti citotossici è costituita dai composti di coordinazione del platino, il cui meccanismo d'azione, che presenta analogie con quello degli agenti alchilanti, verrà discusso nel dettaglio nei paragrafi seguenti.

1.3 Farmaci antitumorali a base di Pt(II): il cisplatino

Prima della scoperta dei composti antitumorali a base di platino da parte di Rosenberg e Van Camp⁴, l'uso di farmaci contenenti metalli era alquanto limitato, a causa della loro notevole tossicità.

Sebbene l'utilizzo di alcuni metalli di transizione (tra i quali Au(III), Pd(II), Ru(III)) come agenti citotossici fosse già stata presa in considerazione prima del 1969⁵, lo studio sistematico dell'attività biologica di questi complessi iniziò pochi anni dopo proprio grazie al successo ottenuto dai complessi di Pt(II) con leganti amminici.

Questi agenti a base di platino costituiscono oggi i farmaci maggiormente utilizzati nella lotta contro il cancro ed il cisplatino è da considerarsi il capostipite di tale categoria.

Essi fanno parte dei protocolli di trattamento in prima linea per un'ampia serie di tumori solidi umani, come i carcinomi del testicolo e dell'ovaio, della vescica, della testa e del collo, del polmone, l'osteosarcoma e i linfomi maligni.

Il cisplatino venne sintetizzato per la prima volta nel 1844 da un medico italiano, Michele Peyrone. Cinquant'anni dopo, Alfred Werner assegnò correttamente a questo composto la geometria *cis*, distinguendolo dall'isomero *trans*. La sua struttura venne tuttavia determinata tramite diffrattometria a raggi X soltanto nel 1966 (Figura 1.3).

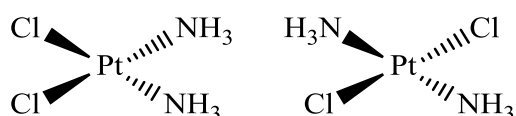


Figura 1.3 *cis*- e *trans*-platino

Il riconoscimento dell'attività antitumorale dei complessi di platino fu del tutto fortuito. Nel 1965 Barnett Rosenberg, fisico dell'Università del Michigan, nel corso di alcuni saggi *in vitro* realizzati per valutare gli effetti di un campo elettromagnetico sulla divisione cellulare, sottopose una popolazione di batteri *Escherichia Coli* al campo generato da due elettrodi di platino (materiale scelto per la sua inerzia chimica in ambiente biologico) in una soluzione contenente cloruro di ammonio come sorgente di azoto. Si notò che tali batteri sotto l'influenza della corrente subivano una crescita

⁴ B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature*, 1969, 222, 385.

⁵ M.J. Cleare, *Coord. Chem. Rev.*, 1974, 12, 349.

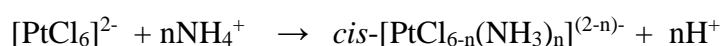
filamentosa fino a raggiungere una lunghezza circa 300 volte superiore a quella normale⁶.

Studi successivi dimostrarono che non era la corrente a causare la crescita filamentosa dei batteri, ma piccole quantità di platino (ppm) provenienti dagli elettrodi e disciolte nella soluzione. La specie formata venne identificata come $[\text{PtCl}_6]^{2-}$, presente in parte come sale d'ammonio.



Figura 1.4 *Escherichia coli* in condizioni normali, visti mediante microscopio elettronico a scansione

La concomitante presenza di ossigeno e luce nella camera elettrolitica diede luogo alla seguente reazione fotochimica⁷:



che portò alla formazione di $[\text{PtCl}_4(\text{NH}_3)_2]$, responsabile dell'allungamento dei batteri. Si scoprì inoltre che la forma *cis* era un potente inibitore della divisione cellulare, ma con deboli effetti sulla velocità di crescita dei filamenti, mentre l'omologo *trans* mostrava esito negativo dal punto di vista dell'attività biologica. Furono testate le corrispondenti specie *cis* e *trans* di Pt(II), $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, e si notò da subito che l'isomero *cis* produceva crescita filamentosa nei batteri.



Figura 1.5 *Escherichia coli* in un mezzo contenente alcuni ppm di Platino, visti mediante microscopio elettronico a scansione.

Ulteriori studi condotti su una serie di complessi di platino con diversi leganti amminici dimostrarono che solo le specie neutre con geometria *cis* tendevano ad inibire la divisione cellulare o causavano la crescita filamentosa dei batteri, mentre le specie *trans* erano biologicamente inattive.

⁶ B. Rosenberg, B. Lippert, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley-VHC, 1999, p.3.

⁷ B. Rosenberg, L. Van Camp, E.B. Grimley, A.J. Thomson, *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 1347.

La capacità di inibire la divisione cellulare, senza bloccare la crescita della cellula, suggerì che tali composti potessero avere carattere antitumorale.

Vennero così testati presso l'*U.S. National Cancer* i primi quattro composti di platino, il *cis*-[PtCl₄(NH₃)₂], il *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], il [PtCl₄(en)] e il [PtCl₂(en)] (en = etilendiammina) sul sarcoma murino 180 e sulla leucemia murina L1210. In primo luogo, si trapiantò nella zona ascellare del topo uno standard del tumore solido del sarcoma 180, lasciando crescere la massa tumorale fino a raggiungere il peso di 1 g. Successivamente, vennero iniettati i vari farmaci e il complesso *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] causò una totale regressione del tumore in 6 giorni dal momento della somministrazione. Visti questi risultati la sperimentazione si estese anche ad altri tipi di animali con esiti che portarono il farmaco ad essere considerato un effettivo agente antineoplastico per la cura dei tumori umani.

Nel 1972 il cisplatino fu introdotto nella prima fase di sperimentazione clinica e venne testato su malati terminali di cancro che non rispondevano più alle terapie correnti. I risultati furono sorprendenti: il 20% dei pazienti ebbe un miglioramento totale o parziale. Inoltre, il farmaco generò reazioni nell'80% dei pazienti con cancro ai testicoli, nel 90% dei pazienti con carcinoma ovarico, nel 40% di quelli con tumore al collo, alla testa e con linfomi, mentre non ci fu nessuna risposta per il tumore al colon.

Durante la seconda fase di sperimentazione clinica, il cisplatino venne usato in combinazione con altri farmaci già approvati come agenti chemioterapici, al fine di offrire un effetto sinergico o quanto meno additivo alla cura del tumore. I risultati furono promettenti, al punto che nel 1978 il cisplatino venne approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*) come farmaco antitumorale per la cura dei tumori alle ovaie e ai testicoli. Nel 1979 venne approvato come farmaco anche in Inghilterra e commercializzato con il nome di Neoplatino⁸. Tutt'oggi il cisplatino è uno dei farmaci più comunemente usati e di maggior successo nel trattamento di varie neoplasie⁹.

⁸ M.J. Cleare, P.C. Hydes, *Metal Ions in Biological Systems*, 1979, 11, p.1.

⁹ P. Pil, S.J. Lippard, *Encyclopedia of cancer*, Academic Press, San Diego, 1997, p.232.

1.3.1 Meccanismo d'azione

Il cisplatino svolge la sua attività citotossica formando degli addotti covalenti con il DNA e presenta un meccanismo d'azione simile a quello degli agenti alchilanti¹⁰.

La reazione del cisplatino con l'albumina del siero umano è considerata la via principale di legame del complesso metallico nel plasma sanguigno. L'albumina è una proteina monocatena di 64 kDa, che contiene vari residui Met e un residuo Cys. Apparentemente, il complesso si lega ai residui metioninici formando chelati N-S e, in misura minore, al residuo cisteinico attraverso lo zolfo. Tuttavia, prove sperimentali hanno dimostrato come il 98% del farmaco, somministrato per via endovenosa in soluzione salina, rimanga inalterato nel plasma sanguigno.

L'alta concentrazione di cloro (circa 100 mM) in questo ambiente sembra infatti prevenire la dissociazione dei leganti uscenti per effetto del solvente, limitando le reazioni con l'albumina o altri leganti plasmatici e favorendo la penetrazione intracellulare, tramite diffusione passiva, della forma neutra del composto.

Nella cellula, ad un pH di 7.4 e alla temperatura di 37°C, la bassa concentrazione di cloro (circa 4 mM) consente, al contrario, una rapida solvatazione del complesso per sostituzione consecutiva dei suoi cloruri con due molecole di H₂O.

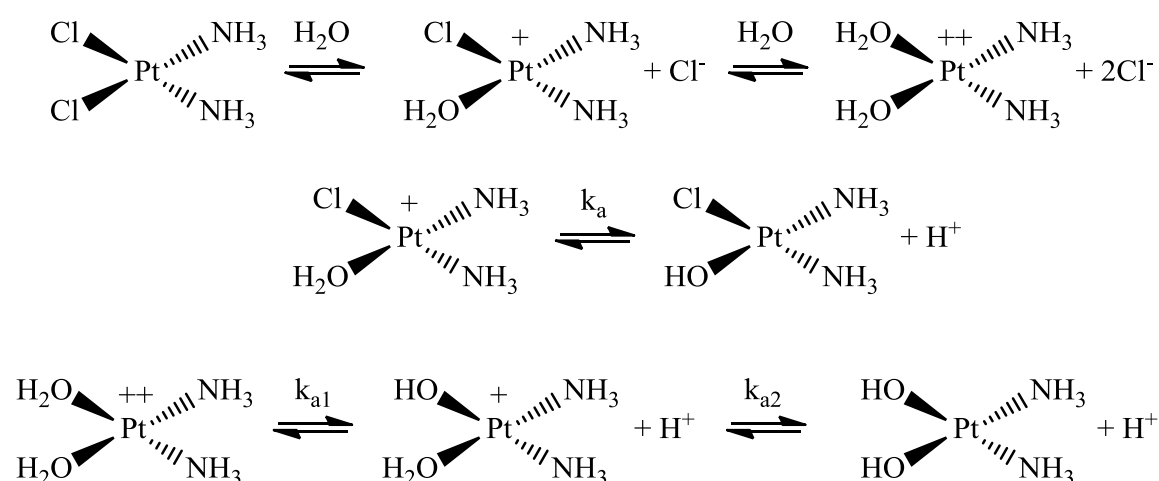


Figura 1.6 Reazioni di acquazione e reazioni acido-base del cisplatino

¹⁰ D. Lebowhl, R. Canetta, European Journal of cancer, 1998, 34, 1522.

Questa reazione di acquazione porta alla formazione delle specie monocloroidrata e diidrata. Tali forme, a pH fisiologici o superiori, subiscono un'ulteriore deprotonazione, seguita da rilascio di H^+ e formazione dei mono-idrossido e diidrossocomplessi corrispondenti (Figura 1.6).

A livello intracellulare, i due gruppi elettrofili del cisplatino attivato vanno a reagire con i gruppi nucleofili del DNA, creando dei legami molto stabili che ripiegano l'elica della molecola di acido nucleico deformandone in maniera significativa la conformazione spaziale.

La formazione di monoaddotti e diaddotti covalenti stabili porta al blocco della replicazione e trascrizione del DNA ed infine alla morte della cellula essenzialmente per via apoptotica. E' stato inoltre dimostrato che la formazione di addotti Pt(II)-DNA e la prima idrolisi del cisplatino avvengono con velocità simili, cosicché la specie prevalente nel citoplasma risulta essere $[(NH_3)_2PtCl(H_2O)]^+$.

Il fatto che il Pt(II) sia un acido *soft* suggerisce che all'interno delle eliche del DNA vengano preferiti come leganti gli atomi di azoto delle basi pirimidiniche e puriniche rispetto agli atomi di ossigeno dei gruppi fosfato; non si esclude però che questi ultimi accelerino l'attacco coordinandosi in modo transiente al metallo.

Vari studi hanno dimostrato che il cisplatino lega preferenzialmente l'azoto in posizione 7 (N7) delle basi puriniche, essendo tali gruppi esposti nel solco maggiore del DNA e quindi più accessibili ai complessi metallici.

La formazione degli addotti Pt(II)-DNA avviene mediante un processo a due fasi che inizia con l'addotto monofunzionale e prosegue con una serie di addotti bifunzionali diversi. I principali addotti formati dal cisplatino sono i seguenti: addotti bifunzionali interfilamento fra purine adiacenti (60% d(GpG)Pt e 15% d(ApG)Pt), addotti interfilamento fra guanine non adiacenti (20% d((GpXpG)Pt)) e addotti intracatena fra residui purinici su filamenti complementari.

Il modo di gran lunga più probabile mediante il quale l'isomero *cis* si lega al DNA è un *cross-link intrastrand* (stesso filamento) con due guanine adiacenti, mentre gli addotti intercatena sono più frequenti nel caso dell'isomero *trans*. Inoltre, legami monofunzionali o addotti con proteine differenti non risultano efficaci.

L'effetto degli addotti bifunzionali del cisplatino sulla struttura della doppia elica può essere misurato in termini di piegamento del suo asse e svolgimento della stessa.

Per gli addotti intercatena di tipo GG il piegamento è di circa 20-40° nella direzione del solco minore e lo svolgimento di circa 76-80°.

Per l'addotto intracatena di tipo GG si ha un ripiegamento di 35-50° nella direzione del solco maggiore ed uno svolgimento di circa 13°.

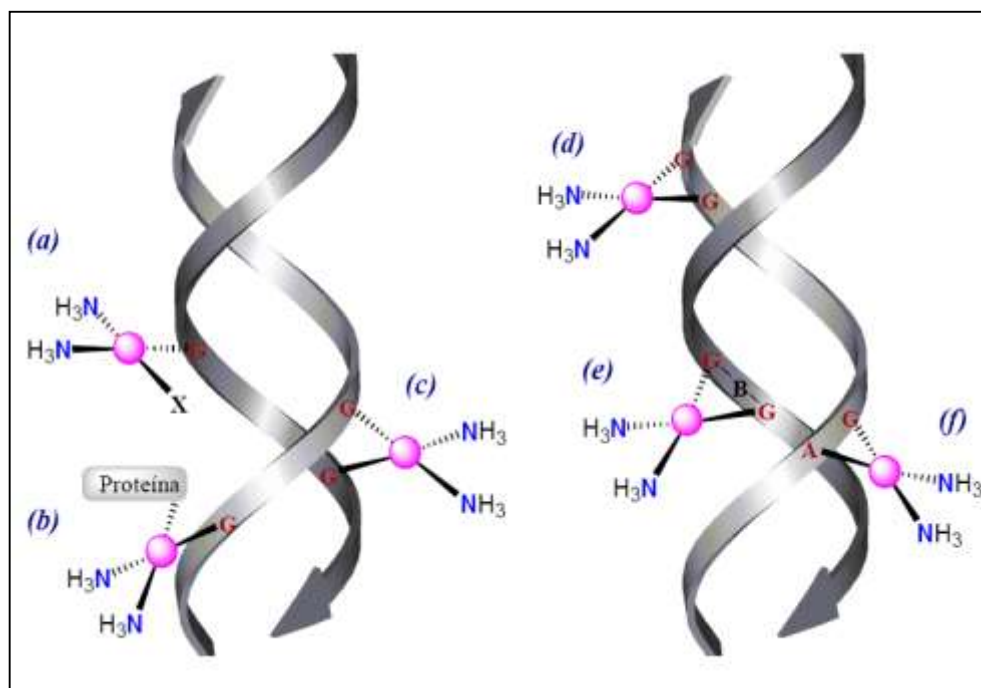


Figura 1.7 Rappresentazione schematica dei centri di platinazione del DNA

L'effetto citotossico del cisplatino è strettamente correlato alla quantità totale di platino legato al DNA e, in particolar modo, alla quantità di diaddotti formati, soprattutto di tipo intrafilamento fra residui adiacenti di guanina.

Di fatto, gli effetti biologici del cisplatino sono dovuti non soltanto al suo legame con il DNA ma anche alla sua interazione con altri gruppi nucleofili presenti nel RNA, nei gruppi sulfidrilici e amminici delle proteine o in altre macromolecole di importanza biologica cruciale; ad esempio, il legame del cisplatino con gli atomi di zolfo o di azoto delle proteine può portare all'alterazione degli enzimi mitocondriali, dei sistemi di trasporto transmembrana o dell'assemblaggio del citoscheletro.

L'inattivazione del cisplatino, un aspetto fondamentale del suo metabolismo, avviene essenzialmente tramite la coniugazione del farmaco con nucleofili forti quali il glutathione ridotto (GSH); tale reazione di coniugazione viene catalizzata dall'enzima glutathione-S-transferasi (GST) e porta alla formazione del complesso inattivo che viene infine eliminato dalla cellula.

L'escrezione del cisplatino è per più del 90% renale e solo una minima quantità del farmaco viene eliminata per via biliare.

1.3.2 Effetti collaterali

Il cisplatino è un farmaco che presenta una tossicità particolarmente significativa e questo rappresenta uno dei maggiori ostacoli al suo impiego nella pratica clinica.

Uno degli effetti collaterali più importanti è la nefrotossicità, che comporta danni renali che vanno dalla semplice lesione tubulare alla necrosi del tessuto. La nefrotossicità ha un carattere progressivo dopo più dosi ed è solo parzialmente reversibile. Il danno tubulare si accompagna inoltre a perdita urinaria di magnesio con conseguente grave ipomagnesiemia.

L'ototossicità è un altro frequente effetto tossico di questo farmaco, che si manifesta tramite tintinnio e ridotta acuità di percezione alle alte frequenze, interessa soprattutto i bambini e la sua incidenza clinica è correlata alla dose totale di farmaco somministrata.

Le altre manifestazioni tossiche sono comuni a quelle esercitate dagli altri antitumorali: vomito, nausea, diminuzione dei globuli rossi e dei globuli bianchi (mielotossicità).

Anche la neurotossicità ha assunto un'importanza clinica sempre maggiore, in quanto dose-cumulativa e può diventare limitante nella prosecuzione del trattamento. Questo disturbo consiste principalmente in una neuropatia periferica di tipo sensitivo: le manifestazioni iniziali sono caratterizzate da perdita o riduzione dei riflessi e della sensibilità tattile fine, ma possono assumere carattere di particolare gravità sino a comportare atassia e a limitare le capacità di movimento.

Sono invece meno comuni la diminuzione delle piastrine, i rigonfiamenti facciali, la dispnea, i crampi muscolari e la perdita di appetito.

Negli anni sono state sviluppate diverse metodiche e strategie per superare le manifestazioni tossiche del cisplatino e, fra queste, la più importante per permettere una notevole riduzione della nefrotossicità consiste nella reidratazione del paziente con soluzioni saline ipertoniche di NaCl.

1.3.3 Relazione struttura/attività

Il platino fa parte della III serie dei metalli di transizione, il suo numero atomico è 78 ed ha configurazione elettronica $[\text{Xe}]4f^{14}5d^96s^1$.

Questo elemento può formare composti allo stato di ossidazione 0, II, IV, V e VI, questi ultimi associati con ossigeno e fluoro derivati. Gli stati più importanti in soluzione acquosa (e quindi in ambiente biologico) sono II e IV.

Nello stato di ossidazione II forma complessi con geometria planare-quadrata (sistema d^8); essendo il Pt(II) un acido *soft*, abbondano i complessi nei quali il metallo coordina basi *soft*, con atomi donatori quali S, P, As, ecc., sebbene siano importanti i complessi con leganti N-donatori.

Si conoscono innumerevoli composti neutri a stechiometria $[\text{PtXYLL}']$ dove X e Y sono anioni (uguali o diversi) quali alogenuri, carbossilati, idruri, alchili, arili e L e L' sono leganti neutri (anch'essi uguali o diversi) quali NH_3 , ammine, eterocicli azotati o fosfine (Figura 1.8).

Grazie alla stabilità termodinamica di questi sistemi e alla loro relativa inerzia cinetica, essi ricoprono un ruolo importante nello studio dell'isomeria geometrica nei composti di coordinazione.

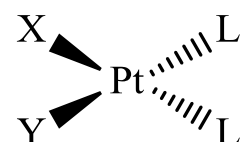


Figura 1.8 Generico complesso di Pt(II)

La molecola di cisplatino (*cis*-DDP), *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, è un complesso neutro a 16 elettroni, presenta configurazione planare quadrata, come atteso da un metallo d^8 a basso spin, con l'atomo di Pt in posizione centrale, circondato da due molecole di NH_3 e due atomi di Cl in configurazione *cis*. In ambiente acquoso si presenta moderatamente solubile.

Sia il cisplatino che il suo isomero *trans* scambiano i cloruri con alcuni gruppi nucleofili, per formare legami molto stabili.

Una prima caratteristica che lega la struttura dei complessi allo loro attività è la forza del legame Pt-X. I leganti X (anioni cloruro) denominati "uscenti", poiché si perdono prima che il complesso raggiunga il suo bersaglio biochimico, devono rimanere uniti al metallo con legami di media forza. Infatti, gli anioni molto labili (come H_2O o SO_4^{2-}) danno origine a composti molto tossici, mentre quelli che si legano fortemente (chelanti bidentati, come il bianione malonato) generano complessi più resistenti all'idrolisi e inattivi¹¹.

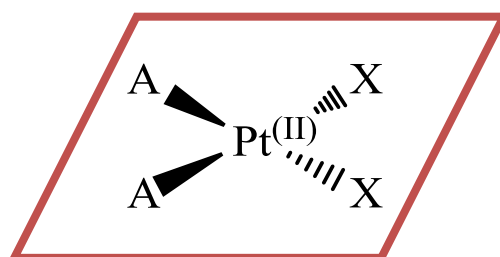
¹¹ C. Dominici, F. Petrucci, A. Alimonti, F. La Torre, A. Ciffani, S. Caroli, *Composti antitumorali a base di platino: applicazioni biomediche e aspetti terapeutici*, 1995, 289-291.

Lo stato di ossidazione del metallo è senza dubbio un altro fattore importante, sebbene la sua influenza sia tuttora in gran misura inesplorata. Di fatto, i complessi di Pt(IV) sono meno attivi di quelli di Pt(II), però sono più solubili in acqua e probabilmente agiscono come profarmaci e si attivano solo una volta che vengono ridotti a Pt(II) da qualche riducente come cisteina, glutatione o acido ascorbico.

In genere, si ritiene che affinché un complesso sia citotossico esso deve essere neutro, forse proprio in modo da attraversare la membrana cellulare con più facilità.

Tutte queste caratteristiche, insieme ad altri studi chimici basati sull'osservazione del comportamento dei ligandi anionici X nei confronti dell'idrolisi acquosa, hanno portato Cleare e Hoeschele a formulare le cosiddette regole SAR¹² (*Structure-Activity Relationship*) che permettono di stabilire una vera e propria strategia per la preparazione di complessi analoghi del cisplatino:

1. il complesso deve essere neutro;
2. il Pt deve avere stato di ossidazione +2;
3. il complesso deve avere due gruppi uscenti X ad idrolisi modulabile e due gruppi portanti A ad ingombro sterico modulabile;
4. il complesso deve avere configurazione *cis*.



¹² M.J. Cleare P.C. Hydes, *Metal Ions in Biological Systems*, Marcel Dekker (Eds.), New York, 1979,11, p. 1.

1.3.4 Derivati del cisplatino

La gravità e soprattutto l'irreversibilità degli effetti tossici limitanti la dose di cisplatino hanno incoraggiato la ricerca volta ad identificare composti simili di più elevato indice terapeutico, condizionando in modo significativo i progressi farmacologici durante gli ultimi decenni.

Tali farmaci vengono detti di "seconda generazione" e devono possedere alcune proprietà:

- migliore selettività verso le cellule tumorali;
- spettro d'azione più ampio di quello del cisplatino ed una attività particolare per le neoplasie che presentano resistenza al farmaco;
- migliore indice terapeutico: maggiore efficacia e ridotta selettività;
- modifiche delle proprietà farmacologiche come la solubilità, che potrebbe portare ad altre vie di somministrazione.

Lo sviluppo di questi analoghi del cisplatino ha rivelato caratteristiche comuni che sono necessarie per l'uso di questi anticancerogeni:

- elettoneutralità, che permetta loro di passare attraverso sostanze non polari come le membrane cellulari;
- presenza di almeno due buoni gruppi uscenti;
- presenza di almeno un legante inerte, preferenzialmente con gruppi amminici che aumenterebbero la stabilità degli addotti tramite legami ad idrogeno con le basi vicine: NH_3 , ammine primarie e secondarie.

Questi dati hanno portato ad approfondire lo studio di una serie di complessi del *cis*- $[\text{Pt}(\text{X}_2)(\text{ammina})_2]$ dove X varia da chelanti carbossilasi o decarbossilati a cloruri.

Come anticipato nel paragrafo 1.3.3, grazie a questi studi è possibile affermare che composti dove X è un gruppo chimicamente reattivo (H_2O , SO_4^{2-}) tendono ad essere più tossici, per quanto essi siano antitumorali già a basse dosi. Quando invece X_2 è un chelante bidentato i complessi risultano essere più resistenti all'idrolisi ed hanno una minore tossicità sui reni.

Variando sistematicamente in questo modo leganti *carrier* e *leaving*, sono nati farmaci come carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, lobaplatino ed eptaplatino. Tra questi composti, solo il complesso di seconda generazione carboplatino, *cis*-[diammino(1,1-ciclobutandicarbossilato)Pt(II)], ha tutt'oggi, come il cisplatino, un uso clinico generalizzato.

Questo farmaco mostra uno spettro d'azione simile al cisplatino, ma una tossicità minore, sebbene anch'esso debba essere somministrato per via endovenosa. È commercialmente disponibile con il nome di "paraplatino" ed è stato approvato dalla FDA nel 1990. Tale composto non sembra causare tossicità gastrointestinale, nefrotossicità e neurotossicità significative, mentre i fattori limitanti la dose appaiono essere la mielodepressione e la trombocitopenia.

L'oxaliplatino, *cis*-[1,2-diamminocicloesanosalatoPt(II)], è il terzo complesso di Pt(II) ad essere stato ufficialmente approvato come agente antitumorale dalla FDA, anche se il suo utilizzo è spesso limitato dalle varie neuropatie causate dalla sua somministrazione. Composti come nedaplatino, *cis*-[diamminoglicolatoPt(II)], lobaplatino, *cis*-[1,2-diamminometilciclobutanlattatoPt(II)], e eptaplatino, *cis*-[malonato(4,6-diamminometil)-2-isopropil-1,3-diossolanoPt(II)] si trovano ancora in fase di sperimentazione a causa di effetti tossici associati, come mielotossicità e trombocitopenia, e sono stati approvati come farmaci antitumorali rispettivamente solo in Giappone, Cina e Sud Corea (Figura 1.9).

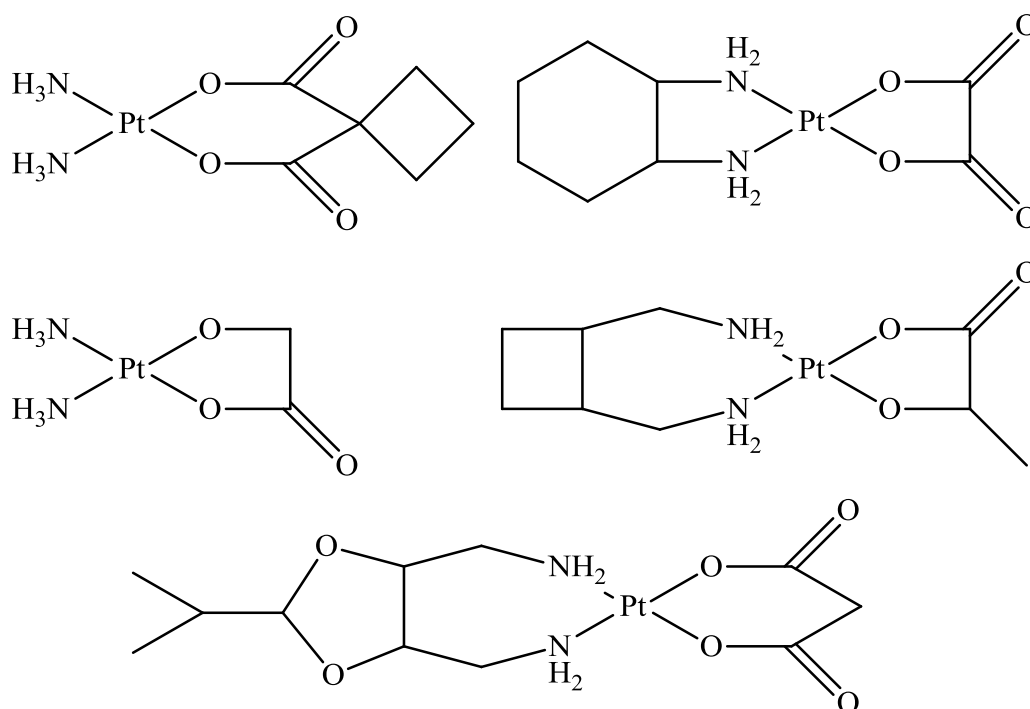


Figura 1.9 Carboplatino, Oxaliplatino, Nedaplatino, Lobaplatino ed Etoposide

1.4 Farmaci antitumorali a base di Pt(IV)

I complessi di Pt(IV) possiedono una geometria ottaedrica (sistema d^6), caratterizzata dalla presenza di due leganti aggiunti in posizione assiale rispetto al complesso planare quadrato di Pt(II). Questi due leganti possono essere scelti in maniera tale da modulare alcune caratteristiche chimico-fisiche del complesso quali lipofilia o stabilità ad agenti specifici (pH, temperatura, radiazioni). Ad esempio, modulando la lipofilia, è possibile preparare complessi in grado di attraversare più facilmente la membrana cellulare.

L'impiego di questi composti negli ultimi anni ha destato particolare interesse in quanto essi risultano essere stabili cineticamente e possiedono una minore reattività nei confronti degli agenti disattivanti sia extra- che intra-cellulari. Grazie ai complessi di Pt(IV) è possibile superare alcuni meccanismi legati alla resistenza posseduta da alcuni tumori, ridurre l'incidenza di reazioni indesiderate e l'insorgenza di effetti collaterali tossici.

I tre complessi più studiati finora sono (Figura 1.10):

1. l'ipropilplatino, *cis,trans,cis*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)₂] (dove ipa= isopropilammina), che fu selezionato tra diversi complessi sintetizzati per la sua solubilità^{13,14,15};
2. il tetraplatino, [Pt(DACH)Cl₄] (dove DACH= 1R,2R-diamminocicloesano), il cui studio venne abbandonato alla fase I di sperimentazione a causa di una severa neurotossicità indotta¹⁶;
3. il satraplatino, *cis,trans,cis*-[Pt(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)(OCOCH₃)₂Cl₂], l'unico complesso di Pt(IV) ad essere giunto in fase III di sperimentazione¹⁷.

¹³ P.D. Braddock, T.A. Connors, M. Jones, A.R. Khokhar, D.H. Melzack, M. Tobe. *Chem.Biol Interact.*, 1975, 11, 145.

¹⁴ V.H.C Bramwell, D. Crowther, S. O'Malley, R. Swindell, R. Johnson, E. Cooper, E. Thatcher. *Cancer Treat.Rep.*, 1985, 69, 409.

¹⁵ M. Gordon, S. Hollander. *J. Med.*, 1993, 24, 209.

¹⁶ M. Christian, *Abstracts, 7th International Symposium on Platinum and other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy.*, 1995, S128.

¹⁷ M.J. McKeage, J. Ward, C. Berry, D. O'Dell, L.R. Kelland, B. Murrer, P. Santabarbara, K.P. Harrap, I.R. Judson. *J.Clin.Oncol*, 1997, 15, 2691.

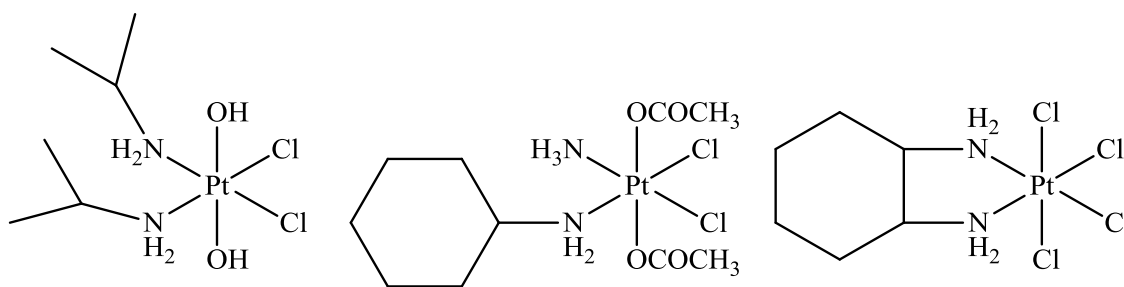


Figura 1.10 Iproplatino, Satraplatino e Tetraplatino

L' iproplatino (JM-9) è stato il primo complesso di Pt(IV) ad essere entrato nei *trials* clinici di sperimentazione all'inizio degli anni Ottanta.

Dopo essere stato a lungo testato contro il cancro ovarico assieme ad un altro farmaco, il carboplatino, venne abbandonato in fase III, a causa della minore attività e dei maggiori effetti collaterali mostrati rispetto a quest'ultimo.

Dagli anni Novanta ad oggi sono stati condotti molti studi riguardanti la sintesi e l'applicazione di complessi di Pt(IV) come farmaci adatti all'assunzione orale. Questo possibile impiego trova giustificazione nella relativa inerzia all'idrolisi e verso possibili reazioni di sostituzione dei leganti di questi complessi, che permette di abbassare la tossicità sistematica causata da reazioni secondarie indesiderate, aumentando la probabilità che il farmaco arrivi al *target* cellulare.

Un esempio è rappresentato dalla serie di complessi di etilendiammina-Pt(IV) aventi leganti carbossilato o idrossido, che vengono ridotti meno facilmente rispetto ai corrispondenti contenenti leganti cloruro. Questi complessi, data la loro maggiore tendenza a legarsi con il DNA, esercitano un forte effetto antiproliferativo *in vitro*.

Un altro importante composto testato per uso orale è il satraplatino (JM-216), scelto tra una serie di complessi di Pt(IV)-dicarbossilato per le sue proprietà chimico-fisiche favorevoli, come la buona solubilità in acqua e la relativa stabilità in soluzioni acide.

Il fatto che JM-216 mostrasse un alto assorbimento intestinale ed un indice terapeutico importante (tre volte maggiore rispetto al carboplatino) ha spinto questo farmaco verso gli studi di sperimentazione clinica. Durante la fase I il satraplatino ha mostrato alcuni effetti collaterali: tossicità gastrointestinale, neuro- e nefrotossicità. Gli studi di fase II hanno però rilevato una notevole attività del farmaco verso il cancro alla prostata e al polmone ed attualmente il JM-216 si trova in fase III di sperimentazione¹⁸

¹⁸ M.A. Jakupec; M. Galanski; B.K. Keppler, *Rev. Physiol. Pharmacol.*, 2003, 146, 1-53.

Composti	status attuale
<i>Entrati nei trial clinici nel 1970:</i>	
Cisplatino (CDDP)	Approvato in tutto il mondo per una vasta gamma di neoplasie
PAD	Abbandonato in fase II (bassa solubilità)
MBA	Abbandonato in fase I (ipersensibilità acuta)
JM-20 (SHP)	Abbandonato in fase I (gravi reazioni allergiche)
JM-74 (PHM)	Abbandonato in fase II (nefrotossicità)
Neo-SHP	Abbandonato in fase I (gravi reazioni allergiche)
Neo-PHM	Abbandonato in fase II (nefrotossicità)
BOP	Abbandonato in fase I (bassa solubilità)
<i>Entrati nei trial clinici nel 1980:</i>	
Carboplatino (CBDCA)	Approvato in tutto il mondo per una vasta gamma di neoplasie
Iproplatino (CHIP)	Abbandonato in fase III (minore attività rispetto al carboplatino)
JM-82 (DACCP)	Abbandonato in fase II (instabilità e bassa attività)
JM-11	Abbandonato dopo studi farmacocinetici
Spiroplatino (TNO-6)	Abbandonato in fase II (nefrotossicità)
PYP	Abbandonato in fase I (nefrotossicità)
JM-40	Abbandonato in fase I (nefrotossicità)
PHIC	Abbandonato in fase I (difficoltà di sintesi)
Oxaliplatino	Approvato in 60 Paesi per il carcinoma colon-rettale
Nedaplatino	Approvato in Giappone per numerose neoplasie
CI-973	Abbandonato in fase II (bassa attività)
DWA2114R (Miboplatino)	Abbandonato in fase III (minore attività rispetto al cisplatino)
Enloplatino	Abbandonato in fase II (nefrotossicità)
Zeniplatino	Abbandonato in fase II (nefrotossicità)
L-NDDP	Fase II
<i>Entrati nei trial clinici nel 1990:</i>	
Lobaplatino	Approvato in Cina
Ormaplatino	Abbandonato in fase I (nefrotossicità)
Cicloplatam	Fase II
JM-216 (Satraplatino)	Fase III
SKI 2053R	Approvato in Sud Korea per le neoplasie gastriche
ZD0473 (AMD473)	Fase III
SPI-77 (CDDP liposomiale)	Fase II
TRK-710	Fase I
BBR3464	Fase II

Tabella 1.2 Composti di platino entrati nei *trials* clinici dal 1971 ad oggi.

Composti	Leganti equatoriali		Leganti assiali
	Carrier group	Leaving group	
Cisplatino	Ammoniaca (2)	Cloruro (2)	/
SPI-77	Ammoniaca (2)	Cloruro (2)	/
Carboplatino	Ammoniaca (2)	CBDC	/
Nedaplatino	Ammoniaca (2)	Glicolato	/
AP5280	Ammoniaca (2)	Amminomalonato	/
Cicloplatam	Ammoniaca/Ciclopentilammina	Malato	/
ZD0473	Ammoniaca/2-metilpiridina	Cloruro (2)	/
PAD	Ciclopentilammina (2)	Cloruro (2)	/
JM-11	Ciclopropanammina (2)	Cloruro (2)	/
JM-40	Etilendiammina	Malonato	/
CI-973	2-Metil-1,4-butandiammina	CBDC	/
Enloplatino	Tetraidro-4H-piran-4,4-dimetilammina	CBDC	/
Zeniplatino	2,2-diamminometil-1,3-propandiolo	CBDC	/
Lobaplatino	1,2-ciclobutildimetilammina	2-idrossipropanoato	/
MBA	1,2-cicloesildiammina	Bromoacetato (2)	/
PYP	1,2-cicloesildiammina	Piruvato (2)	/
JM-82	1,2-cicloesildiammina	4-carbossifalato	/
PHIC	1,2-cicloesildiammina	Isocitrato	/
PHM	1,2-cicloesildiammina	Malonato	/
SHP	1,2-cicloesildiammina	Solfato	/
L-NDDP	<i>trans</i> -R,R-1,2-cicloesildiammina	Neodecanoato (2)	/
Neo-SHP	<i>trans</i> -R,R-1,2-cicloesildiammina	Solfato	/
TRK-710	<i>trans</i> -R,R-1,2-cicloesildiammina	3-acetil-5-metil-2,4(3H,5H)furandionato	/
Neo-PHM	<i>trans</i> -R,R-1,2-cicloesildiammina	Malonato	/
Oxaliplatino	<i>trans</i> -R,R-1,2-cicloesildiammina	Ossalato	/
Spiroplatino	1,1-cicloesildimetilammina	Solfato	/
BOP	1,2-cicloottildiammina	Bromoacetato (2)	/
Ormaplatino	<i>trans</i> -1,2-cicloesildiammina	Cloruro (2)	Cloruro (2)
JM-216	Ammoniaca/Cicloesilammina	Cloruro (2)	Acetato (2)
Iproplatino	Isopropilammina (2)	Cloruro (2)	Idrossido (2)

Tabella 1.3 Sfera di coordinazione dei complessi di platino studiati dal 1970 ad oggi.

1.4.1 Meccanismo d'azione

E' noto che i complessi di Pt(IV) agiscono come profarmaci e vengono ridotti nell'ambiente intracellulare perdendo i due leganti assiali e trasformandosi così nei rispettivi complessi di Pt(II), che sono ritenuti essere i composti attivi. Pertanto la facilità con cui tali complessi si riducono influenzerà la loro attività biologica (Figura 1.11).

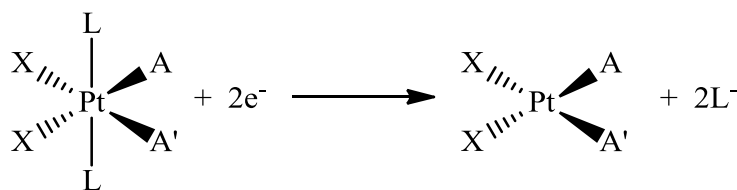


Figura 1.11 Meccanismo di riduzione di un complesso di Pt(IV)

Un parametro molto importante da considerare nella progettazione di complessi di Pt(IV) è il potenziale di riduzione, che deve essere compatibile con la “finestra redox” biologica, che è principalmente determinata da molecole come il glutatione e l'acido ascorbico. La maggior parte dell'acido ascorbico si trova nel citoplasma (≈ 1 mM) mentre è presente nel plasma sanguigno soltanto a basse concentrazioni (50-150 μM). Il glutatione, invece, si trova in quantità modeste sia nel sangue (≈ 900 μM) sia all'interno delle cellule (≈ 2 mM).

E' stato tuttavia dimostrato che i principali riducenti dei complessi di Pt(IV) sono molecole ad alto PM (ad esempio il citocromo c)¹⁹.

Alcuni complessi di Pt(IV) hanno mostrato dei potenziali di riduzione che ne ostacolano l'utilizzo farmacologico. Ad esempio, il tetraplatino possiede un potenziale di riduzione di -90 mV, pertanto viene ridotto già a livello ematico provocando citotossicità; l'ipropatino, invece, presenta un potenziale di riduzione di -730 mV e risulta meno attivo poiché non viene ridotto velocemente a Pt(II) una volta entrato nella cellula. Una via di mezzo è costituita da complessi quali il satraplatino (attualmente in fase III di sperimentazione clinica), che ha un potenziale di riduzione di -250 mV ed è inoltre dotato di un buon rapporto lipo/idrofilicità.

¹⁹ E. Wexselblatt, D. Gibson, *What do you know about the reduction of Pt(IV) pro-drugs*, Journal of Inorganic Biochemistry, 117, 2012, 220-229.

Il legame diretto dei complessi di Pt(IV) al DNA è stato osservato *in vitro* in ambiente privo di sostanze riducenti, ma meccanicisticamente queste reazioni sono trascurabili, in quanto i tempi di semivita sono di gran lunga superiori a quelli di riduzione; è infatti improbabile che il Pt(IV) possa resistere al *pool* di sostanze riducenti presenti *in vivo* ed arrivare intatto al nucleo.

Un complesso di Pt(IV) può essere ridotto nell'ambiente extracellulare ed entrare nella cellula come Pt(II) oppure essere ridotto nell'ambiente intracellulare dopo essere entrato come Pt(IV). Studi *in vitro* hanno dimostrato con tecnica XANES²⁰ che la riduzione avviene all'interno della cellula.

A causa della certamente diversa distribuzione (diversa lipofilicità) dei complessi di Pt(IV) rispetto a quelli di Pt(II), il tipo di riduzione a cui il complesso andrà incontro sarà un parametro importante per determinarne l'efficacia.

Occorre tuttavia ricordare che i dati *in vitro* non sempre rispecchiano il comportamento dei complessi di platino *in vivo*.

²⁰ T.W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.*, 166, 1997, 181-223.

1.5 Obiettivo della tesi

La lipofilità di una molecola viene abitualmente espressa in termini di coefficiente di partizione $\log P_{o/w}$. Questo parametro di idrofobicità è utile per misurare la capacità di un farmaco di attraversare la membrana cellulare mediante diffusione passiva, determinando il livello di assorbimento del composto all'interno della cellula.

Di fatto, esiste quindi una correlazione specifica tra il coefficiente di partizione e l'*uptake* cellulare. I complessi di Pt(IV), da questo punto di vista, risultano molto interessanti in quanto presentano leganti assiali che possono essere opportunamente variati in modo da modulare la lipofilità del composto e il suo conseguente ingresso nella cellula, primo passo verso l'azione di un farmaco antitumorale.

In letteratura esistono pochi studi relativi alla determinazione del $\log P_{o/w}$, ma i due metodi più utilizzati sono la tecnica RP-HPLC e lo *shake flask*.

Il metodo dello *flask shaking* prevede l'aggiunta della molecola da testare ad una miscela di acqua e n-ottanolo ed una successiva estrazione mediante imbuto separatore. Dato che questo metodo è molto laborioso e poco riproducibile, si preferisce utilizzare un sistema di ripartizione cromatografica RP-HPLC. In questa tecnica il processo di ripartizione avviene all'interno della colonna cromatografica tra la fase stazionaria e la fase mobile acquosa ed è molto simile a quello che avviene nell'imbuto separatore tra acqua e n-ottanolo.

Gli studi QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) e QSPR (*Quantitative Structure Property Relationship*) permettono invece lo sviluppo di modelli utili nel calcolo di proprietà molecolari fondamentali (come appunto il $\log P_{o/w}$), favorendo una riduzione significativa del lavoro sperimentale e dei costi necessari per la sintesi ed il *design* di nuove molecole.

La prima parte di questo lavoro di tesi si è quindi incentrata sullo studio della lipofilità, attraverso il metodo sopra descritto, e sulla formulazione di un nuovo modello predittivo per un'ampia serie di complessi di Pt(IV) aventi diversi leganti assiali.

Successivamente l'attenzione è stata spostata su una classe di composti di Pt(IV)-dicarbossilati (**1a-1c** e **2a-2c**, Figura 1.12), con leganti assiali aromatici, non ancora presa in considerazione in letteratura.

La presenza di gruppi arilici risulta molto interessante, in quanto permetterebbe un incremento di lipofilità e dell'*uptake* cellulare di questi pro-farmaci. Infatti, l'unico

studio effettuato sul complesso **1a**²¹ ha mostrato risultati soddisfacenti di *uptake* cellulare su varie linee cellulari. Inoltre, tali leganti assiali potrebbero diventare un utile *scaffold* per lo sviluppo di un potenziale *drug targeting*.

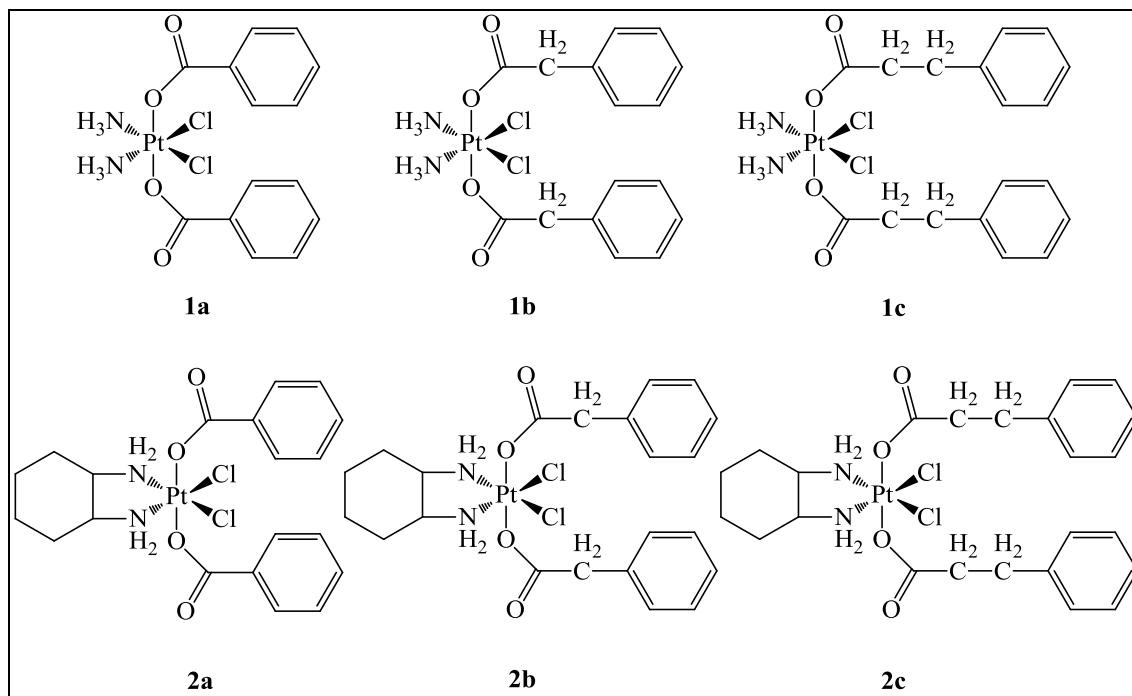


Figura 1.12 Complessi di Pt(IV)-dicarbossilati oggetto di questo studio

In questa seconda parte di tesi il lavoro è stato suddiviso in varie fasi:

- sintesi e caratterizzazione dei complessi **1a-1c** e **2a-2c**
- studio delle proprietà chimico-fisiche dei complessi **1a-1c** **2a-2c**
- riduzione con glutatione, acido ascorbico ed α -tocoferolo dei complessi **1a-1c** **2a-2c**
- attività antiproliferativa e *uptake* cellulare per i complessi **1a-1c** **2a-2c**
- tentativo di *drug targeting* del complesso **1a** con la β -ciclodestrina.

²¹ W.H. Ang, S. Pilet, R. Scopelliti, F. Bussy, L. Juillerat-Jeanneret, P. Dyson, *Synthesis and characterization of Pt(IV) anticancer drugs with functionalized aromatic carboxylate ligands: influence of the ligands on drugs efficacies and uptake.*, J. Med. Chem., 2005, 48, 8060-8069.

Capitolo 2

Determinazione della lipofilicità di complessi di Pt(IV): modelli QSRR a confronto

2.1 Descrizione del lavoro

La prima parte di questo lavoro è consistita in uno studio sulla lipofilicità di una serie di 22 complessi di Pt(IV)-diidrossido, attraverso la determinazione del coefficiente di ripartizione $\log P_{o/w}$ mediante la tecnica RP-HPLC.

Dapprima i dati sperimentali ottenuti sono stati inseriti in un modello QSPR (*Quantitative Structure Property Relationship*) per la determinazione del $\log P_{o/w}$ costruito per una serie di 31 complessi di Pt(IV) aventi diversi leganti assiali²². I risultati tuttavia hanno mostrato una scarsa capacità predittiva del modello QSPR totale risultante a causa della bassa compatibilità del *set* di descrittori molecolari utilizzato con i nuovi complessi di Pt(IV)-diidrossido inseriti.

In questo lavoro di tesi si è quindi cercato di costruire un nuovo modello QSPR valido per tutti i complessi di Pt(IV).

2.2 Coefficiente di partizione $\log P_{o/w}$

Per esplicitare l'effetto terapeutico desiderato, un farmaco deve attraversare una o più barriere biologiche. Il passaggio attraverso queste membrane può coinvolgere sia meccanismi di diffusione passiva che meccanismi di trasporto attivo (*ATP-dependent*). Di conseguenza, nella progettazione di un composto farmacologicamente attivo, è necessario ottimizzare le proprietà farmacologiche, in particolare l'assorbimento del farmaco e la sua distribuzione.

La diffusione passiva di una molecola attraverso la membrana cellulare dipende dalle caratteristiche strutturali del composto e da quelle della membrana stessa, secondo la prima legge di Fick:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D \times A \times P}{h} (C_{out} - C_{in}) \quad (2.1)$$

dove dQ/dt indica la velocità di diffusione attraverso la membrana, A è la sua area superficiale e h la sua altezza, D rappresenta il coefficiente di diffusione, $(C_{out} - C_{in})$ è la

²² J.A. Platts, G. Ermondi, G. Caron, M. Ravera, E. Gabano, L. Gaviglio, G. Pelosi, D. Osella, *Molecular and statistical modeling of reduction peak potential and lipophilicity of platinum(IV) complexes*, J Biol Inorg Chem, 2011, 16, 361–372.

differenza delle concentrazioni di soluto ai due lati della barriera e P esprime il coefficiente di partizione.

I parametri A e h sono caratteristici della membrana considerata, mentre D e P possono variare in funzione della natura del composto in esame. In particolare, il valore del coefficiente di diffusione D diminuisce bruscamente all'aumentare delle dimensioni delle molecole in esame ($PM > 400-500$), mentre non subisce significative variazioni per molecole più piccole.

Per queste ragioni, il coefficiente di partizione P risulta essere il fattore che maggiormente determina le differenze nella velocità di assorbimento dei diversi composti.²³

Il coefficiente di partizione P viene definito come il rapporto tra le concentrazioni all'equilibrio di una sostanza C in un sistema costituito da due solventi immiscibili, quindi esprime l'affinità di un soluto per una fase apolare rispetto ad una fase di riferimento.

Nel caso dei solventi n-ottanolo e acqua, il coefficiente di partizione di una sostanza C è un numero espresso in forma logaritmica a base 10:

$$\log P_{o/w} = \log \frac{[C]_{n\text{-ottanolo}}}{[C]_{\text{acqua}}} \quad (2.2)$$

In ambito farmacologico, il $\log P_{o/w}$ rappresenta quindi un indice utile per misurare la capacità di un farmaco di attraversare la membrana cellulare mediante diffusione passiva: per diffondere attraverso la cellula, tale molecola deve possedere un grado di idrofilia necessario a tenerla in soluzione nei liquidi extra- e intra-cellulari ed al tempo stesso un grado di lipofilia sufficiente da permetterle di distribuirsi in un ambiente lipidico quale la matrice della membrana cellulare. Molecole con coefficiente di partizione molto basso verranno escluse dalla fase lipidica e la loro capacità di penetrare nelle membrane cellulari risulterà trascurabile, mentre per valori di $\log P_{o/w}$ troppo alti esse tenderanno ad accumularsi all'interno del doppio strato stesso.

Oltre ad essere un parametro di idrofobicità fondamentale per stabilire relazioni quantitative attività biologica/struttura molecolare (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationship*), il $\log P_{o/w}$ rappresenta anche un elemento importante a livello ambientale, in quanto consente di prevedere la distribuzione di un inquinante nei diversi

²³ M X. Liu, B. Testa and A. Fahr, *Pharm. Res.*, 2011, 28, 962.

comparti di cui si compone l'ambiente biologico, suggerendo fenomeni di bioaccumulo o adsorbimento.

In questi ultimi anni la determinazione del coefficiente di partizione è stata oggetto di numerosi studi²⁴ e, data la difficoltà nella sua misura diretta *in vivo* e considerando soprattutto la scarsa riproducibilità della stessa, sono stati sviluppati vari sistemi *in vitro* per ottenere valori di $\log P_{o/w}$ più rappresentativi possibili.

I tre principali metodi *in vitro* sono:

- ripartizione tra un solvente organico ed una fase acquosa
- sistema di ripartizione cromatografica RP-HPLC
- ripartizione in liposomi.

I sistemi di ripartizione di un soluto tra un solvente organico ed una fase acquosa sono stati usati come modello per l'interazione delle membrane biologiche sin da quando, agli inizi del 1900, Meyer²⁵ e Overton²⁶ dimostrarono che l'attività di farmaci anestetici inalatori dipendeva dal loro coefficiente di partizione olio di oliva/acqua.

Il metodo classico per misurare il $\log P_{o/w}$ è il *flask-shaking*, che prevede l'aggiunta della molecola da testare ad una miscela di acqua e n-ottanolo ed una successiva estrazione con imbuto separatore.

Mentre la scelta dell'acqua come fase polare in grado di rappresentare i fluidi extra- e intra-cellulari risulta piuttosto scontata, l'adozione del n-ottanolo si riferisce alla sua capacità di simulare il doppio strato fosfolipidico che costituisce la membrana cellulare. Altre proprietà che hanno determinato l'impiego di questo solvente sono il suo costo limitato e la sua ampia disponibilità commerciale, nonché il fatto di non risultare eccessivamente idrofobo, ovvero idrorepellente.

La procedura si compone di diverse fasi:

1. *fase iniziale*: i due solventi immiscibili vengono posti in agitazione per 24 ore, tempo durante il quale si arriva a saturazione del sistema;
2. *fase di miscelazione*: ad un volume noto di uno dei due solventi (n-ottanolo) si aggiunge un ugual volume del secondo solvente (acqua) contenente il soluto e si agita per 5 minuti, fino al raggiungimento dell'equilibrio di partizione. La misura viene effettuata almeno tre volte;

²⁴ M. D. Hall, H. R. Mellor, R. Callaghan and T. W. Hambley, *J. Med. Chem.*, 2007, 50, 3403.

²⁵ H. Meyer, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1899, 42, 110.

²⁶ E. Overton, *Studien uber die narkose*, Fisher Jena, Germany, 1901.

3. fase di separazione: si lascia la miscela a riposo per 1 ora in modo che le due fasi si separino (in alternativa si centrifuga a 4000 rpm per 30 minuti);
4. fase di misura: si effettuano prelievi dalle due fasi per determinare la concentrazione del soluto.

Questo metodo presenta tuttavia molti limiti, come la ridotta riproducibilità, la difficoltà di separazione delle due fasi e la non applicabilità nel caso di molecole con valori di $\log P_{o/w}$ maggiori di 4-5. Per ovviare a questi inconvenienti, una delle tecniche più valide messe a punto in questi anni prevede l'uso della cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC).

Infatti, il processo di ripartizione che avviene all'interno della colonna cromatografica tra la fase stazionaria (le catene alifatiche ancorate alla silice) e la fase mobile acquosa è molto simile a quello che avviene nell'imbutto separatore tra n-ottanolo ed acqua.

Inoltre, esistono numerose similarità tra l'interfaccia fase mobile/fase stazionaria e l'interfaccia membrana/acqua. La fase legata chimicamente non si comporta come un liquido ma assomiglia allo schieramento ordinato delle catene idrocarburiche sulla membrana. I gruppi con residui silanoli e lo strato adsorbito di modificatore organico con legame ad idrogeno e molecole di acqua coestrate possono rappresentare le regioni della membrana più esterne.

2.3 Determinazione di $\log P_{o/w}$ mediante RP-HPLC

Per lungo tempo le potenzialità della cromatografia liquida ad alte prestazioni in campo farmaceutico non sono state pienamente sfruttate, in quanto questa tecnica è stata spesso considerata uno strumento utile soltanto all'identificazione, alla quantizzazione e alla separazione su scala preparativa dei composti di interesse. Questa visione appare ovviamente riduttiva e trascura le basi teoriche del processo cromatografico, basate sulle interazioni multiple che si stabiliscono tra soluto, fase stazionaria e fase mobile. Il concetto di HPLC come strumento di simulazione piuttosto che di semplice uso separativo risiede nella possibilità di effettuare analisi utili per la determinazione delle proprietà chimico-fisiche delle molecole strettamente legate all'attività farmacologica. Lo sviluppo delle tecniche cromatografiche ha così permesso l'utilizzo di metodiche alternative più efficienti, veloci e riproducibili in grado di fornire dei parametri

cromatografici che sono indici dell'interazione idrofobica, come il fattore di capacità k' , che dipende dal tempo di ritenzione secondo la seguente relazione:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.3)$$

dove t_R è il tempo di ritenzione relativo al soluto ritenuto e t_0 è il tempo morto della colonna.

Dato che la ritenzione in RP-HPLC dipende dalla ripartizione tra le fasi mobile e stazionaria, è possibile trovare una relazione che lega quest'ultima ed il fattore di capacità e da qui un'ulteriore relazione tra $P_{o/w}$ e k' che in forma logaritmica a base 10 può essere indicata come:

$$\log P_{o/w} = a + b \cdot \log k' \quad (2.4)$$

Iniettando composti a $\log P_{o/w}$ noto (determinato mediante imbuto separatore) in una colonna C18 o C8 ed utilizzando i relativi fattori di capacità k' per tarare il sistema, è quindi possibile determinare la relazione suddetta tra $\log k'$ e $\log P_{o/w}$.

Una volta determinata la relazione (2.4), è possibile stimare il $\log P_{o/w}$ di nuovi composti sulla base dei loro fattori di capacità.

I vantaggi del metodo RP-HPLC riguardano la maggiore velocità di esecuzione delle operazioni di partizione, la possibilità di utilizzare quantità minime (mg) di prodotto, nonché di studiare contemporaneamente numerosi composti, ed una relativa insensibilità verso impurezze o prodotti di degradazione, che andrebbero ad influire sulla partizione nell'imbuto separatore, grazie all'uso di rivelatori discriminanti quali spettrometro di massa o *photodiode array*.

L'uso di questo metodo comporta però degli svantaggi: è necessaria una calibrazione con composti a coefficiente di partizione noto. La relazione tra $\log P_{o/w}$ e $\log k'$ deve essere lineare; possono presentarsi *outliers* dovuti a specifiche interazioni tra soluto e fase stazionaria (ad esempio tra ammine e silanoli liberi presenti nelle colonne di silice). Le interazioni soluto-solvente possono essere eliminate dal calcolo del $\log P_{o/w}$ grazie all'uso del fattore di capacità $\log k'_0$, ottenuto estrapolando i dati di ritenzione di eluenti binari al 100% di acqua. Questo approccio potrebbe infatti minimizzare l'effetto del solvente sulla natura della fase acquosa.

L'uso del $\log k'_0$ come parametro idrofobico è stato dimostrato per la prima volta da Hulshoff e Perrin²⁷ per una serie di benzodiazepine.

La relazione tra ritenzione del soluto e composizione della fase mobile può essere descritta da:

$$\log k' = \log k'_0 + A\phi^2 - S\phi \quad (2.5)$$

dove A ed S sono delle costanti per una data combinazione soluto-eluyente e ϕ è la percentuale di modificatore organico nell'eluyente acquoso.

Studi successivi condotti da Snyder²⁸ dimostrarono che la ritenzione di un soluto in una fase mobile binaria organico/acqua su un sistema RP-HPLC è una funzione lineare della composizione della fase mobile in un ristretto intervallo di ϕ :

$$\log k' = \log k'_0 - S\phi \quad (2.6)$$

dove $\log k'$ è il fattore di ritenzione del soluto ad una specifica composizione della fase mobile, ϕ è la composizione della fase mobile (frazione del volume del modificatore organico dell'eluyente) e S è una costante che dipende dal solvente, dal soluto, dal modificatore organico e la fase stazionaria in considerazione.

L'intercetta $\log k'_0$ rappresenta il fattore di capacità in acqua pura ed è un parametro cromatografico di idrofobicità comunemente impiegato: questo valore dipende dalle proprietà del modificatore, sarà maggiore con eluenti metanolo/acqua e gradualmente più piccolo in solventi più lipofili come acetonitrile e tetraidrofurano.

Considerando il metanolo come modificatore organico, il coefficiente $\log k'_0$ è stato messo in correlazione con il valore di $\log P_{o/w}$ tramite un'equazione lineare:

$$\log P_{o/w} = A \cdot \log k'_0 + B \quad (2.7)$$

Bisogna considerare che il range di idrofobicità coperto utilizzando l'approccio del $\log k'_0$ risulta limitato: la frazione di volume accessibile di metanolo per poter ottenere un modello è $10\% < \phi < 90\%$. Inoltre, in funzione del metodo di estrapolazione si possono osservare deviazioni di alcune classi di composti.

Alcuni studi condotti da Yamagami e Takao²⁹ dimostrarono come valori di $\log k'$ allo 0% di metanolo senza estrapolazione avessero una correlazione con $\log P_{o/w}$

²⁷ A. Hulshoff, S.H. Perrin, *J. Chromatogr.*, 1979, 129, 263-276.

²⁸ L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, *J. Chromatogr.*, 1976, 165, 3-30.

estremamente scarsa, mentre fu trovata una buona correlazione usando $\log k'$ al 50% di metanolo. Tutto questo suggerisce che colonne a fase inversa predicono meglio i coefficienti di partizione quando il metanolo adsorbito modifica la fase stazionaria. Poiché c'è una scarsa correlazione lineare tra $\log P_{o/w}$ e $\log k'$ a basse percentuali di metanolo, occorrerebbe eseguire un'extrapolazione quadratica dei dati per ricavare $\log k'_0$. Tuttavia, anche se più accurata, è consigliabile un'extrapolazione lineare entro un certo *range* più ristretto di percentuale di metanolo (spesso limitato a $30\% < \gamma < 70\%$).

La ritenzione in RP-HPLC è dovuta all'interazione sfavorevole tra il soluto e le molecole di acqua circostanti presenti nella fase mobile³⁰. Questo fenomeno conduce ad un netto cambiamento di energia libera nell'esclusione del soluto dall'eluente verso i gruppi non-polari del supporto (effetto solvofobico).

La scelta di un'appropriata fase mobile deve tenere in considerazione il tipo di modificatore organico, il livello di modificatore utilizzato, l'extrapolazione del fattore di capacità allo 0% di modificatore organico oppure la scelta di una particolare percentuale di modificatore organico, l'utilizzo di stabilizzatori del pH e di modificatori della fase stazionaria.

Il modificatore organico è importante in quanto esso esercita effetti selettivi nella ritenzione di soluti polari. Il metanolo risulta il più comune modificatore organico utilizzato nella determinazione dei coefficienti di partizione, poiché è più simile all'acqua rispetto ai più comuni solventi utilizzati in RP-HPLC grazie alla capacità di accettare e donare legami idrogeno. Inoltre, altri modificatori come acetonitrile e tetraidrofurano (THF) hanno un grado di adsorbimento su silice modificata con gruppi alchilici maggiore del metanolo, ma risultano deboli accettori di legame ad idrogeno e perciò esercitano una forte influenza sulla struttura dell'eluente e di conseguenza sull'effetto solvofobico.

Il sistema RP-HPLC, avente come fase stazionaria ottadecilsilani e come eluenti miscele metanolo/acqua, simula bene le interazioni esistenti nel sistema n-ottanolo/acqua (equilibrio lipofilo/idrofilo ottimale dovuto alle catene n-ottili, ai gruppi

²⁹ C. Yamagami, N. Takao, *Chem Express.*, 1992, 6, 385-388.

³⁰ O. Sinanoğlu, in B. Pullman (Ed.), *Molecular Associations in Biology*, Academic Press, New York, 1968, p.427.

idrossili con legami ad idrogeno e al contenuto di acqua in n-ottanolo relativamente alto alla saturazione), cosicché non è necessario ricoprire la fase stazionaria con n-ottanolo.

Inoltre, poiché i silanoli liberi nella colonna di silice a fase inversa sono in grado di interagire specificamente con diverse funzionalità, qualsiasi metodica che possa mascherare i silanoli e i loro effetti sarebbe vantaggiosa.

Le colonne di ottadecilsilice (ODS) sono le più usate per la determinazione di $\log P_{o/w}$. Quando si usano delle fasi mobili metanolo/acqua, i fattori di capacità di queste colonne generalmente correlano bene con i coefficienti di partizione n-ottanolo/acqua riportati in letteratura. Nonostante si cerchi di ridurre gli effetti dei silanoli liberi mediante modificazione chimica (addizione di un'ammina lipofila o saturazione della fase stazionaria con n-ottanolo), si osservano comunemente *outliers* dovuti a specifiche interazioni tra silanoli liberi e vari gruppi funzionali. Le colonne con meno silanoli liberi sono utilizzate per ridurre la curvatura della relazione di $\log k'$ in funzione di ϕ .

Altre colonne utilizzate sono quelle polimeriche a fase inversa costituite da polistirene e divinilbenzene (PS-DVB).

2.4 Quantitative Structure Property Relationship (QSPR)

Negli ultimi anni l'interesse per le applicazioni QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) e QSPR (*Quantitative Structure Property Relationship*) è aumentato considerevolmente, stimolato soprattutto dal bisogno sempre maggiore di dati e di informazioni chimiche e farmaceutiche, nonché promosso dal rapido sviluppo e crescente disponibilità in campo informatico.

La conoscenza sulle correlazioni sistematiche tra la struttura dei composti organici e varie proprietà degli stessi risale ai primordi della chimica organica. Un esempio molto rilevante è l'aumento regolare nella temperatura del punto di fusione e di ebollizione che viene osservato nelle serie omologhe degli idrocarburi quando di pari passo si aumenti la lunghezza della catena carboniosa o del peso molecolare.

I metodi QSAR sono stati usati significativamente durante l'ultima decade nelle applicazioni farmaceutiche e biologiche con lo scopo di ridurre i costi e la fatica necessari per la sintesi ed il *design* di nuove molecole, nonché per evitare sperimentazioni su animali.

Il metodo più utilizzato per la costruzione di modelli QSAR (mediante regressione multipla) è quello additivo, risalente agli studi di Hansch (1964) sulla relazione quantitativa tra l'attività biologica di una serie di composti ed i loro sostituenti o parametri che rappresentano effetti idrofobici, elettronici o sterici. Egli verificò che l'attività biologica può essere quantitativamente riferita alle caratteristiche fisiche e chimiche di un composto. Hansch sviluppò un metodo per calcolare il $\log P_{o/w}$ basato sulla somma dei contributi alla lipofilia dei sostituenti molecolari, in modo tale da predirne il valore prima della sintesi del composto stesso.

Il comportamento di molecole sostituite può essere quantificato dalla costante di idrofobicità π dei sostituenti, determinata per differenza tra il $\log P_{o/w}$ di un composto di riferimento con e senza il sostituito X. Un valore positivo di π indica che il sostituito è più idrofobico dell'idrogeno, al contrario un valore negativo che è meno idrofobico.

L'uso di questo parametro trova giustificazione considerando che il cambiamento di un sostituito può condizionare il carattere idrofobico del farmaco e, quindi, la sua attività biologica.

Il metodo di Hansch prevede l'accumulo di una grande quantità di dati sperimentali su cui basare il calcolo del $\log P_{o/w}$ di nuove molecole. Inoltre, le procedure di calcolo in generale richiedono, comunque, validazioni mediante confronto con procedure sperimentali.

Nell'ultimo decennio i modelli QSAR e QSPR sono stati sviluppati ed applicati per la stima di un largo *range* di proprietà chimiche ed attività biologiche. Il primo passo per determinare un modello consiste nella selezione di un cospicuo range (*training set*) di dati che possono in genere essere presi da banche dati esistenti o dalla letteratura. La fase di creazione del *training set* può anche essere costruita solo sulla base della disponibilità di dati riproducibili e accurati. E' chiaro che questo approccio gioca un ruolo chiave per la costruzione di un adeguato modello QSAR, perché la rappresentatività e la qualità dei dati selezionati influenzerà tutti i passaggi successivi.

A questo punto vengono scelti appropriati parametri strutturali o proprietà (*molecular descriptors*) che diano la migliore correlazione secondo i principi del modello QSAR, con un'appropriata successiva analisi statistica (*statistical analyses*) in grado di supportare il modello finale. I descrittori molecolari non sperimentali vengono calcolati a partire dalle strutture ottimizzate dei composti in analisi.

Con l'analisi statistica si arriva alla formulazione dell'equazione del modello, che lega il parametro y prescelto da determinare con i descrittori molecolari opportuni. Si arriva in

genere ad una equazione lineare con uno o più descrittori molecolari correlati, come la seguente:

$$y = k + a_1P_1 + a_2P_2 + \dots + a_nP_n \quad (2.8)$$

dove y è il parametro da determinare secondo il modello, k l'intercetta (costante), P_n i descrittori molecolari e a_n i suoi coefficienti.

Un approccio alternativo messo a punto negli ultimi anni sfrutta l'utilizzo di descrittori molecolari tridimensionali, estratti mediante nuovi strumenti computazionali come GRID e VolSurf.

GRID è una procedura computazionale che opera attraverso una sonda chimica anisotropa, un *probe*, che può essere rappresentato da uno specifico atomo o da un'intera molecola. Questa sonda interagisce in maniera puntuale con il composto da studiare in modo da evidenziare i punti di massima interazione energetica.

Tale strumento costruisce attorno alla molecola una gabbia parallelepipedica, suddividendola in piccole griglie; dato che GRID è stato ideato per lo studio dei sistemi biologici, viene assunto a priori che l'ambiente che circonda la molecola sia acquoso.

Successivamente viene calcolata l'energia di interazione tra la molecola ed il *probe* posizionato in un punto della griglia e questa operazione viene ripetuta fino a ricoprimento dell'intero volume.

Si ottiene così un MIF³¹ (*Molecular Interaction Field*) che descrive la variazione dell'energia di interazione tra la molecola ed il *probe* nello spazio 3D. Per il calcolo dei MIFs viene utilizzata la seguente funzione di energia:

$$E = E_{VDW} + E_{EL} + E_{HB} + S$$

dove E_{VDW} è l'energia di Van der Waals, E_{EL} è l'energia elettrostatica, E_{HB} è l'energia relativa all'interazione idrogeno e S è un termine che tiene conto del contributo entropico.

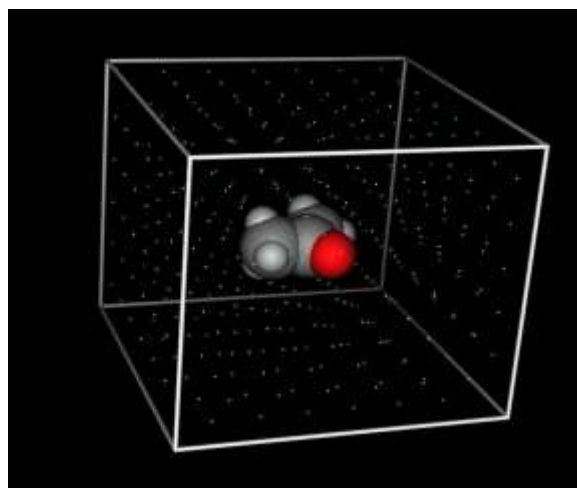


Figura 2.1 Esempio di MIF

³¹ R G. Cruciani, R. Mannhold, H. Kubinyi and G. Folkers, *Molecular Interaction Fields. Applications in Drug Discovery and ADME Prediction*, Wiley-VCH, Zurich, 2006.

VolSurf è un'altra procedura computazionale che comprime le informazioni presenti nei MIFs, ottenute tramite GRID^{32,33}, trasformandole in descrittori numerici. Questo software può essere utilizzato per la messa a punto di metodi statistici ottimizzati per i modelli ADME (assorbimento, distribuzione, metabolismo e eliminazione del farmaco). VolSurf offre la possibilità di utilizzare strumenti chemiometrici come la PCA (*Principal Component Analysis*) e la PLS (*Partial Least Square regression*) per analizzare i descrittori molecolari e le relazioni struttura-proprietà delle molecole studiate.

I descrittori che VolSurf utilizza sono numerosi:

- descrittori di dimensione e forma: volume molecolare, superficie molecolare, rapporto volume/superficie, sfericità molecolare;
- descrittori delle regioni idrofiliche: descrittori idrofilici (calcolati tra -1.0 e -0.2 kcal mol⁻¹ spiegano la polarizzabilità delle forze di dispersione, tra -2.0 e -6.0 kcal mol⁻¹ la polarità e le regioni di legame idrogeno donatore-accettore), fattori di capacità (rapporto tra la superficie idrofila e quella totale);
- descrittori delle regioni idrofobiche: ad es. probe DRY;
- descrittori dei momenti di energia di interazione: esprimono lo sbilanciamento tra il centro di massa di una molecola ed il baricentro delle regioni idrofiliche;
- descrittori misti: equilibrio idrofilico-lipofilico, momento anfifilico, critical packing parameter, legami idrogeno, polarizzabilità;
- descrittori chimico-fisici: logP, logD, PSA, Soly, Sol-pH;
- descrittori dei modelli ADME.

Tutti i calcoli computazionali presentati in questa prima parte di lavoro sono stati condotti in collaborazione con il Prof. Giuseppe Ermondi e la Dott.ssa Giulia Caron presso il CASMedChem, Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze della Salute (Università di Torino).

I descrittori molecolari quanto-meccanici, sono stati calcolati utilizzando i *softwares* MOPAC2009 e SPARTAN 08. Per i descrittori molecolari tridimensionali è stato invece usato il *software* VolSurf 4.1.2 (<http://www.moldiscovery.com/>).

³² D. N. Boobbyer, P. J. Goodford, P. M. Mcwhinnie and R. C. Wade, *J. Med. Chem.*, 1989, 32, 1083.

³³ R. C. Wade and P. J. Goodford, *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 148.

2.5 Strategia di sintesi

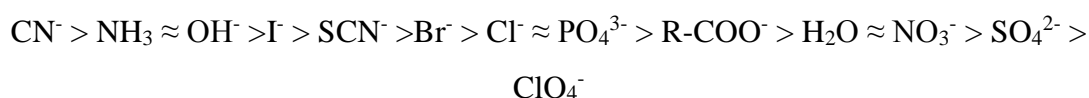
I complessi di Pt(IV), oggetto di questo studio vengono tipicamente preparati per ossidazione dei rispettivi composti di Pt(II) e successiva reazione con anidridi o cloruri acilici.

I metodi disponibili in letteratura per la sintesi di complessi di Pt(II) sono pochi, riportano rese generalmente basse e prodotti di non sempre elevata purezza.

La reazione di $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ e NH_3 in acqua produce varie specie complesse, in funzione delle condizioni impiegate: *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (*cloruro di Peyrone*), *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (*cloruro di Reiset*) e $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_4][\text{PtCl}_4]$ (*sale di Magnus*).

La via di sintesi seguita in questo lavoro di tesi trae origine dal metodo descritto da Dhara nel 1970 per la sintesi del *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ ottenuto dalla reazione di $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$, KI e ammoniaca.

Facendo uso del concetto di effetto *trans*-orientante e considerando l'ordine di affinità per il platino dei leganti più comuni, secondo la serie spettrochimica:

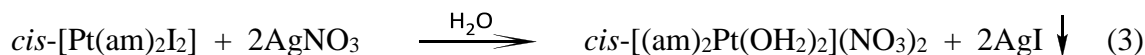
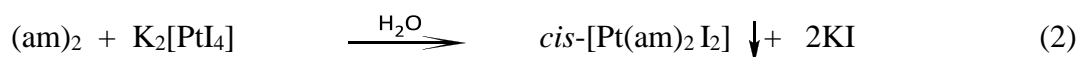


Dhara dimostrò che una concentrazione controllata di ioni cloruro poteva evitare la formazione dei sottoprodotti sopra citati. Questo metodo è risultato molto più rapido ed ha permesso di ottenere rese più alte rispetto al trattamento diretto di $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ con l'ammina. Con questa via di sintesi si ottiene il prodotto finale passando attraverso l'intermedio *cis*- $[\text{Pt}(\text{am})_2\text{I}_2]$, dove $(\text{am})_2$ è una diammina o am un'ammina.

In ambiente acquoso la reazione di tale intermedio con Ag_2SO_4 (o AgNO_3) porta alla formazione di un diacquocomplesso, *cis*- $[\text{Pt}(\text{am})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2-}$; la reazione è favorita dalla precipitazione di AgI, estremamente insolubile in acqua ($K_{\text{ps}} 8.3 \times 10^{-17} \text{ mol}^2\text{l}^{-2}$), che sposta l'equilibrio verso la formazione del prodotto. Sempre in ambiente acquoso, la reazione di *cis*- $[\text{Pt}(\text{am})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2-}$ con un dicarbossilato di bario $[\text{BaX}]$, reazione favorita dalla precipitazione di BaSO_4 ($K_{\text{ps}} 1.1 \times 10^{-10} \text{ mol}^2\text{l}^{-2}$) o con KCl porta alla formazione del complesso finale desiderato $[\text{Pt}(\text{am})_2\text{X}]$ o *cis*- $[\text{Pt}(\text{am})_2\text{Cl}_2]$.

I passaggi di questa sintesi vengono descritti qui di seguito:





$(\text{am})_2 = \text{diammina o } 2\text{NH}_3$

$\text{X} = \text{dicarbossilato}$

In tutti i passaggi di sintesi sono stati utilizzati reagenti in eccesso rispetto alle quantità stechiometriche, in modo da spingere le reazioni nella direzione voluta.

1. Nel primo step della sintesi si prepara $\text{K}_2[\text{PtI}_4]$ per reazione tra $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ e KI. La reazione è molto rapida in quanto è favorita dalla maggiore affinità dello ione I^- rispetto a Cl^- nei confronti del Pt(II). Sia $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ che $\text{K}_2[\text{PtI}_4]$ sono solubili in acqua: il primo impartisce alla soluzione un colore rosso brillante, mentre il secondo presenta un colore marrone scuro. $\text{K}_2[\text{PtI}_4]$ non viene isolato.

2. Il secondo step (preparazione del sintone iodurato) prevede la sostituzione di due ioni ioduro con il legante amminico, in cui i donatori di elettroni sono atomi di azoto più affini per il platino dell'alogenuro. L'alto effetto *trans*-orientante dello ioduro coordinato assicura la configurazione *cis*. Tale stereochimica viene poi mantenuta durante tutta la procedura sintetica. Questo intermedio viene isolato e caratterizzato.

3. Il terzo step (attivazione del sintone) trasforma il sintone Pt-diioduro nell'acquocomplesso $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{am})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{SO}_4$: la sintesi di questi complessi è resa possibile dall'utilizzo di un sale d'argento, che sposta l'equilibrio a favore della precipitazione di AgI. In questo modo si forza l'idrolisi del complesso. L'anione SO_4^{2-} funge da controione e non compete con l'idrolisi in quanto ha una minore affinità per il platino rispetto all'acqua ed è presente in concentrazione molto più bassa.

4. Nel quarto ed ultimo step (sostituzione con dicarbossilato o cloruri) le molecole d'acqua vengono scalzate dagli ioni carbossilato o cloruri più affini al platino. Il processo è favorito dalla precipitazione del solfato di bario o del complesso *cis-}[\text{Pt}(\text{am})_2\text{Cl}_2].*

2.6 Sintesi degli intermedi di reazione *cis*-[Pt(*am*)₂I₂]

La sintesi di un complesso di Pt(II) con geometria *cis* contenente due leganti amminici (o un legante diamminico) e due cloruri o due carbossilati (o un dicarbossilato) passa attraverso la sintesi di un intermedio in cui Pt(II) è legato a due ioduri e due atomi di azoto. Si descrive in seguito una procedura generale comune alla sintesi di tutti gli intermedi sintetizzati.

Procedura di sintesi di *cis*-[Pt(*am*)₂I₂] con *am* = NH₃, (*am*)₂ = (1*R*,2*R*)-(-)-1,2-diamminocicloesano

Ad una soluzione di K₂[PtCl₄] (0.50 g, 1.20 mmol) in H₂O si aggiunge un eccesso (1:6) di KI (1.20 g, 7.20 mmol). Si lascia reagire per 40 minuti a T ambiente, al buio e in agitazione magnetica. Si forma K₂[PtI₄], solubile in acqua, che colora la soluzione di marrone scuro. Nel frattempo si prepara una soluzione 2M di ammina o 1M di diammina in H₂O che viene aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione. Si lascia reagire la miscela a T ambiente al buio per circa 30 minuti in agitazione magnetica. Avviene così la formazione di un precipitato di colore giallo-marroncino che viene separato dal surnatante per centrifugazione e lavato con H₂O fredda, etanolo ed etere. Si ottiene il *cis*-[Pt(*am*)₂I₂], con rese che vanno dal 90 al 95%.

2.7 Sintesi dei complessi di Pt(II) con legante cloruro

Procedura di sintesi di *cis*-[Pt(*am*)₂Cl₂] con *am* = NH₃, (*am*)₂ = (1*R*,2*R*)-(-)-1,2-diamminocicloesano

Ad una sospensione di *cis*-[Pt(*am*)₂I₂] (0.96 mmol) in H₂O mantenuta a 50°C si aggiunge un eccesso (1:1.96) di AgNO₃ (0.31 g, 1.9 mmol) e si lascia la miscela di reazione in agitazione al buio per 24 h. In alternativa, si sciolgono 0.28 g (0.98 mmol) di Ag₂SO₄ in 30 ml di H₂O ed in seguito si aggiunge il composto precedentemente sintetizzato. In entrambi i casi si forma *cis*-[Pt(NH₃)(OH₂)₂] solubile in acqua, che viene separato per filtrazione da AgI formatosi nella reazione ed eventuale *cis*-[Pt(*am*)₂I₂] non reagito. Alla soluzione si aggiunge un forte eccesso (1:21) di KCl (1.5 g, 1.9 mmol) e si lascia reagire la miscela al buio a T ambiente in agitazione magnetica per 24 h. La

miscela di reazione viene poi centrifugata per recuperare il precipitato giallo, *cis*-[Pt(am)₂Cl₂], che viene lavato con acqua fredda, etanolo ed etere. Le rese vanno dal 60 al 85%.

2.8 Sintesi dei complessi di Pt(II) con legante dicarbossilato

Procedura di sintesi di *cis*-[Pt(am)₂X] con am = NH₃, (am)₂= en e X = 1,1-ciclobutandicarbossilato, ossalato.

Ad una soluzione di Ag₂SO₄ (0.32 g, 0.98 mmol) in 30 ml di H₂O si sciolgono 1 mmole di *cis*-[Pt(am)₂I₂] e si lascia la miscela di reazione a 50°C in agitazione e al riparo dalla luce per 24 h. Si forma così *cis*-[Pt(am)₂(OH₂)₂]²⁻ solubile in acqua, che viene separato per filtrazione dall'AgI precipitato. Al filtrato si aggiunge una soluzione di Ba(dicarbossilato) (pH ≈ 5-6), ottenuta sciogliendo 1.1 mmoli di acido dicarbossilico in 3 ml di H₂O ed aggiungendo 0.31 g (0.98 mmol) di Ba(OH)₂. Si lascia la miscela di reazione in agitazione al buio a circa 40°C per 24h. Infine il precipitato che si forma (BaSO₄) viene separato per filtrazione e la soluzione viene evaporata con evaporatore rotante. Si ottiene un composto di colore giallo pallido quasi bianco, che viene lavato con metanolo ed etere e fatto essiccare. Le rese vanno dal 78 al 96%.

Procedura di sintesi di *cis*-[Pt(am)₂X] con X = malonato

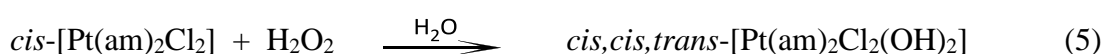
Ad una sospensione di 1 mmole di *cis*-[Pt(am)₂I₂] in H₂O mantenuta a 50°C si aggiungono 2 mmoli di AgNO₃ e si lascia la miscela di reazione in agitazione al buio per 24 h. Si forma così *cis*-[Pt(am)₂(OH₂)₂]²⁻ solubile in acqua, che viene separato per filtrazione dall'AgI precipitato. Nel frattempo si prepara una soluzione contenente 75.0 mg di acido malonico (0.72 mmol) e 57.8 mg di NaOH (1.45 mmol) in H₂O (pH ≈ 6). Si aggiunge questa soluzione al filtrato e si lascia reagire a 50° C per 24 h; successivamente si raffredda in frigorifero per altre 24 h. Si forma un precipitato bianco, il *cis*-[Pt(am)₂X] che viene separato per centrifugazione, mentre il surnatante viene concentrato al rotavapor e di nuovo centrifugato, per recuperare altro precipitato. A questo punto si ricristallizza da acqua il precipitato a caldo per eliminare le impurezze ancora presenti nel composto. La soluzione così ottenuta viene filtrata e concentrata al

rotavapor, senza portarla a secco. La soluzione risultante viene tenuta in frigorifero per 24 h. Si osserva la formazione di un precipitato bianco che viene separato dal surnatante per centrifugazione e lavato con H₂O fredda, etanolo freddo ed etere.

Si ottengono rese che vanno dal 20 al 60%.

2.9 Ossidazione dei complessi di Pt(II) a Pt(IV)

La reazione di ossidazione avviene mediante l'utilizzo di H₂O₂:



Nel processo di sintesi dei composti di Pt(IV) simmetrici, si assiste alla reazione di ossidazione del complesso di Pt(II) con perossido di idrogeno: l'atomo metallico passa dallo stato di ossidazione +2 a quello +4. Durante la reazione il complesso modifica la sua geometria, passando da planare quadrata ad ottaedrica e rendendo di conseguenza possibile la coordinazione di sei leganti attorno al centro metallico.

Nella fase di ossidazione, uno dei leganti assiali deriva dal perossido d'idrogeno, usato come ossidante, e l'altro dal solvente utilizzato: si coordinano, quindi, un primo gruppo ossidrilico, che deriva da H₂O₂, ed un secondo derivante dall' H₂O, solvente di reazione.

Procedura di sintesi di *cis,cis,trans*-[Pt(*am*)₂Cl₂(OH)₂] con *am* = NH₃, (*am*)₂ = (1*R*,2*R*)-(-)-1,2-diamminocicloesano

Ad una sospensione di *cis*-[Pt(*am*)₂Cl₂] (0.45 mmol) in 6 ml di H₂O si aggiunge goccia a goccia una quantità nota di H₂O₂ (35% w/w, 0.60 ml, rapporto molare Pt:H₂O₂ 1:10). Si lascia la miscela in agitazione magnetica per 24 h al buio a T ambiente, ottenendo una sospensione. Il precipitato giallo viene isolato per centrifugazione e lavato con acqua fredda, metanolo ed etere. Il solido ottenuto viene asciugato mediante flusso di azoto e poi pressione ridotta.

Si ottiene il *cis,cis,trans*-[Pt(*am*)₂Cl₂(OH)₂] con rese che vanno dal 45 al 60%.

2.10 Procedure generali di caratterizzazione

Tutti i complessi di Pt(IV) riportati in questo capitolo e nei successivi sono stati sintetizzati seguendo le procedure sopra descritte. Questi composti, che differiscono tra loro per la varietà dei *carrier e leaving groups*, sono stati tutti caratterizzati mediante spettroscopia NMR, spettrometria ESI-MS e cromatografia RP-HPLC.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ sono stati utili per determinare la struttura dei leganti e verificarne l'avvenuta coordinazione al centro metallico. I segnali dei nuclei vicini o direttamente legati al Pt, infatti, risultano più deschermati rispetto a quelli dei leganti liberi e presentano (dove è possibile osservarle) le molteplicità tipiche dell'accoppiamento con ^{195}Pt .

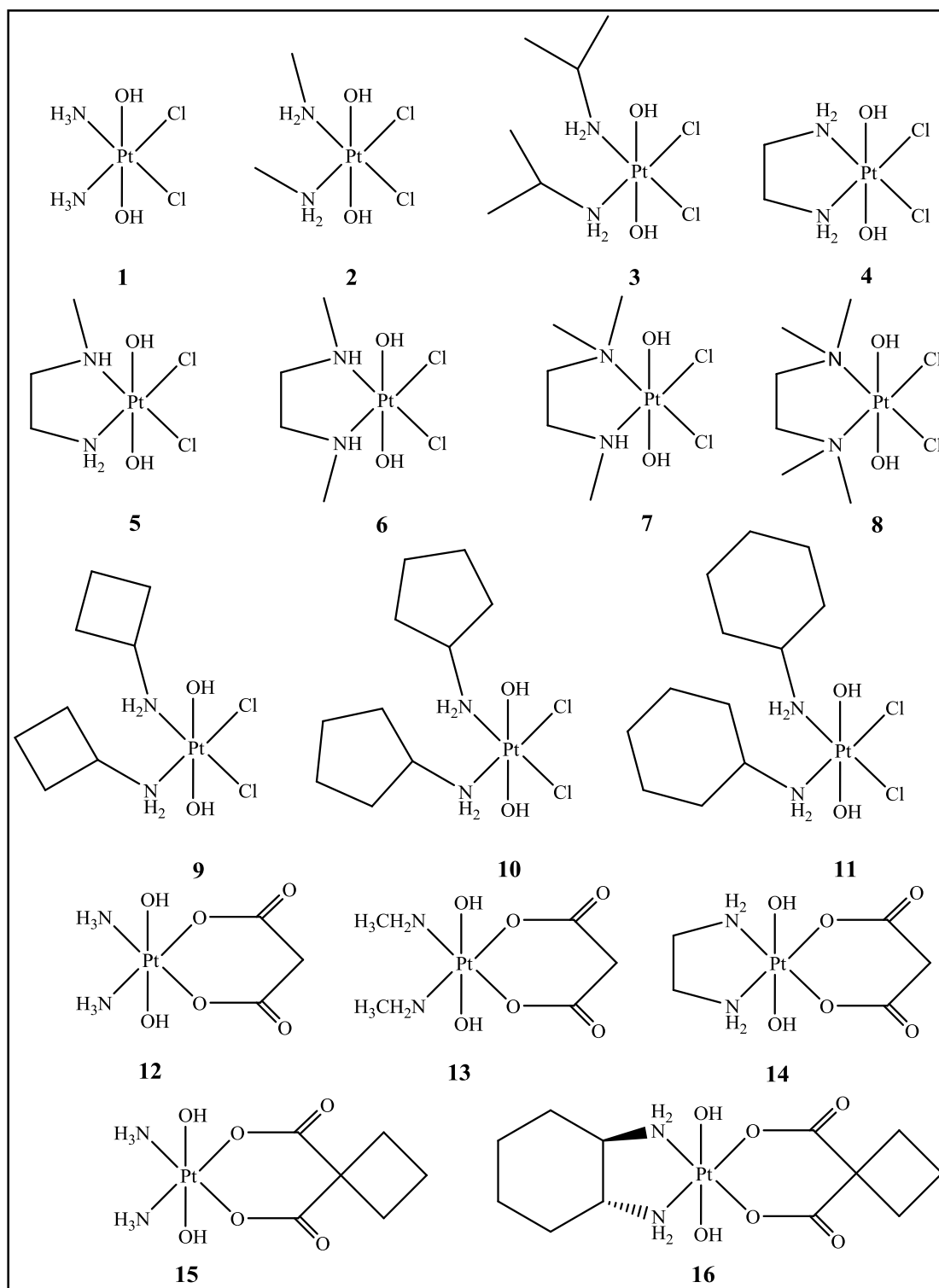
Anche gli spettri $^{195}\text{Pt-NMR}$ si sono rivelati fondamentali per verificare l'identità e la purezza dei complessi sintetizzati. Il *chemical shift* di un atomo pesante come il ^{195}Pt può essere influenzato dalla natura dei leganti presenti nella sfera di coordinazione, dal loro arrangiamento spaziale, dalla natura degli atomi donatori legati, dalla concentrazione, dal pH, dalla temperatura e dal solvente; tutti questi fattori permettono di ottenere un segnale caratteristico per ciascuna specie presente.

Le misure NMR riportate qui di seguito sono state effettuate a $T = 25^\circ\text{C}$ con uno spettrometro Bruker Advance III, alla frequenza di ≈ 500 MHz per il protone, ≈ 125.7 MHz per il ^{13}C e ≈ 107.2 MHz per il ^{195}Pt .

Le analisi mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa sono state effettuate servendosi di uno strumento HPLC-MS Waters dotato di un cromatografo Alliance 2695, un *detector* dual lambda absorbance 2487 ed uno spettrometro di massa 3100 come secondo rivelatore. Il cromatografo prevede una fase stazionaria costituita da una colonna Phenomenex Gemini[®] 5 μm C18, 250×3.00 mm ID ed una fase mobile costituita da una soluzione acquosa di acido formico (15 μM) e metanolo puro (in % diverse a seconda del complesso analizzato), con un flusso di 0,500 mL/min, in eluizione isocratica. Il rivelatore UV-Visibile è stato fissato alla lunghezza d'onda di 210 nm e la temperatura di analisi è stata mantenuta costante a 37°C .

Gli spettri di massa ESI sono stati ottenuti fissando le temperature della sorgente e di desolvatazione, rispettivamente, a 150 e 250°C . Il voltaggio impiegato per il cono ed il capillare è stato fissato, rispettivamente, a 30 V (in positivo o in negativo) ed a 2,70 kV.

Si riportano di seguito le caratterizzazioni di tutti i 22 complessi di Pt(IV)-diidrosso sintetizzati per lo studio in esame.



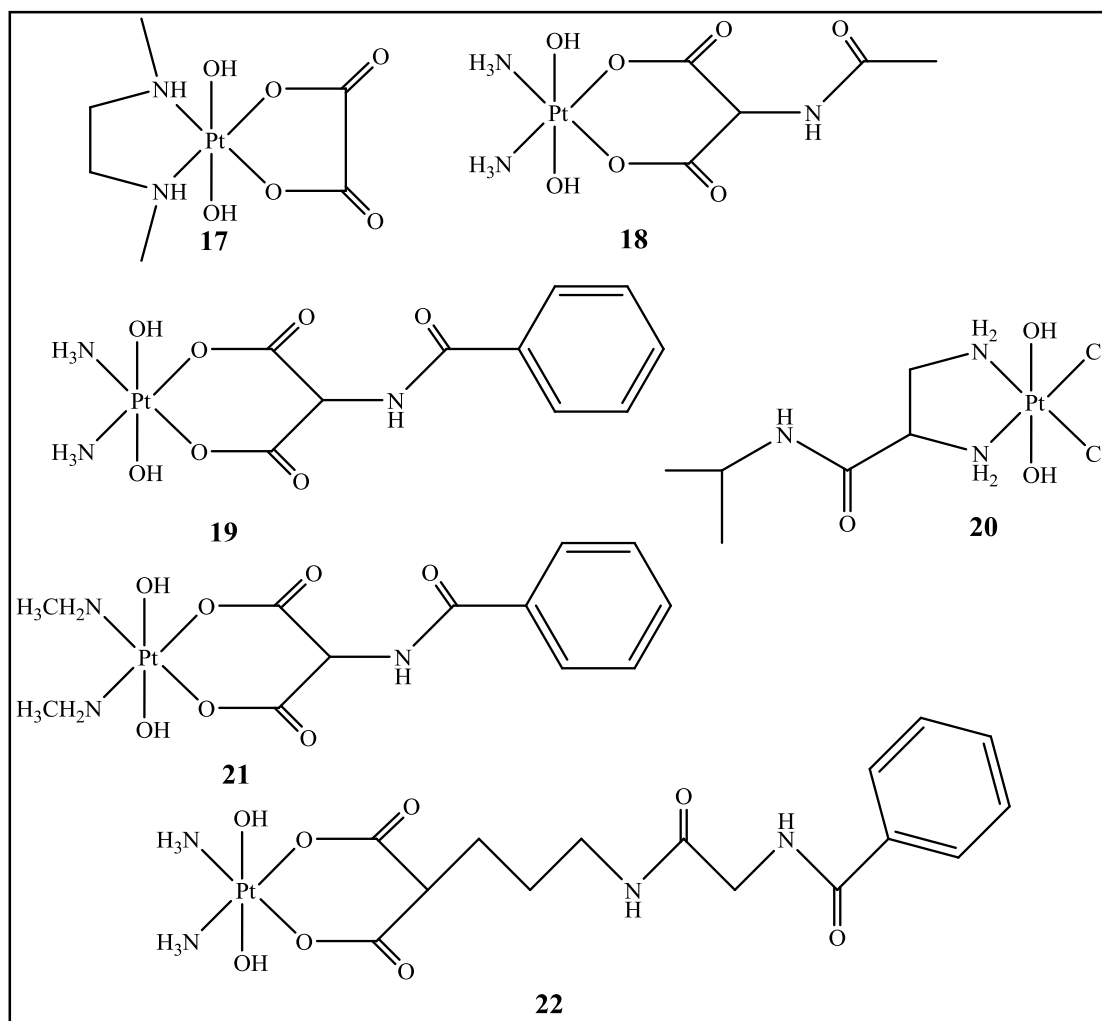


Figura 2.2 Complessi di Pt(IV)-diidrosso in esame

1: Resa 62%. ^{195}Pt -NMR (D_2O): δ 860 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 357.5 m/z; 357.3 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2: Resa 70%. ^1H -NMR (D_2O): δ 2.28 ppm (s, 6H, 2 CH_3). ^{13}C -NMR (D_2O): δ 29.90 ppm (2 CH_3). ^{195}Pt -NMR (D_2O): δ 838 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 385.4 m/z; 385.2 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3: Resa 51%. ^1H -NMR (D_2O): δ 1.86 (d, 12H, 4 CH_3 , $J = 7.69$ Hz), 2.85 (sept, 2H, 2CH, $J = 7.69$ Hz) ppm. ^{13}C -NMR (D_2O): δ 22.08 (4 CH_3), 47.93 (2CH) ppm. ^{195}Pt -NMR (D_2O): δ 934 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 442.3 m/z; 442.0 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

4: Resa 77%. ^1H -NMR (D_2O): δ 2.92 ppm (s, 4H, 2 CH_2). ^{13}C -NMR (D_2O): δ 50.33 ppm (2 CH_2). ^{195}Pt -NMR (D_2O): δ 784 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 383.5 m/z; 383.9 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5: Resa 88%. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ 2.62 (s, 3H, CH_3), 2.92 (m, 4H, 2CH_2) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): δ 46.00 (CH_3), 58.30 (2CH_2) ppm. $^{195}\text{Pt-NMR}$ (D_2O): δ 676 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 397.7 m/z; 397.9 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6: Resa 75%. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ 2.66 (s, 6H, 2CH_3), 2.91 (m, 4H, 2CH_2) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): δ 47.10 (2CH_3), 55.80 (2CH_2) ppm. $^{195}\text{Pt-NMR}$ (D_2O): δ 658 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 412.4 m/z; 412.0 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

7: Resa 85%. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ 2.45 (s, 3H, $-\text{NHCH}_3$), 2.62 (s, 6H, $-\text{NCH}_3$), 2.87 (m, 4H, 2CH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): δ 47.80 (3CH_3), 56.40 (2CH_2) ppm. $^{195}\text{Pt-NMR}$ (D_2O): δ 658 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 426.3 m/z; 426.0 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

8: Resa 59%. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ 2.69 (s, 12H, 4CH_3), 3.03 (m, 4H, 2CH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): δ 49.28 (4CH_3), 64.76 (2CH_2) ppm. $^{195}\text{Pt-NMR}$ (D_2O): δ 698 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 440.3 m/z; 440.1 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

9: Resa 63%. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 1.55 (m, 4H, H3, 2CH_2), 1.86 (m, 4H, H4, 2CH_2), 2.16 (m, 4H, H2, 2CH_2), 3.51 (m, 2H, H1, 2CH), 5.04 (m, 4H, 2NH_2) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 22.80 (C3, 2CH_2), 42.00 (C2, 4CH_2), 58.07 (C1, 2CH) ppm. $^{195}\text{Pt-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 965 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 466.6 m/z; 466.3 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

10: Resa 67%. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 1.51 (m, 8H, H3-4, 4CH_2), 1.64 (m, 4H, H2, 2CH_2), 1.96 (m, 4H, H5, 2CH_2), 3.33 (m, 2H, H1, 2CH), 4.85 (m, 4H, 2NH_2) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 24.01 (C3, 4CH_2), 33.49 (C2, 4CH_2), 57.59 (C1, 2CH) ppm. $^{195}\text{Pt-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 1360 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 494.4 m/z; 494.2 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

11: Resa 51%. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 1.09 (m, 4H, H4, 2CH_2), 1.19 (m, 4H, H3, 2CH_2), 1.54 (m, 4H, H5, 2CH_2), 1.69 (m, 4H, H2, 2CH_2), 2.30 (m, 4H, H6, 2CH_2), 2.69 (m, 2H, H1, 2CH), 4.74 (m, 4H, 2NH_2) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 23.14 (C4, 2CH_2), 29.15 (C3, 4CH_2), 43.51 (C2, 4CH_2), 60.05 (C1, 2CH) ppm. $^{195}\text{Pt-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 1450 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 521.9 m/z; 522.1 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

12: Resa 78%. $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): δ 47.23 (CH_2), δ 179.81 ($2-\text{C}(\text{O})\text{O}$) ppm. $^{195}\text{Pt-NMR}$ (D_2O): δ 1550 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 389.3 m/z; 389.0 m/z calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

13: Resa 70%. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ 2.23 (s, 6H, 2CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): δ 30.06 (CH_3), 51.10 (CH_2), 176.60 ($2-\text{C}(\text{O})\text{O}$) ppm. $^{195}\text{Pt-NMR}$ (D_2O): δ 1600 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): m/z 416.8; 417.0 m/z calcolato per $[M+Na]^+$.

14: Resa 75%. 1H -NMR (D_2O): δ 2.88 (m, 4H, $N-CH_2$) ppm. ^{13}C -NMR (D_2O): δ 48.10 ($N-CH_2$), 52.97 (CH_2), 169.10 ($2-C(O)O$) ppm. ^{195}Pt -NMR (D_2O): δ 961 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 415.5 m/z ; 415.3 m/z calcolato per $[M+Na]^+$.

15: Resa 73%. 1H -NMR (D_2O): δ 2.01 (q, 2H, H_4 , CH_2 , $J = 8.42$ Hz), 2.63 (t, 4H, H_3 , 2 CH_2 , $J = 8.42$ Hz) ppm. ^{13}C -NMR (D_2O): δ 16.07 (C_4 , CH_2), 32.29 (C_3 , 2 CH_2), 55.81 (C_2 , C_{quat}), 180.90 (C_1 , $2-C(O)O$) ppm. ^{195}Pt -NMR (D_2O): δ 1297 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 509.4 m/z ; 509.1 m/z calcolato per $[M+Na]^+$.

16: Resa 45%. 1H -NMR (D_2O): δ 1.11 (m, 2H, CH_2 , DACH), 1.97 (q, 2H, H_4 , CH_2 , CBDC, $J = 8.26$ Hz), 2.02 (m, 4H, CH_2 , DACH), 2.43 (t, 4H, H_3 , 2 CH_2 , CBDC, $J = 8.26$ Hz), 2.76 (m, 2H, CH_2 , DACH), 3.13 (m, 2H, 2 CH , DACH) ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 503.9 m/z ; 504.2 m/z calcolato per $[M+Na]^+$.

17: Resa 63%. 1H -NMR (D_2O): δ 2.73 (s, 6H, 2 CH_3), 3.12 (m, 4H, 2 CH_2) ppm. ^{13}C -NMR (D_2O): δ 45.90 (2 CH_3), 58.01 (2 CH_2), 174.3 ($2-C(O)O$) ppm. ^{195}Pt -NMR (D_2O): δ 1115 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 429.4 m/z ; 429.2 m/z calcolato per $[M+Na]^+$.

18: Resa 62%. 1H -NMR (D_2O): δ 2.10 (s, 1H, CH), 1.97 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C -NMR (D_2O): δ 51.02 (CH_3), 65.00 (CH), 165.90 ($N-C(O)O$), 179.10 ($2-C(O)O$) ppm. ^{195}Pt -NMR (D_2O): δ 1305 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 432.6 m/z ; 432.4 m/z calcolato per $[M+Na]^+$.

19: Resa 57%. 1H -NMR ($DMSO-d_6$): δ 4.66 (m, 1H, $CH-C(O)O$), 5.72 (m, 6H, 2 NH_3), 7.01 (m, 3H, H_o and H_p , 3 CH) 7.82 (d, 2H, H_m , 2 CH , $J = 8.31$ Hz), 8.13 (m, 1H, NH) ppm. ^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$): δ 52.8 ($CH-C(O)O$), 110.8 (C_m), 121.1 (C_p), 126.3 (C_o), 151.3 (C_{quat}), 168.3 ($NH-C(O)O$), 176.3 (2 $C(O)O-CH$) ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 508.3 m/z ; 508.0 m/z calcolato per $[M+Na]^+$.

20: Resa 60%. 1H -NMR (D_2O): δ 1.15 (m, 6H, 2 CH_3), 3.15 (m, 3H, CH_2 , NH_2-CH), 3.98 (m, 1H, $NH-CH$) ppm. ^{13}C -NMR (D_2O): δ 23.50 (CH_3), 43.60 ($NH-CH$), 54.11 (CH_2), 63.12 (NH_2-CH), 187.10 ($-C(O)O$) ppm. ^{195}Pt -NMR ($DMSO-d_6$): δ 1959 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 460.3 m/z ; 460.1 m/z calcolato per $[M+Na]^+$.

21: Resa 69%. 1H -NMR ($DMSO-d_6$): δ 2.90 (s, 6H, 2 CH_3), 4.71 (m, 1H, $CH-C(O)O$), 5.68 (m, 4H, 2 NH_2), 6.68 (m, 3H, H_o and H_p , 3 CH), 7.71 (d, 2H, H_m , 2 CH , $J = 8.79$ Hz), 8.09 (m, 1H, NH) ppm. ^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$): δ 28.1 (CH_3), 53.5 ($CH-C(O)O$), 111.4 (C_m), 122.1 (C_p), 128.9 (C_o), 152.5 (C_q), 166.4 ($C(O)O-NH$), 174.8 (2 $C(O)O-CH$) ppm. ^{195}Pt -NMR ($DMSO-d_6$): δ 1650 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 536.4 m/z; 536.1 m/z calcolato per $[M+Na]^+$.

22: Resa 75%. 1H -NMR (DMSO- d_6): δ 1.41 (m, 2H, C(O)O-CH-CH₂-CH₂), 1.60 (m, 2H, C(O)O-CH-CH₂), 3.03 (m, 2H, C(O)O-CH-CH₂-CH₂-CH₂), 3.83 (d, 2H, C(O)O-CH₂, $J = 5.86$ Hz), 4.66 (m, 1H, C(O)O-CH), 5.77 (m, 6H, NH₃), 7.46 (m, 2H, H_m, 2CH), 7.51 (m, 1H, H_p, CH), 7.88 (m, 2H, CH_o, 2CH), 8.70 (m, 1H, NH-C(O)O-Ph) ppm. ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 25.70 (C(O)O-CH-CH₂-CH₂), 28.08 (C(O)O-CH-CH₂-), 39.05 (C(O)O-CH-CH₂-CH₂-CH₂), 43.16 (C(O)O-CH₂), 52.88 (C(O)O-CH), 127.7 (C_m, 2CH), 128.8 (C_o, 2CH), 131.8 (C_p, CH), 134.6 (C_q-Ph), 166.9 (NH-C(O)O), 169.2 (Ph-C(O)O), 174.8 (2 -C(O)O-CH) ppm. ^{195}Pt -NMR (DMSO- d_6): δ 1649 ppm.

ESI-MS (modalità ioni positivi): 468.9 m/z; 469.1 m/z calcolato per $[M+Na]^+$.

2.11 Determinazione dei fattori di capacità $\log k'_0$

Per lo studio sperimentale della lipofilità sono stati considerati 53 complessi di Pt(IV) (Figura 2.3), dei quali sono stati determinati i valori di $\log k'_0$ mediante la tecnica RP-HPLC.

Il metodo utilizzato³⁴ prevede l'uso di una colonna C18 (250x3 mm, 5 μ m), miscele di acido formico 15 mM e MeOH come eluente (eluizione isocratica), flusso pari a 0.75 ml/min e rivelatore UV-Vis impostato a 210 nm.

Il metanolo viene usato in quanto è risultato essere il miglior modificatore organico per la fase mobile e poiché consente una buona eluizione dei complessi stessi senza coordinarsi al metallo, al contrario dell'acetonitrile^{8,35}

La composizione di eluente costituita da 70% di acido formico 15 mM e 30% di MeOH viene indicata in letteratura⁸ come una buona condizione per l'analisi HPLC di complessi di Pt(II) e, avendo questi ultimi proprietà simili in tali sistemi, possono essere adottate anche nel caso dei complessi di Pt(IV).

Il *range* di percentuali di MeOH testato in questo lavoro si estende dal 20% al 70%.

Per ciascun composto è stato quindi determinato il valore di $\log k'$ per i seguenti eluenti:

- ✓ 20% MeOH e 80% acido formico 15 mM
- ✓ 30% MeOH e 70% acido formico 15 mM
- ✓ 40% MeOH e 60% acido formico 15 mM
- ✓ 50% MeOH e 50% acido formico 15 mM
- ✓ 60% MeOH e 40% acido formico 15 mM
- ✓ 70% MeOH e 30% acido formico 15 mM

Osservando i cromatogrammi ottenuti è stato possibile notare come le condizioni di eluente al 20% e al 70% di MeOH siano condizioni limite: al di sotto del 20% si perde la linearità tra $\log k'$ e la percentuale di MeOH nell'eluente, mentre al di sopra del 70% i complessi meno lipofili tendono a coeluire con il composto di riferimento interno (KCl) utilizzato per determinare il tempo morto della colonna (t_0).

³⁴ O. Heudi, S. Mercier-Joberd, A. Cailleux, P. Allain, *Biopharm. Drug Dispos.*, 1999, 20, 107-116.

³⁵ M. El-Khateeb, T.G. Appleton, B.G. Charles, R.L. Gahan, *J. Pharm. Sci.*, 1999, 88, 319-326.

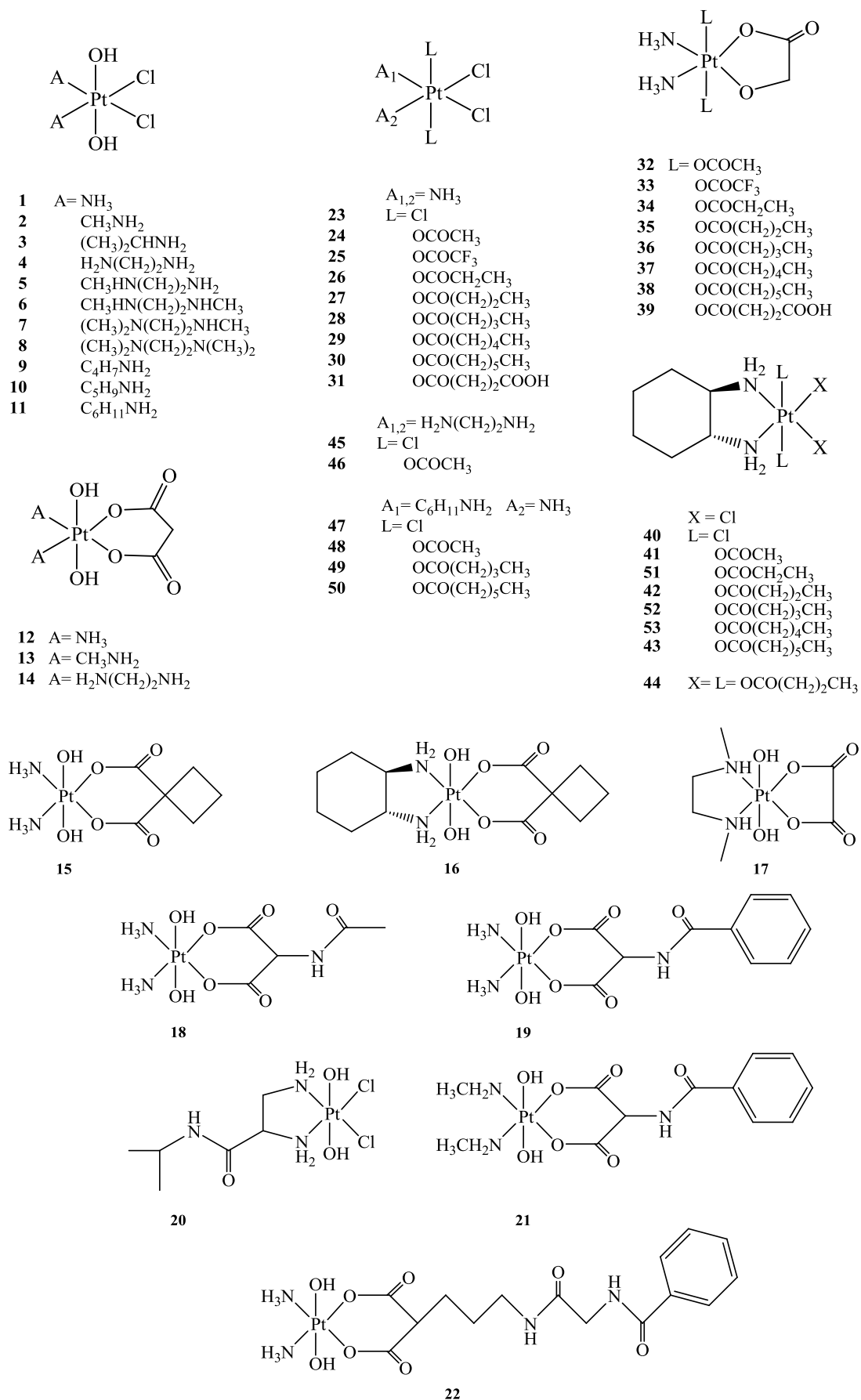


Figura 2.3 Complessi di Pt(IV) di cui è stato stimato il valore di logP_{o/w} mediante RP-HPLC

Infine, sono stati ottenuti i fattori di capacità $\log k'_0$ estrapolati allo 0% di MeOH (Tabella 2.1).

E' opportuno osservare che tali valori di $\log k'_0$, relativi all'intera serie di complessi di Pt(IV), ricoprono un ampio *range* di lipofilia (circa 8 unità logaritmiche).

Composto	$\log k'_0$^a	Composto	$\log k'_0$^a	Composto	$\log k'_0$^a
1	-0.97	19	0.23	37	2.29
2	-0.50	20	-0.56	38	3.53
3	0.64	21	0.98	39	-0.46
4	-0.90	22	0.58	40	-0.16
5	-0.75	23	-0.78	41	0.31
6	-0.55	24	-0.66	42	1.98
7	-0.24	25	0.37	43	5.11
8	-0.08	26	-0.25	44	3.83
9	1.20	27	0.68	45	-0.83
10	2.16	28	1.72	46	-0.51
11	2.84	29	2.94	47	1.34
12	-0.96	30	4.22	48	1.60
13	-0.75	31	-0.60	49	4.56
14	-0.89	32	-0.70	50	6.98
15	-0.50	33	-0.06	51	1.60
16	0.19	34	-0.32	52	3.70
17	-0.58	35	0.40	53	4.26
18	-0.63	36	1.29		

Tabella 2.1 Valori di $\log k'_0$ per i 53 complessi di Pt(IV) in esame. ^a Per i $\log k'_0$ dei complessi **23-53** vedere rif. 22

2.12 Modelli QSRR (Quantitative structure-retention relationship) a confronto³⁶

In un precedente lavoro¹ del gruppo di ricerca del Prof. Osella (UPO) valori di $\log k'_0$ dei complessi **23-53** erano stati predetti con successo da un modello QSRR (*Quantitative structure-retention relationship*) costruito utilizzando una serie limitata di

descrittori molecolari, calcolati con metodi quanto-meccanici (QM, *quantum-mechanical descriptors*).

Questi descrittori consideravano proprietà molecolari come il volume, l'area superficiale, l'energia degli orbitali di frontiera,

la *polar surface area* PSA (somma delle aree

superficiali sugli atomi di O e N, considerando anche gli H direttamente legati), il momento di dipolo e le cariche atomiche parziali (q). Questi parametri erano stati testati come potenziali descrittori molecolari per la costruzione di un modello statistico finalizzato alla determinazione del valore di $\log P_{o/w}$ attraverso metodi di regressione lineare multipla. L'analisi statistica multivariata di questi dati aveva portato ad una correlazione tra valori di $\log P_{o/w}$ e tre descrittori:

$$\log P_{o/w} = 2.57 (\pm 1.02) + 0.0204 (\pm 0.001)\mathbf{area} - 24.41 (\pm 3.45)\mathbf{maxq(H)} - 3.00 (\pm 0.61)\mathbf{q(Pt)}$$

dove **area** indica l'area totale superficiale, **maxq(H)** è la massima carica presente sull'idrogeno e **q(Pt)** è la carica sul platino.

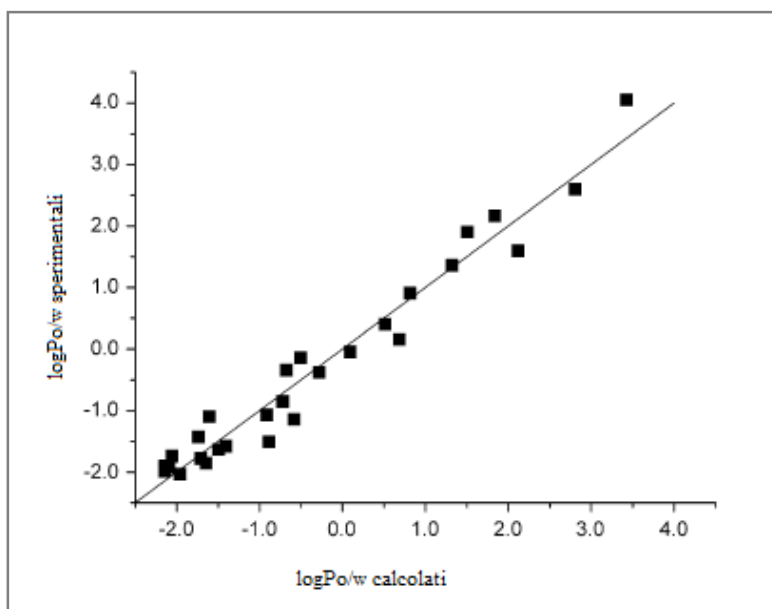


Figura 2.4 Correlazione tra $\log k'_0$ sperimentali e $\log k'_0$ calcolati per i complessi **23-53**

³⁶ G. Ermondi, G. Caron, M. Ravera, E. Gabano, S. Bianco, J. Platts, D. Osella, *Molecular Interaction Fields vs quantum-mechanical-based descriptors in the modelling of lipophilicity of platinum(IV) complexes*, Dalton Trans., 2013, 42, 3482-3489.

Questo approccio non ha però funzionato sui complessi **1-22**, dimostrato dall'analisi delle componenti principali, PCA, basata sul *set* di descrittori molecolari utilizzato.

Lo *score plot* (il grafico usato in PCA per mostrare la distribuzione delle molecole rispetto a PC1 e PC2, variabili dipendenti dai descrittori QM originali riportati in tabella 2.2) in Figura 2.5 mostra la presenza di due gruppi distinti (**1-22** e **23-53**) caratterizzati dalle due diverse tipologie di leganti assiali. La bassa correlazione ottenuta è quindi causata dalla maggiore eterogeneità del nuovo *training set*, dovuta alla presenza di leganti assiali di diversa natura (OH al posto di gruppi carbossilati) che allargano enormemente il dominio chimico delle molecole.

Questo risultato conferma che il *set* di descrittori molecolari QM (Tabella 2.2), precedentemente descritto, non è adatto a simulare il comportamento cromatografico dell'intera serie di complessi di Pt(IV).

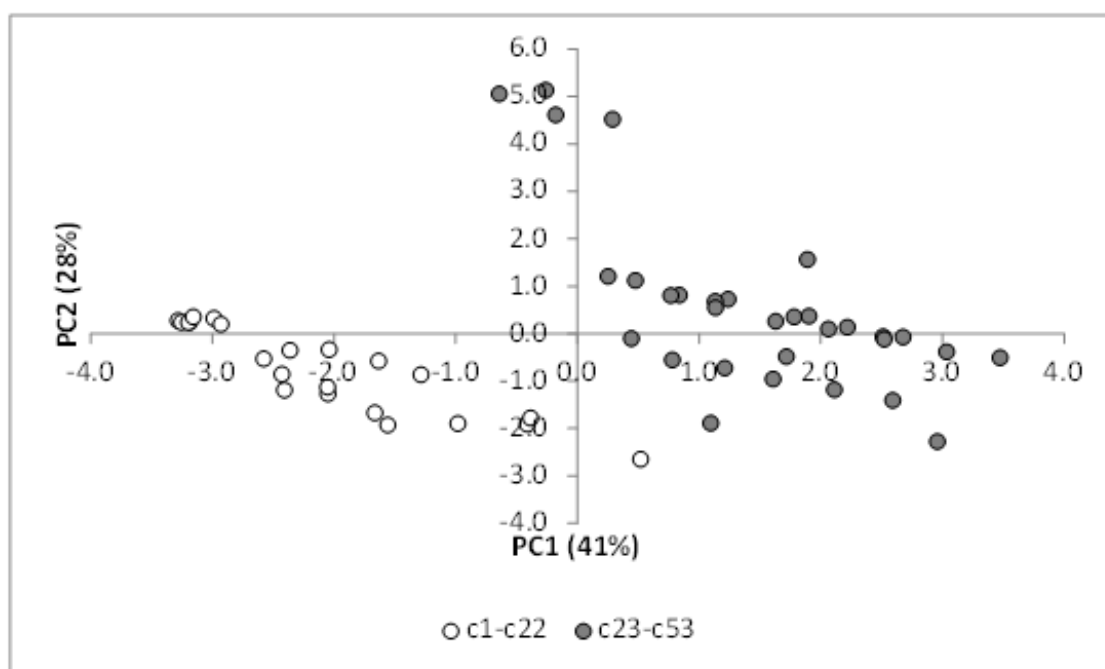


Figura 2.5 *Score plot* della PCA relativa ai descrittori QM (in parentesi la varianza % spiegata dalla singola PC).

Composto	Area (Å²)	Volume (Å³)	PSA (Å²)	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	Mol Wt (Da)	Dipole (D)	q(Pt) (e)	max q(H) (e)	min q (e)
1	185.25	126.82	118.85	- 9.16	- 1.26	334.06	8.79	0.852	0.348	- 0.802
2	218.41	167.21	82.597	- 9.08	- 1.06	362.12	9.11	0.845	0.348	- 0.829
3	285.45	239.68	78.039	- 8.94	- 0.93	418.22	9.74	0.858	0.347	- 0.836
4	200.85	154.64	84.646	- 9.03	- 1.01	360.10	10.71	0.857	0.350	- 0.809
5	215.40	174.47	71.866	- 8.94	- 0.94	374.13	10.75	0.851	0.350	- 0.815
6	228.63	194.05	56.490	- 8.89	- 0.86	388.15	10.75	0.850	0.349	- 0.815
7	239.87	211.88	47.201	- 8.76	- 0.82	402.18	10.76	0.835	0.349	- 0.822
8	250.45	229.84	37.965	- 8.63	- 0.78	416.21	10.81	0.821	0.346	- 0.810
9	301.71	258.22	73.888	- 8.97	- 0.97	442.25	9.67	0.860	0.350	- 0.817
10	337.44	292.12	78.835	- 8.94	- 0.92	470.30	9.63	0.859	0.348	- 0.811
11	365.42	323.98	77.315	- 8.96	- 0.92	498.35	9.90	0.859	0.348	- 0.836
12	213.68	163.58	165.26	- 9.68	- 1.21	365.20	10.45	1.036	0.349	- 0.823
13	246.36	204.50	127.03	- 9.55	- 1.05	393.25	11.32	1.013	0.350	- 0.824
14	232.25	192.60	136.74	- 9.47	- 1.12	391.24	13.58	1.027	0.353	- 0.829
15	252.88	208.56	160.72	- 9.55	- 1.08	405.27	9.74	1.036	0.346	- 0.840
16	321.18	296.50	127.05	- 9.22	- 0.89	485.40	13.40	1.029	0.352	- 0.838

17	250.24	214.90	111.12	- 9.36	- 1.07	405.27	14.65	0.995	0.347	- 0.824
18	270.26	215.79	188.82	- 9.70	- 1.27	422.25	7.37	1.023	0.355	- 0.834
19	327.11	280.88	188.82	- 9.86	- 1.47	484.32	14.08	1.028	0.351	- 0.824
20	292.89	242.81	109.11	- 8.87	- 0.97	445.21	14.28	0.856	0.351	- 0.817
21	360.50	321.72	150.70	- 9.74	- 1.32	512.38	14.97	1.008	0.351	- 0.826
22	425.10	386.61	211.35	- 9.53	- 1.55	583.46	16.61	1.030	0.349	- 0.821
23	178.17	195.50	66.290	- 9.68	- 2.31	370.96	10.48	0.668	0.260	- 0.414
24	230.45	264.55	112.89	- 9.93	- 1.89	418.15	5.74	0.881	0.278	- 0.742
25	253.21	301.73	110.50	- 10.30	- 2.54	526.09	9.74	0.897	0.273	- 0.705
26	267.24	308.05	112.51	- 9.87	- 1.84	446.20	5.56	0.876	0.279	- 0.754
27	300.85	351.92	96.710	- 9.84	- 1.83	474.25	5.40	0.877	0.279	- 0.756
28	340.79	397.29	112.11	- 9.85	- 1.84	502.31	5.42	0.877	0.279	- 0.756
29	376.10	439.27	112.10	- 9.84	- 1.83	530.36	5.49	0.877	0.279	- 0.756
30	410.15	481.69	112.01	- 9.85	- 1.83	558.41	5.54	0.877	0.279	- 0.757
31	330.87	387.24	181.87	- 10.09	- 2.03	534.22	6.17	0.866	0.343	- 0.738
32	241.92	279.88	149.41	- 9.74	- 1.61	421.28	6.08	1.021	0.268	- 0.741
33	266.82	324.19	142.16	- 10.06	- 2.43	529.22	10.36	1.061	0.269	- 0.697
34	269.71	323.45	151.66	- 9.60	- 1.58	449.33	5.52	1.039	0.265	- 0.766
35	298.62	364.64	150.66	- 9.58	- 1.56	477.38	5.17	1.037	0.265	- 0.760
36	331.54	406.41	149.60	- 9.58	- 1.55	505.44	5.35	1.038	0.267	- 0.763

37	370.73	451.57	149.95	- 9.58	- 1.55	533.49	5.26	1.038	0.267	- 0.761
38	410.42	496.34	149.98	- 9.58	- 1.55	561.54	5.35	1.037	0.267	- 0.761
39	336.10	395.13	201.06	- 9.64	- 1.62	537.35	6.09	1.004	0.347	- 0.764
40	248.93	296.04	37.430	- 9.40	- 2.01	451.09	14.58	0.674	0.267	- 0.422
41	302.80	367.43	82.540	- 9.66	- 1.61	498.28	9.11	0.875	0.275	- 0.739
42	367.51	452.19	80.040	- 9.57	- 1.57	554.38	7.95	0.882	0.276	- 0.749
43	471.30	588.10	79.840	- 9.57	- 1.57	638.54	7.98	0.882	0.276	- 0.750
44	482.06	614.14	112.50	- 9.39	- 1.03	657.67	4.99	1.049	0.293	- 0.761
45	196.24	223.82	38.240	- 9.51	- 2.12	397.00	13.18	0.670	0.267	- 0.421
46	248.06	294.91	83.280	- 9.75	- 1.71	444.18	7.72	0.872	0.276	- 0.741
47	255.62	308.90	46.140	- 9.47	- 2.08	453.11	12.15	0.670	0.265	- 0.426
48	307.87	378.33	89.090	- 9.75	- 1.68	500.29	7.53	0.879	0.276	- 0.745
49	423.10	513.22	88.640	- 9.69	- 1.65	584.45	7.14	0.874	0.277	- 0.755
50	500.45	597.92	88.610	- 9.68	- 1.65	640.56	7.06	0.874	0.276	- 0.755
51	335.17	409.61	82.120	- 9.59	- 1.58	526.33	8.80	0.869	0.275	- 0.749
52	410.44	496.40	80.480	- 9.57	- 1.58	582.44	8.78	0.871	0.275	- 0.751
53	446.75	537.11	80.450	- 9.56	- 1.57	610.49	8.75	0.871	0.274	- 0.751

Tabella 2.2 Valori dei descrittori QM (MOPAC2009) per tutti i complessi di Pt(IV).

Grazie alla collaborazione con il Prof. Ermondi e la dott.ssa Caron, un risultato completamente diverso è stato ottenuto utilizzando un nuovo *set* di descrittori molecolari basato sui campi molecolari 3D, ovvero i descrittori VolSurf.^{37,38}

Dato che la maggior parte dei descrittori VolSurf rappresenta la polarità e l'idrofobicità delle molecole, essi sono generalmente impiegati nel *modelling* dei parametri di lipofilicità³⁹. Precedenti studi hanno infatti dimostrato come robusti modelli QSRR (*Quantitative structure-retention relationship*) basati sui descrittori VolSurf siano normalmente usati nella determinazione del $\log P_{o/w}$ ^{40,41}.

In questo caso particolare sono stati utilizzati i seguenti *probes*: acqua (OH₂), *probe* idrofobico (DRY), donatore di legami H (HBD, ammidi N1) e accettore di legami H (HBA, carbonile O).

La PCA relativa all'impiego di questa nuova serie di descrittori tridimensionali conferma l'adattabilità del metodo all'intera serie di Pt(IV) presa in esame (Figura 2.6).

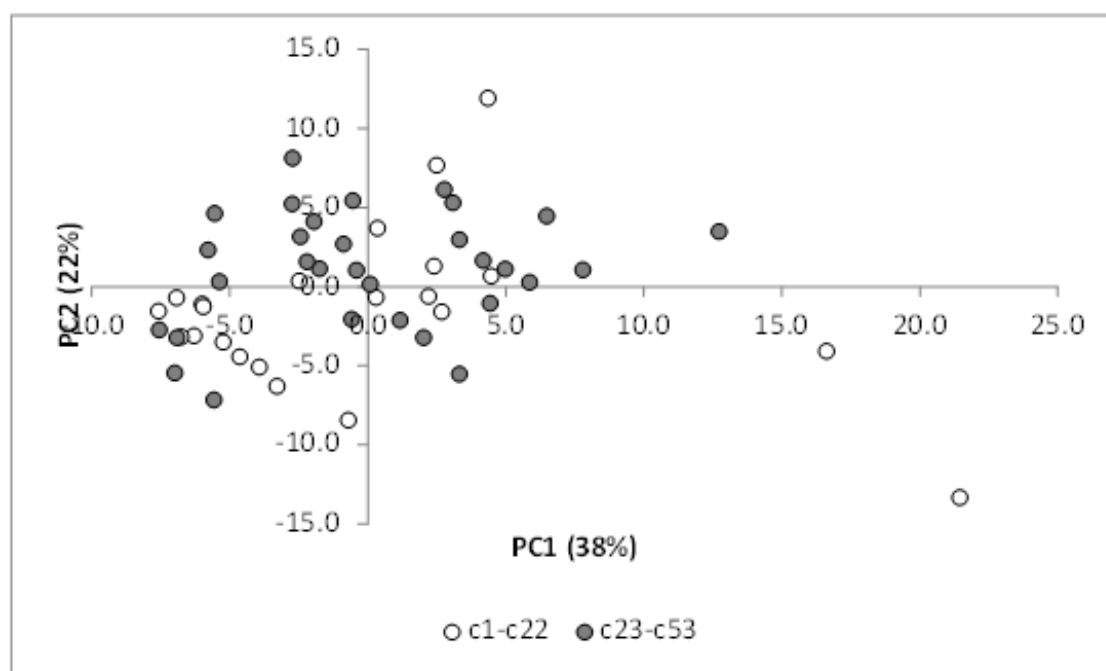


Figura 2.6 Score plot della PCA relativa ai descrittori VolSurf (in parentesi la varianza % spiegata dalla singola PC).

³⁷ G. Cruciani, P. Crivori, P. A. Carrupt and B. Testa, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, 2000, 503, 17.

³⁸ P. Crivori, G. Cruciani, P. A. Carrupt and B. Testa, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 2204.

³⁹ G. Caron and G. Ermondi, in *Comprehensive Medicinal Chemistry*, ed. B. Testa and H. van de Waterbeemd, Elsevier, Oxford, 2nd edn, 2006, vol. 5, pp. 425–452.

⁴⁰ G. Caron, M. Ravera and G. Ermondi, *Pharm. Res.*, 2011, 28, 640.

⁴¹ G. Ermondi and G. Caron, *J. Chromatogr.*, 2012, 1252, 84.

Come esempio in Figura 2.7 e 2.8 è mostrata l'applicazione di due dei 92 descrittori VolSurf, ottenuti dai *probes* DRY e OH₂, sul complesso **15**. Si può notare come l'involucro molecolare stabilisca un'interazione attrattiva con il *probe* OH₂ a - 5.0 kcal/mol e con il *probe* DRY a - 0.2 kcal/mol.

E' stata inoltre ricavata una relazione tra $\log k'_0$ e i descrittori VolSurf mediante la tecnica di regressione ai minimi quadrati parziali, PLS. In questo modello a 3 variabili latenti (3LV) le componenti principali spiegano il 90% della variabilità totale ($R^2 = 0.92$) mentre il RMSE (*Root Mean Square Error*) è 0.3. Per la validazione è stata utilizzata la procedura di *Leave-one-out*, LOO, che ha indicato una buona capacità predittiva del modello ($Q^2(\text{LOO}) = 0.87$).

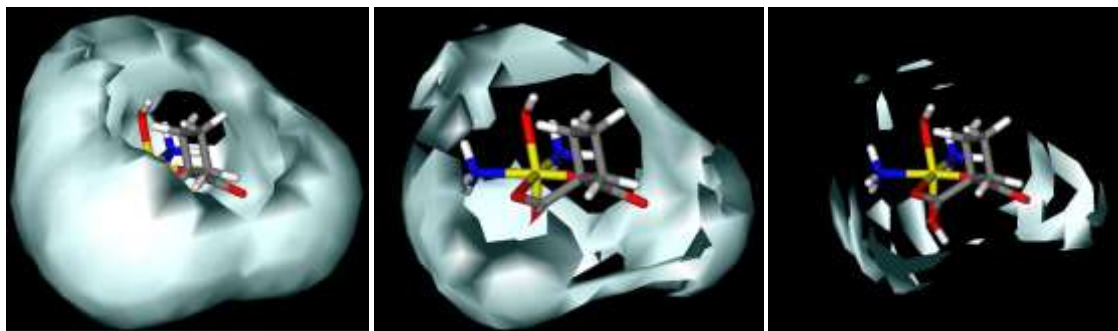


Figura 2.7 Parametrizzazione del complesso **15** nel campo di interazione molecolare, ottenuta con il *probe* OH₂ rispettivamente a -1.0, -3.0 e -5.0 kcal/mol.

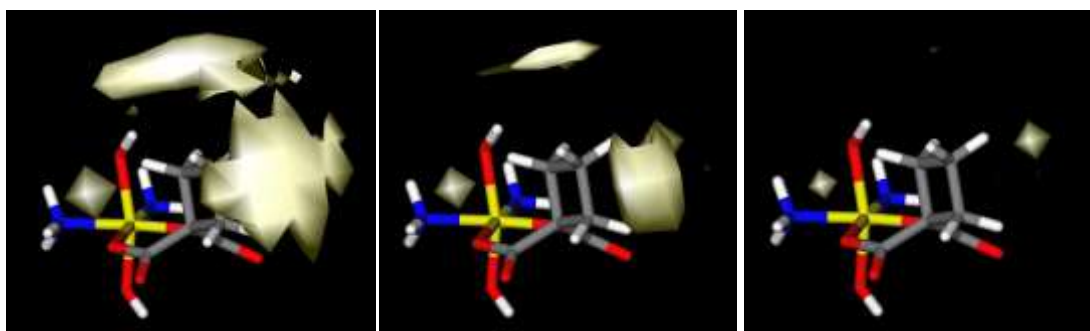


Figura 2.8 Parametrizzazione del complesso **15** nel campo di interazione molecolare, ottenuta con il *probe* DRY rispettivamente a -0.2, -0.4 and -0.6 kcal/mol.

La validazione di un modello permette di individuarne la complessità ottimale che ne massimizza la capacità predittiva, intendendo per complessità il numero delle variabili predittive. Il modello deve possedere caratteristiche di stabilità che lo rendano sufficientemente indipendente dai particolari dati che sono stati utilizzati per la sua costruzione. La struttura di un modello deve sempre essere controllata mediante

tecniche di validazione che consentano di valutare la presenza di *overfitting* e di ottimizzare la capacità di predizione del modello stesso.

In generale, la validazione di un modello viene effettuata nel seguente modo: una parte dei dati originali viene utilizzata per costruire il *training set* (fase di *learning*), mentre la parte restante viene utilizzata per costruire il *test set* (fase di valutazione). L'insieme dei dati che costituiscono il *test set* non deve essere utilizzato per la costruzione del modello. Le tecniche di validazione differiscono tra di loro per il modo con cui viene ripartito il *data set* di partenza nei due set di *training* e di *test*.

Con il metodo *Leave-one-out*, partendo da un *data set* contenente n oggetti, vengono calcolati n modelli, in ognuno dei quali viene escluso un oggetto differente ogni volta. La fase di apprendimento viene quindi condotta con n *training sets* che contengono $n-1$ oggetti, mentre l'oggetto escluso viene utilizzato nel *test set* per valutare la capacità predittiva del modello $n-1$ considerato. Al fine di stimare un parametro che sia effettivamente in relazione con il potere predittivo del modello, lo scarto tra la risposta sperimentale e quella predetta viene accumulato per tutti gli n oggetti che sono stati esclusi a turno dal modello. Normalmente, il modello finale effettivo viene sempre calcolato con tutti gli n oggetti a disposizione, in modo tale da poter sfruttare tutta l'informazione contenuta in tutti questi dati. Il metodo di validazione *Leave-one-out* di solito è quello che comporta la minore perturbazione del sistema proprio per la sua caratteristica di calcolare ognuno dei modelli utilizzando $n-1$ oggetti del *data set*.

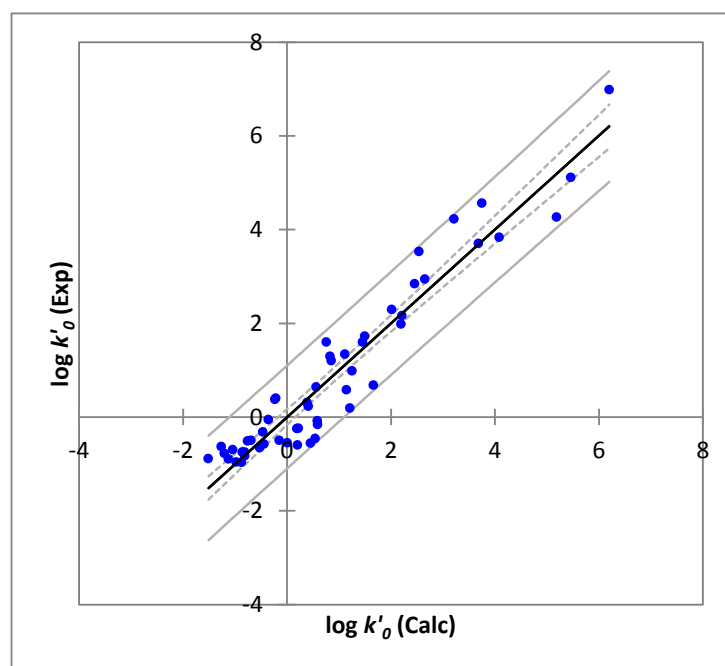


Figura 2.9 Correlazione tra $\log k'_0$ sperimentali (Exp) e calcolati (Calc) per i 53 complessi di Pt(IV)

La retta di correlazione tra valori di $\log k'_0$ sperimentali e calcolati (Figura 2.9) trovata mostra una pendenza di circa 1 ed un'intercetta a 0 che conferma l'ottima corrispondenza

Il principale svantaggio dell'impiego di un modello PLS consiste nella difficoltà di interpretazione dei dati dal punto di vista chimico. Per superare questo limite viene spesso utilizzato il valore di VIP (*Variable Importance of Projection*)⁴².

I VIPs evidenziano i descrittori più importanti nel modello ed il segno dei coefficienti nel modello PLS indica il loro contributo, positivo o negativo, sulla variabile in esame.

L'approccio utilizzato si basa sul concetto di “blocchi di descrittori”: l'importanza di ciascun “blocco” viene espressa da uno specifico parametro BR (*Block Relevance*).

I descrittori utilizzati in questo lavoro sono stati classificati in sei blocchi:

- 7 descrittori che caratterizzano la dimensione e la forma della molecola (**Size**);
- 23 descrittori che descrivono le interazioni tra molecola e ambiente acquoso circostante (**Water**);
- 15 descrittori che mostrano la propensione a formare legami ad idrogeno con i gruppi donatori del *probe* (**HBD**);
- 15 descrittori che esprimono l'abilità a formare legami idrogeno con i gruppi accettori del *probe* (**HBA**);
- 16 descrittori che descrivono la propensione a formare interazioni idrofobiche (**DRY**);
- 16 descrittori che mostrano il rapporto tra regioni idrofiliche e idrofobiche (**Others**).

I valori di BR vengono definiti come il rapporto della somma dei quadrati dei VIPs di un dato gruppo di descrittori ed il numero totale di essi:

$$BR_i = \frac{\sum_j VIP^2}{N_i}$$

In Tabella 2.3 sono elencati tutti i “blocchi” utilizzati nel modello PLS ed i relativi parametri BR per i valori di $\log k'_0$ presi in esame.

⁴² G. Caron and G. Ermondi, *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 3269.

Block	N° Descriptors	BR
Size	7	3.24
Water	23	0.74
DRY	16	1.46
HBA	15	0.35
HBD	15	0.58
Others	16	0.94

Tabella 2.3 Parametri BR del modello PLS per i valori di $\log k'_0$ in esame

E' possibile notare come i valori di $\log k'_0$ siano fortemente influenzati dai descrittori del blocco *size* (BR = 3.24).

Al fine di considerare anche il segno del coefficiente nel PLS, il parametro BR viene distinto in BR(+), relativo alla ritenzione nella fase stazionaria, e BR(-) per quella nella fase mobile. Un coefficiente positivo indica che un aumento del blocco dei descrittori considerati causa un aumento del valore di $\log k'_0$ (come anche la ritenzione nella fase stazionaria).

Come si può notare dal *trend* dei valori di BR (Figura 2.10), l'importanza del blocco *size* e dei descrittori idrofobici (**DRY**) indicano che la lipofilicità di questi complessi è dovuta alla natura dei leganti piuttosto che alle proprietà del centro metallico.

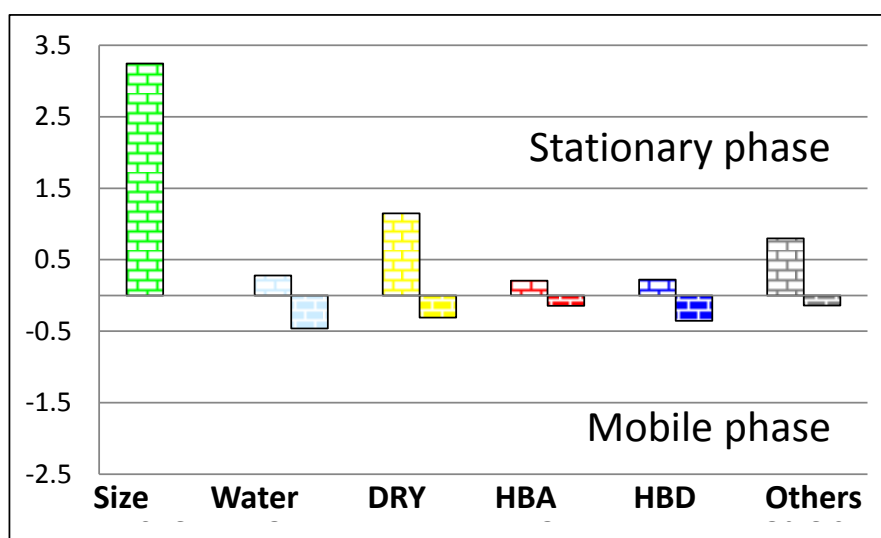


Figura 2.10 BR(+) e BR(-) per il modello PLS dei valori di $\log k'_0$

2.13 Conclusioni

In questa prima parte del lavoro di tesi è stato condotto uno studio sulla lipofilicità di una serie di 53 composti di Pt(IV) aventi diversi leganti assiali.

Dapprima sono stati determinati i coefficienti di ripartizione $\log P_{o/w}$ e di $\log k'_0$ di 22 complessi di Pt(IV)-diidrosso mediante la tecnica RP-HPLC. Questi valori di $\log k'_0$ sono stati integrati a quelli ottenuti per una serie di 31 composti di Pt(IV) già pubblicati¹, ottenendo un *range* di lipofilia molto ampio (circa 8 unità logaritmiche) utile per la formulazione di un modello predittivo valido.

I risultati ottenuti mostrano come i modelli convenzionali basati su descrittori molecolari quanto-meccanici estratti da sistemi PM6 semiempirici non sono adatti al *modelling* di un così ampio *dataset*.

Al contrario, la procedura computazionale che utilizza il *software* VolSurf, basata su descrittori molecolari 3D, è riuscita a formulare un modello che permette di predire i valori di lipofilicità dell'intera serie di complessi di Pt(IV) con buona accuratezza. Tale modello evidenzia inoltre le proprietà molecolari che maggiormente influenzano la lipofilicità, mostrando come le interazioni idrofobiche, la dimensione e la forma delle molecole giochino un ruolo fondamentale.

Questo studio ha confermato la superiorità dei descrittori Volsurf su quelli classici quanto-meccanici per quanto concerne il *modelling* dei complessi di Pt(IV), e potrebbe rappresentare un potenziale ottimo strumento per la formulazione di modelli predittivi per i complessi dei metalli di transizione in generale.

Capitolo 3

Sintesi di nuovi
pro-farmaci antitumorali di
Pt(IV)

3.1 Descrizione del lavoro

La seconda parte di questo lavoro di tesi ha riguardato la sintesi e la caratterizzazione di due serie di complessi di Pt(IV) aventi formula generale $[PtA_2Cl_2L_2]$, dove $A = 2xNH_3$ (serie **1**) oppure 1R,2R(-)-1,2-diamminocicloesano, dach, (serie **2**) e $L =$ legante carbossilato aromatico con *spacer* $-(CH_2)_n-$ di varia lunghezza ($n = 0, 1, 2$).

Le due serie di complessi di Pt(IV) risultano numericamente limitate a causa della crescente scarsa solubilità in acqua dei composti, che comprometterebbe la significatività dei test biologici.

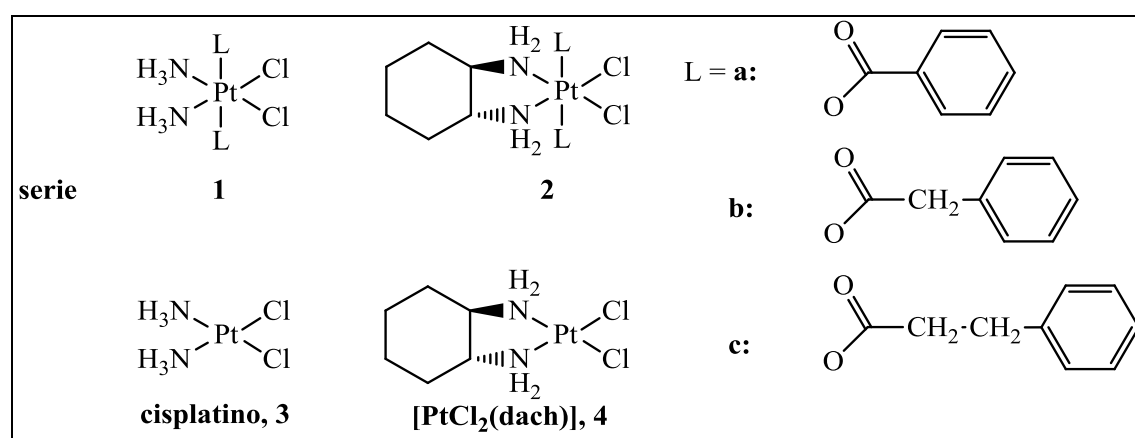


Figura 3.1 Complessi di Pt(IV) sintetizzati e rispettivi composti di Pt(II)

La sintesi del complesso **1a** è stata ripresa dalla letteratura⁴³ e gli altri composti sono stati preparati adottando questo metodo. Questi 6 complessi di Pt(IV) sono stati tutti caratterizzati mediante spettroscopia NMR, spettrometria ESI-MS e cromatografia RP-HPLC e per alcuni di essi è stato possibile ottenere cristalli adatti per un'analisi diffrattometrica.

Successivamente sono state studiate le loro caratteristiche chimico-fisiche e sono stati condotti alcuni test *in vitro* per valutare la loro attività antiproliferativa.

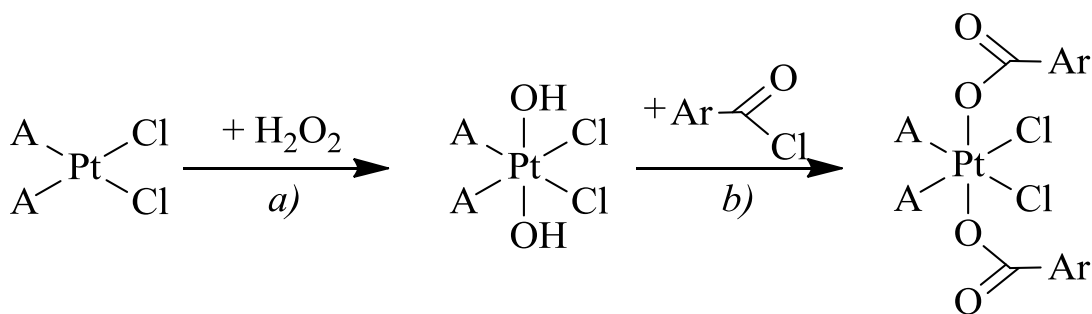
⁴³ W.H. Ang, S. Pilet, R. Scopelliti, F. Bussy, L. Juillerat-Jeanneret, P. Dyson, *Synthesis and characterization of Pt(IV) anticancer drugs with functionalized aromatic carboxylate ligands: influence of the ligands on drugs efficacies and uptake.*, J. Med. Chem., 2005, 48, 8060-8069.

3.2 Strategia di sintesi e caratterizzazione

La sintesi dei 6 complessi di Pt(IV), oggetto di studio, passa attraverso la formazione dei corrispondenti composti di Pt(II), a partire da $K_2[PtCl_4]$, e la loro successiva ossidazione con H_2O_2 a Pt(IV)-diidrosso. Tutti i dettagli sintetici sono stati riportati nel capitolo 2.

I complessi di Pt(IV) sono stati caratterizzati mediante spettroscopia NMR, spettrometria ESI-MS e cromatografia RP-HPLC (Paragrafo 2.10). Inoltre, per i composti **1b** e **2a** è stato possibile risolvere le strutture attraverso la tecnica di diffrazione dei raggi X. I cristalli sono stati ottenuti per lenta evaporazione di una soluzione satura del complesso in MeOH e le analisi di diffrazione dei raggi X sono state condotte dal prof. Giorgio Pelosi, presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Parma. Per le misure è stato utilizzato un rifrattometro SMART APEX2 [$\lambda(\text{Mo-K}\alpha) = 0.71073 \text{ \AA}$].

3.2.1 Sintesi dei complessi di Pt(IV) con carbossilati aromatici



In questa successiva fase di sintesi i complessi di Pt(IV)-diidrosso, il *cis,cis,trans*- $[PtCl_2(NH_3)_2(OH)_2]$ e il *cis,cis,trans*- $[PtCl_2(\text{dach})(OH)_2]$, vengono fatti reagire con tre cloruri acilici attraverso una reazione di sostituzione nucleofila sul gruppo carbossilico, che sfrutta il carattere nucleofilo degli ossidrilici coordinati al centro metallico.

E' necessario lavorare in presenza di piridina per neutralizzare l'acido cloridrico che si forma durante la reazione.

Procedura di sintesi di *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)_nCO₂)₂Cl₂(NH₃)₂] con *n* = 0, 1, 2

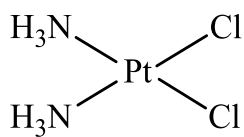
Ad una sospensione di *cis,cis,trans*-[PtCl₂(NH₃)₂(OH)₂] (100 mg, 0.30 mmol) in acetone (3 mL) e piridina (1 mL) vengono aggiunti goccia a goccia 0.90 mL di cloruro di benzoile (o 1.03 mL di cloruro di 2-feniletanoile o 1.16 mL di cloruro di 3-fenilpropanoile) in acetone (5 mL).

La miscela di reazione viene mantenuta a refluxo (circa 75° C) in agitazione magnetica per 4 ore. Successivamente a tale sospensione viene aggiunto un eccesso di esano (10 mL) ed il precipitato ottenuto viene isolato per filtrazione, triturato in etere dietilico (10 mL) e lavato con H₂O per eliminare il sale di piridinio formatosi durante la reazione.

Tale prodotto viene infine ricristallizzato utilizzando una miscela di THF (5 mL) e pentano (20 mL); si ottiene una polvere bianca che viene raccolta ed asciugata in corrente d'aria anidra.

Le rese vanno dal 30 al 45%.

3.2.2 Caratterizzazione di *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], 3



RP-HPLC

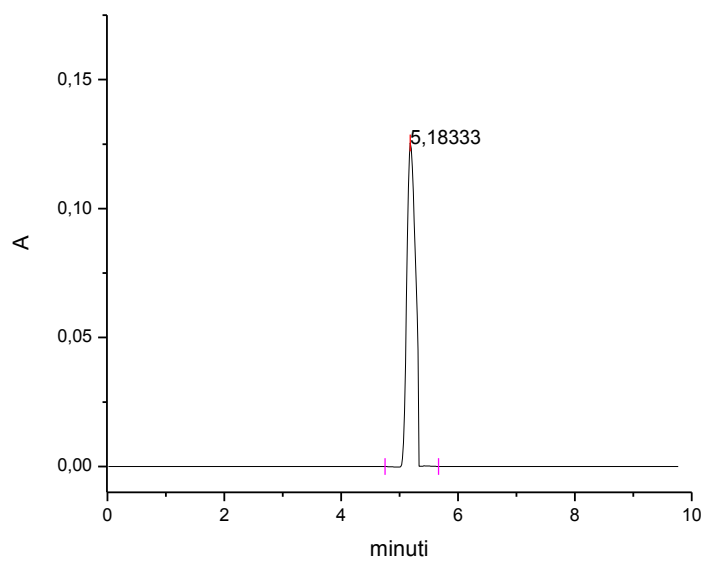


Figura 3.2 Cromatogramma del complesso *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]

ESI-MS

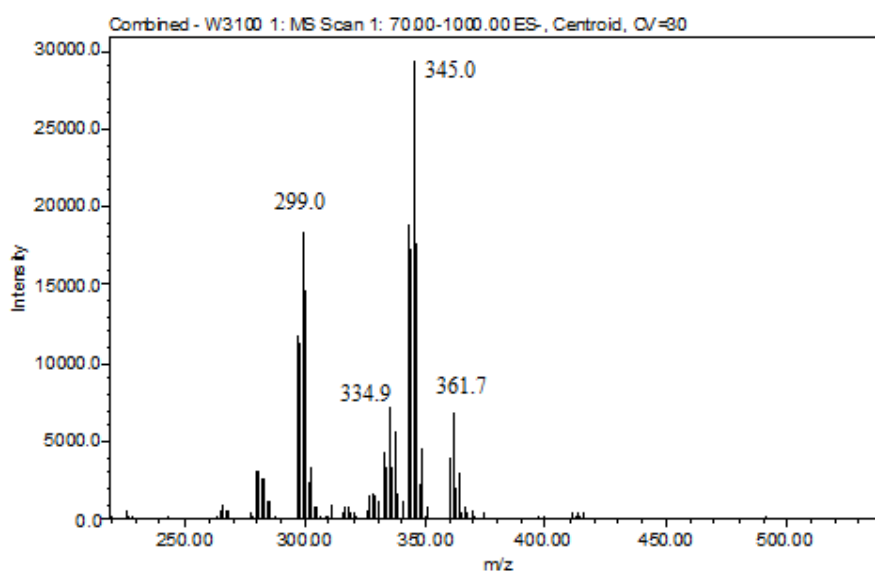


Figura 3.3 Spettro di massa, in modalità ioni negativi, del complesso *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]

Dallo spettro ESI-MS, eseguito in modalità ioni negativi, è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[M-H]^-$ con valore di $m/z = 299.0$, il quale mostra il pattern isotopico tipico del platino. Sono inoltre presenti altri 3 picchi a $m/z = 334.9$, 345.0 e 361.7 attribuibili ad addotti del complesso stesso formati nel corso del processo di frammentazione, rispettivamente $[M+OH]^-$, $[M+HCO_2]^-$ e $[M+NO_3]^-$.

^{195}Pt -NMR

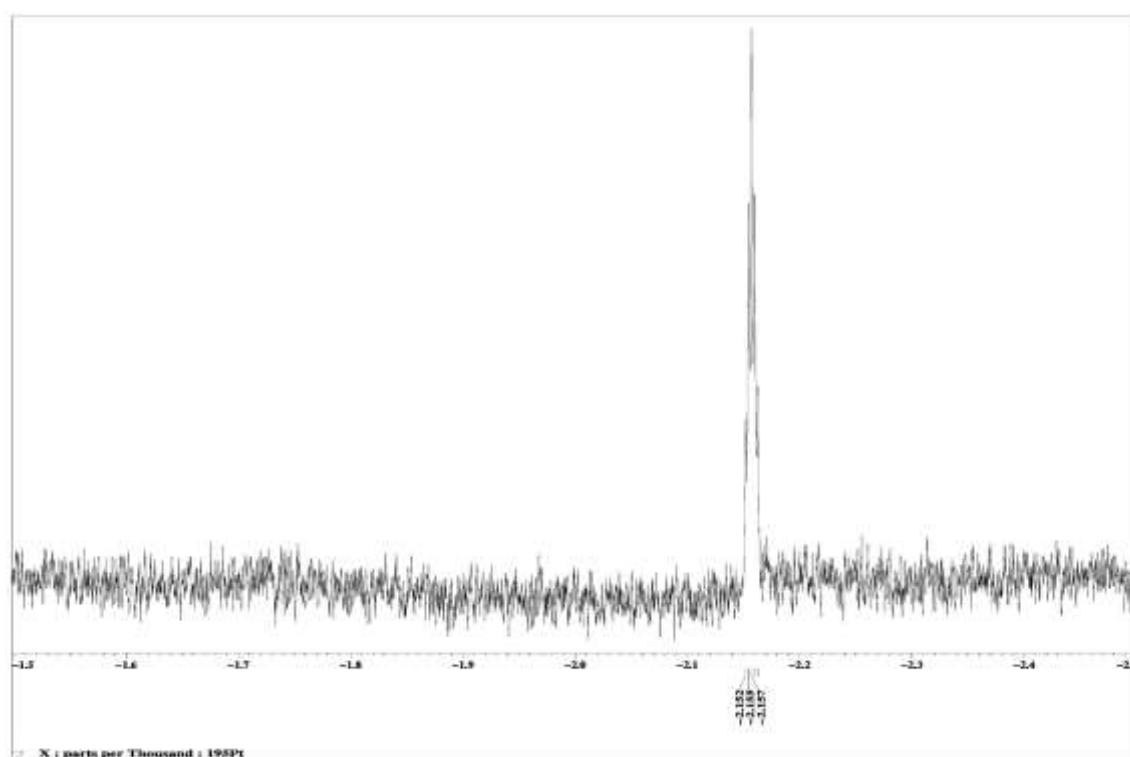


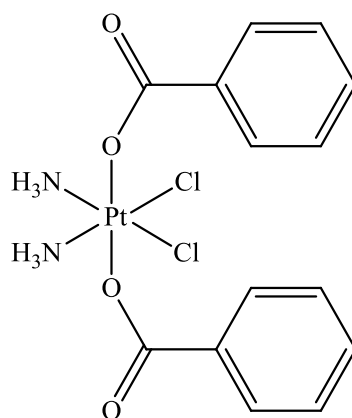
Figura 3.4 Spettro ^{195}Pt -NMR del complesso *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ in DMSO-d_6

Dallo spettro ^{195}Pt -NMR, eseguito in DMSO-d_6 , è possibile osservare la presenza di un unico segnale a -2155 ppm, relativo al complesso in esame, in accordo con i dati di letteratura⁴⁴. Si noti che il segnale risulta abbastanza largo a causa dell'accoppiamento con ^{14}N , nucleo quadrupolare che induce CSA.

Il segnale del complesso è un quintupletto sufficientemente risolto con $^1J = 230$ Hz, dovuto all'accoppiamento del ^{195}Pt ($I = 1/2$) con due atomi di ^{14}N ($I = 1$).

⁴⁴ E. Gabano, E. Marengo, M. Bobba, C. Cassino, M. Botta, D. Osella, ^{195}Pt -NMR spectroscopy: a chemiometric approach, *Coord Chem Rev*, 250 (2006) 2158-2174

3.2.3 Caratterizzazione di *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅CO₂)₂Cl₂(NH₃)₂], **1a**



RP-HPLC

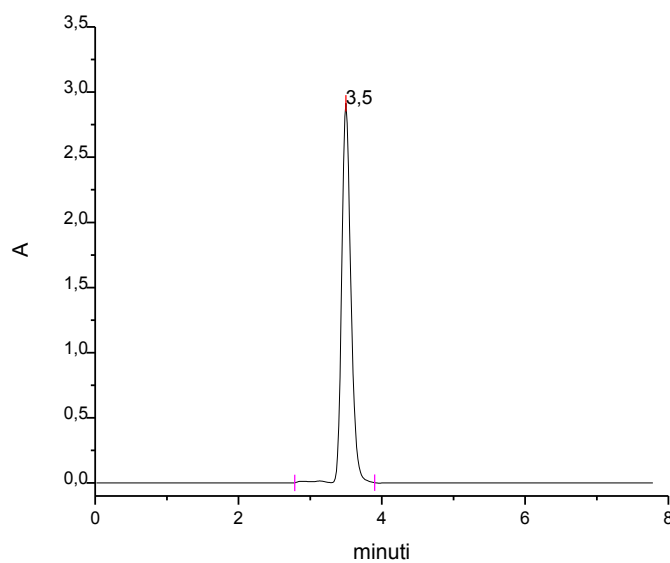


Figura 3.5 Cromatogramma del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅CO₂)₂Cl₂(NH₃)₂]

La purezza del complesso di Pt(IV) sintetizzato (99.8 %) è stata verificata mediante tecnica RP-HPLC. Il cromatogramma ottenuto utilizzando come eluente una miscela di acido formico (15 mM) e MeOH (in rapporto 30:70) mostra un unico picco a 3.50 minuti.

ESI-MS

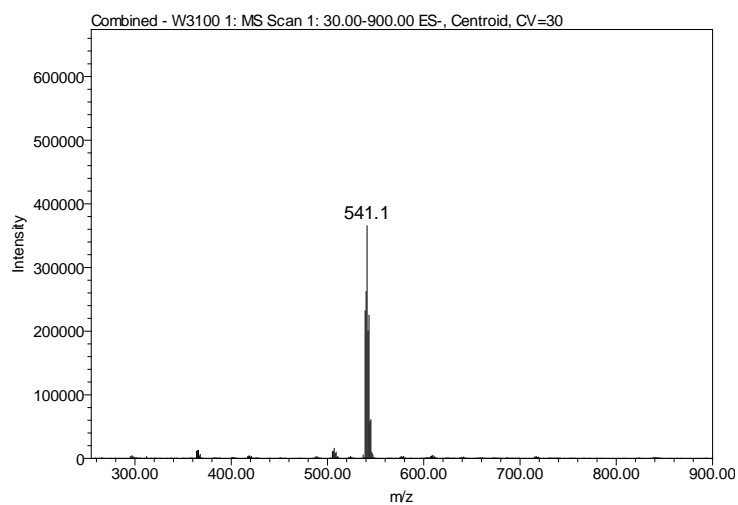


Figura 3.6 Spettro di massa, registrato in modalità ioni negativi, del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$

Dallo spettro ESI-MS, eseguito in modalità ioni negativi, è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[\text{M}-\text{H}]^-$ con valore di $m/z = 541.1$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico del platino.

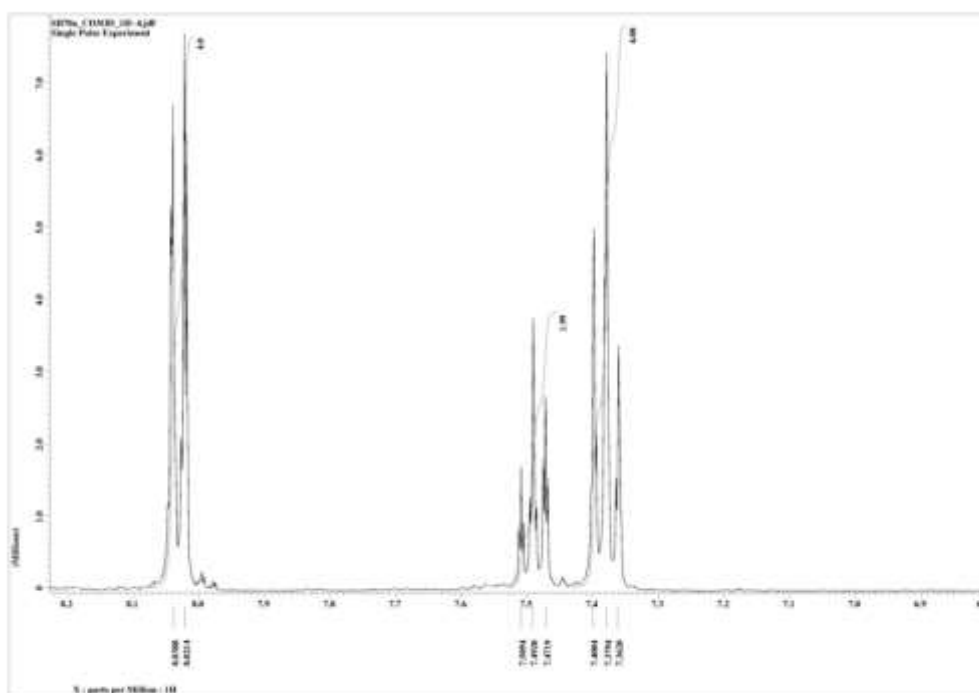
 ^1H -NMR

Figura 3.7 Spettro ^1H -NMR del complesso *trans-cis-cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$

Gli spettri NMR sono stati tutti eseguiti in CD₃OD. Si riporta di seguito l'assegnazione.
¹H-NMR (CD₃OD): δ 7.379 (t, 4H, *H_m*, ³J = 7.69 Hz), 7.492 (t, 2H, *H_p*, ³J = 7.32 Hz), 8.031 (d, 4H, *H_o*, ³J = 8.26 Hz) ppm.

¹³C-NMR

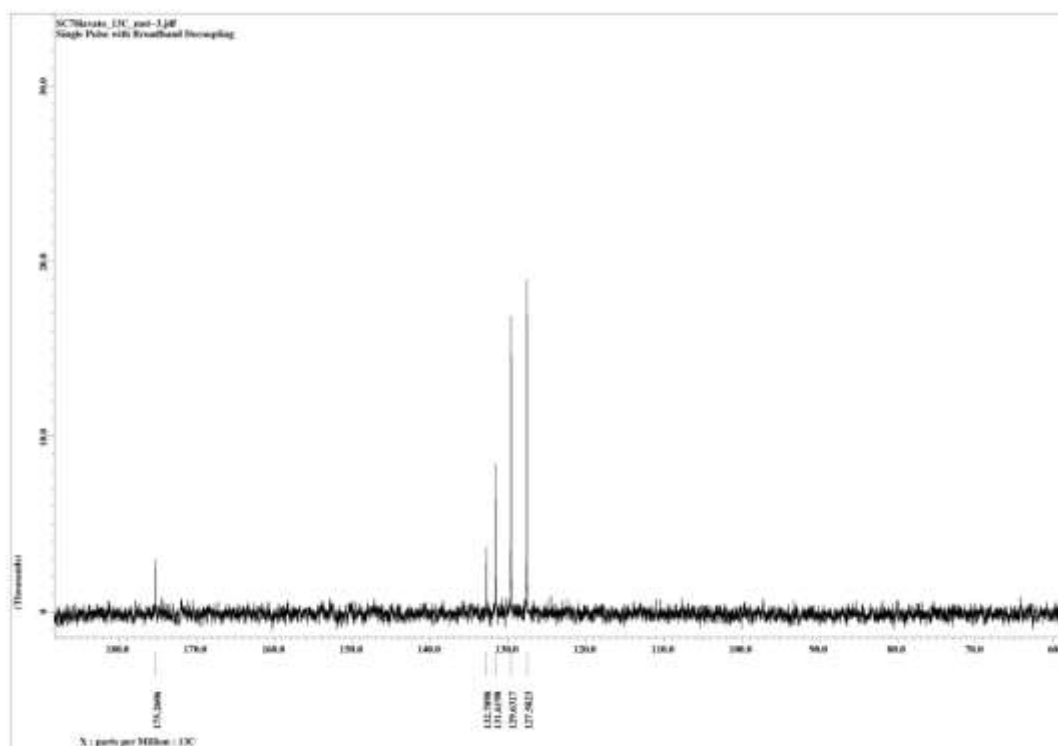


Figura 3.8 Spettro ¹³C-NMR del complesso *trans-cis-cis*-[Pt(C₆H₅CO₂)₂Cl₂(NH₃)₂]

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 127.5 (*C_m*), 129.6 (*C_o*), 131.6 (*C_p*), 132.8 (*C_q*), 175.3 (*C(O)O*) ppm.

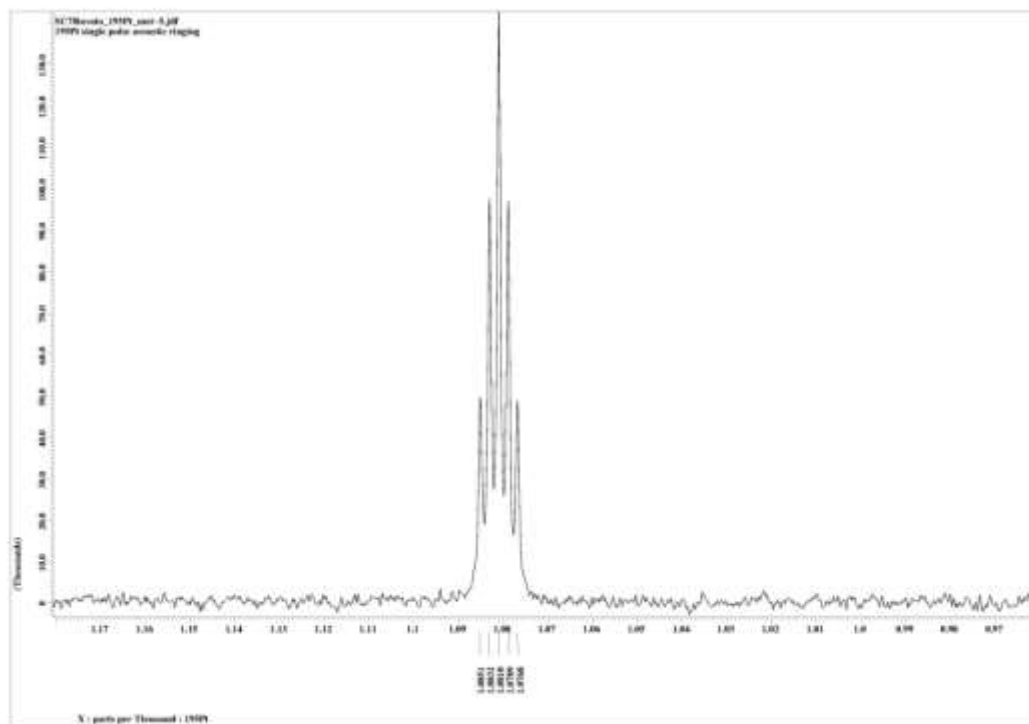
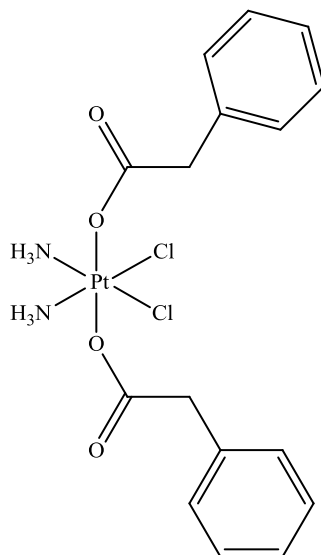
^{15}Pt -NMR

Figura 3.9 Spettro ^{13}C -NMR del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$

^{15}Pt -NMR (CD_3OD): δ 1079 ppm.

3.2.4 Caratterizzazione del *trans,cis,cis*- $[Pt(C_6H_5(CH_2)CO_2)_2Cl_2(NH_3)_2]$, **1b**



RP-HPLC

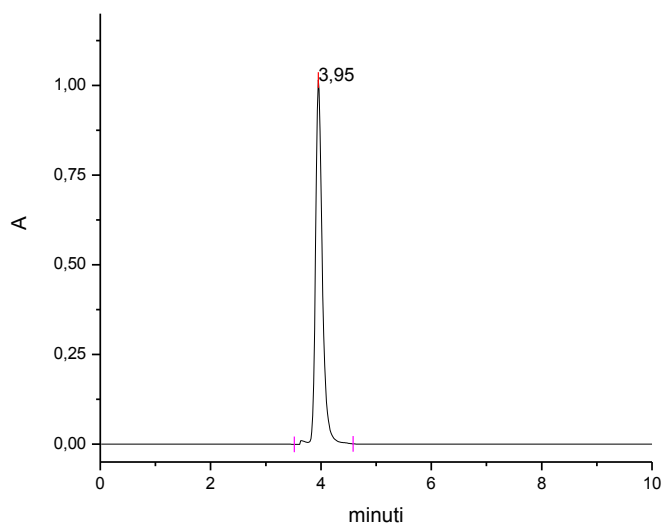


Figura 3.10 Cromatogramma del complesso *trans,cis,cis*- $[Pt(C_6H_5(CH_2)CO_2)_2Cl_2(NH_3)_2]$

La purezza del complesso di Pt(IV) sintetizzato (98.2 %) è stata verificata mediante tecnica RP-HPLC. Il cromatogramma ottenuto utilizzando come eluente una miscela di acido formico (15 mM) e MeOH (in rapporto 30:70) mostra un unico picco a 3.95 minuti.

ESI-MS

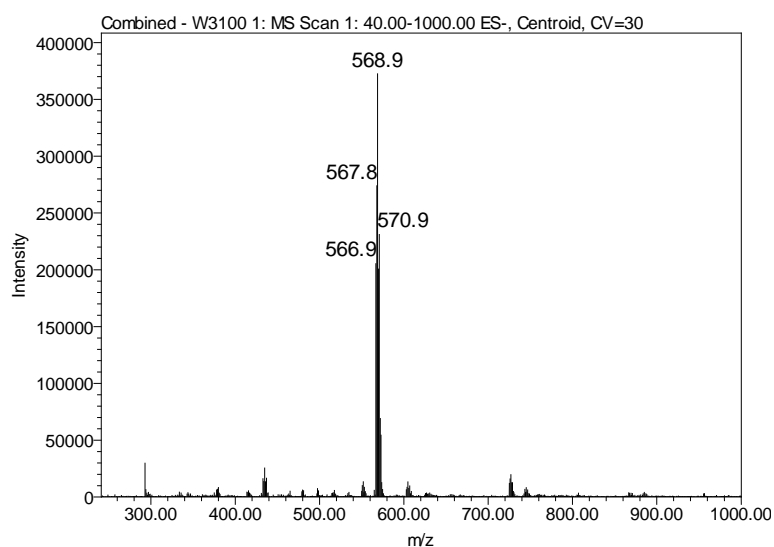


Figura 3.11 Spettro di massa, in modalità ioni negativi, del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)CO₂)₂Cl₂(NH₃)₂]

Dallo spettro ESI-MS, eseguito in modalità ioni negativi, è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare [M-H]⁻ con valore di m/z = 568,9, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico del platino.

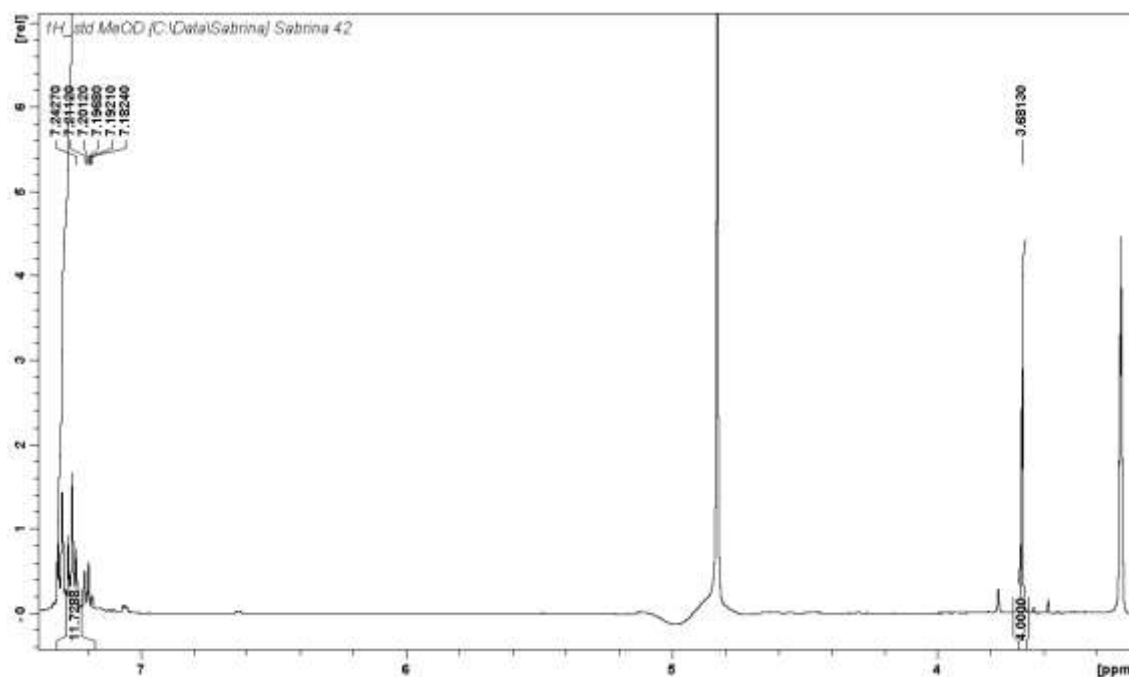
¹H-NMR

Figura 3.12 Spettro ¹H-NMR del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)CO₂)₂Cl₂(NH₃)₂]

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 3.681 (s, 4H, 2 CH_2), 7.182 (m, 2H, H_p), 7.201-7.243 (m, 8H, H_o/H_m) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$

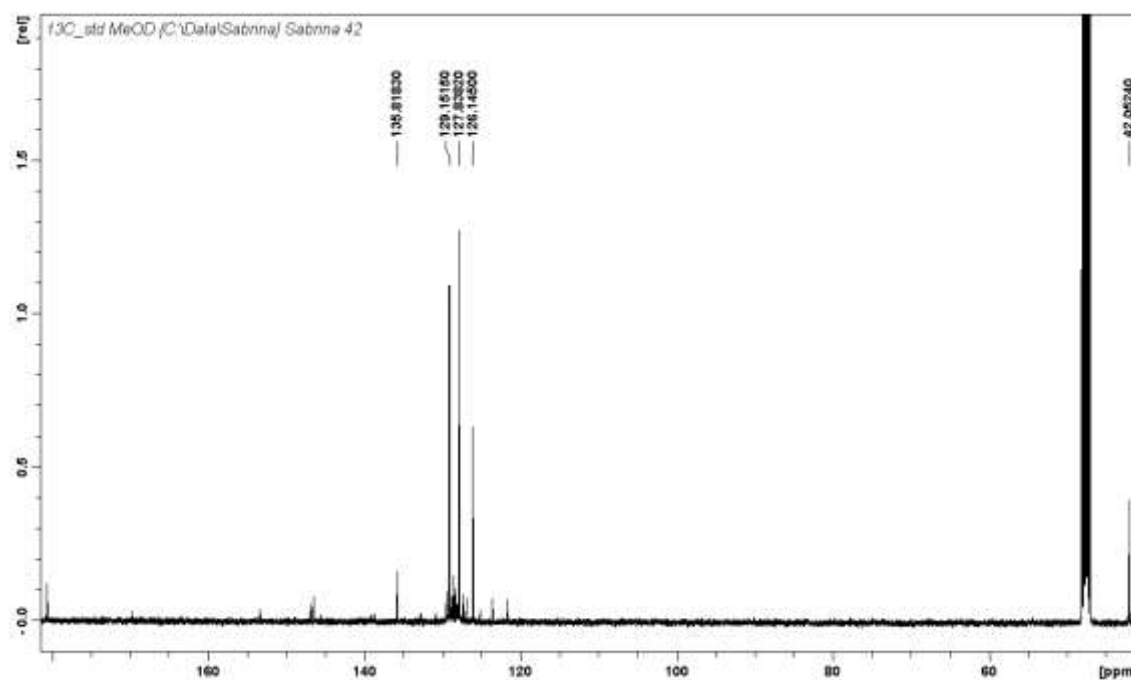


Figura 3.13 Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2)(\text{NH}_3)_2]$ in CD_3OD

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ 42.05 (CH_2), 126.1 (C_p), 127.8 (C_m), 129.1 (C_o), 135.8 (C_q), 180.7 ($\text{C}(\text{O})\text{O}$) ppm.

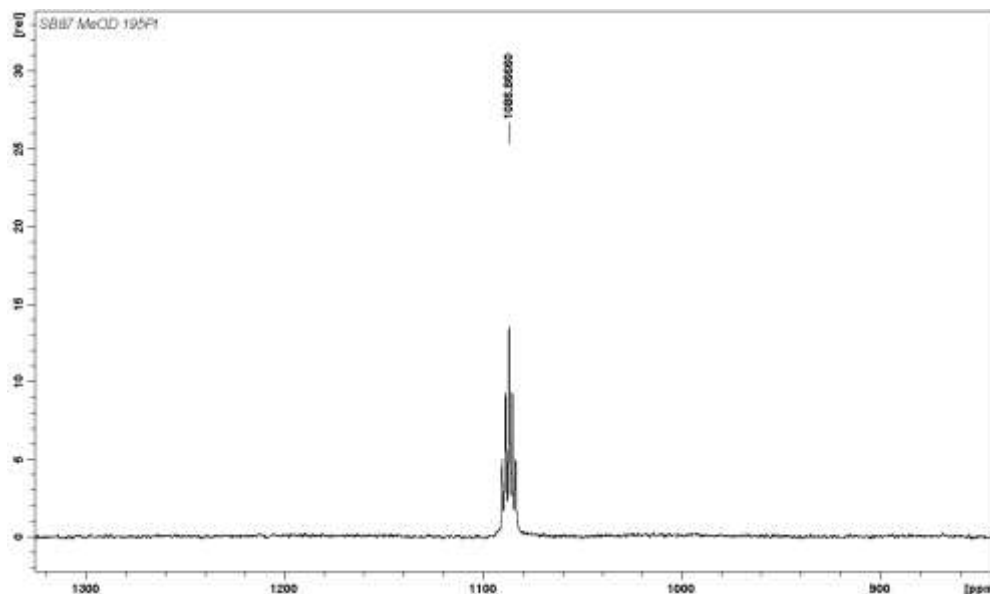
^{195}Pt -NMR

Figura 3.14 Spettro ^{195}Pt -NMR del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)CO₂)₂Cl₂(NH₃)₂] in CD₃OD

^{195}Pt -NMR (CD₃OD): δ 1086 ppm.

STRUTTURA CRISTALLOGRAFICA

I cristalli sono stati ottenuti dalla lenta evaporazione di una soluzione satura del complesso **1b** in MeOH. Come si può osservare dal modello ORTEP (Figura 3.15), il complesso di Pt(IV) analizzato presenta una struttura ottaedrica distorta. I due atomi di cloro ed i due gruppi amminici assumono una geometria *cis* planare quadrata attorno al centro metallico, mentre i gruppi carbossilato occupano le posizioni *trans* rimanenti.

I due leganti assiali assumono orientazioni diverse tra loro rispetto al piano equatoriale di coordinazione. L'atomo di ossigeno O4, non coordinato al platino, di uno dei carbossilati è coinvolto in due legami idrogeno con entrambe le

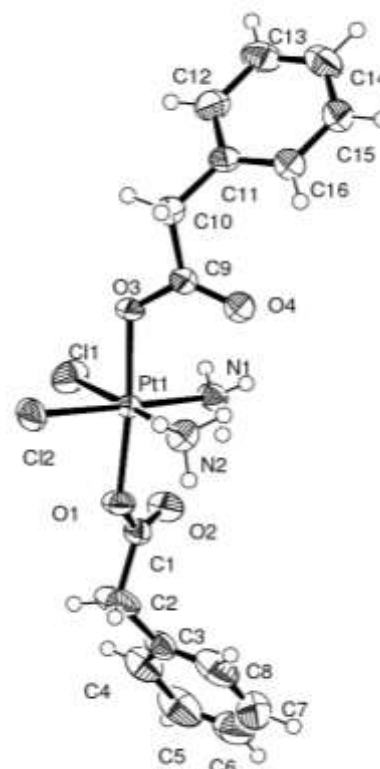


Figura 3.15 Modello ORTEP del complesso **1b** (50% di probabilità).

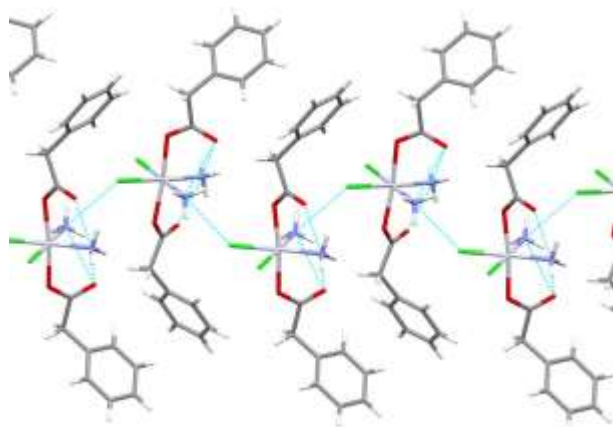


Figura 3.16 Legami idrogeno intra- e inter molecolari tra molecole adiacenti lungo la direzione b.

molecole di ammoniaca, mentre l'analogo O2 sull'altro legante assiale forma un singolo legame idrogeno con un solo gruppo amminico. L'altra ammina interagisce invece con un atomo di cloro della molecola adiacente in posizione $-x+1/2+1, +y-1/2,-z$: questo legame è alla base del *packing* del cristallo (figura 3.16).

Infine, grazie alla presenza di *spacer* metilenici tra il gruppo carbossilico e l'anello fenilico, che prevengono la delocalizzazione e favoriscono un certo grado di libertà di rotazione, sono presenti numerose interazioni tra gli anelli aromatici che contribuiscono anch'esse in maniera significativa al *packing* del cristallo (figura 3.17). Tali interazioni *face-to-edge* degli anelli permettono alle molecole di interfacciarsi tra loro per formare unità dimeriche.

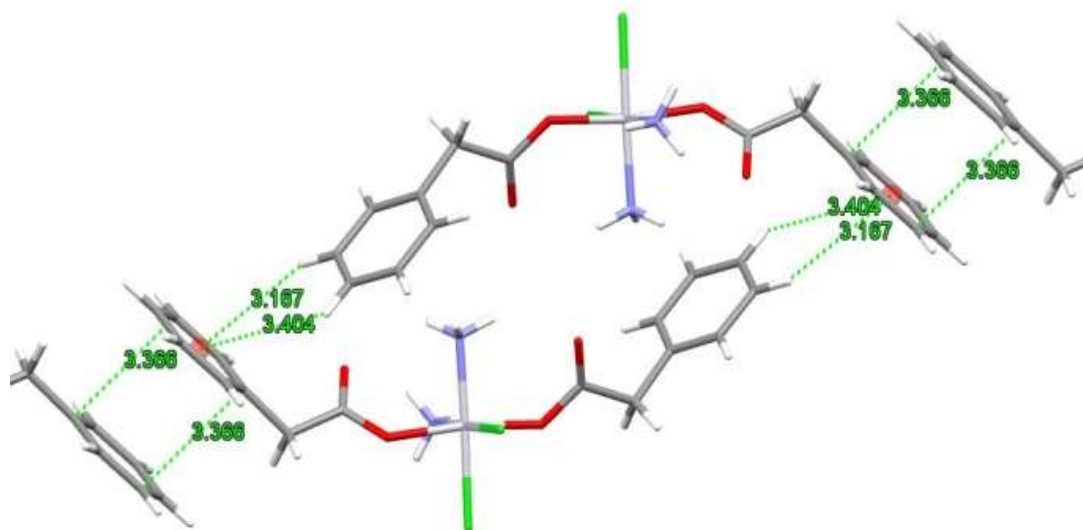
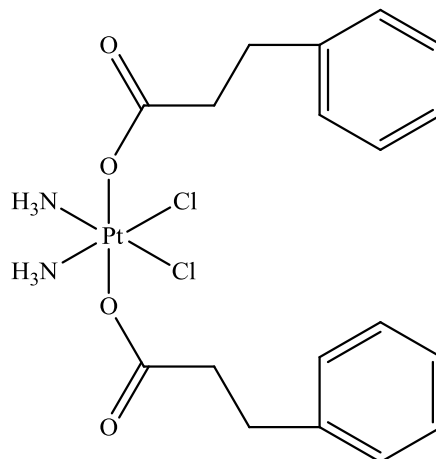


Figura 3.17 Interazioni tra anelli aromatici nel *packing* del complesso **1b**.

3.2.5 Caratterizzazione del *trans,cis,cis*- $[Pt(C_6H_5(CH_2)_2CO_2)_2Cl_2(NH_3)_2]$, **1c**



RP-HPLC

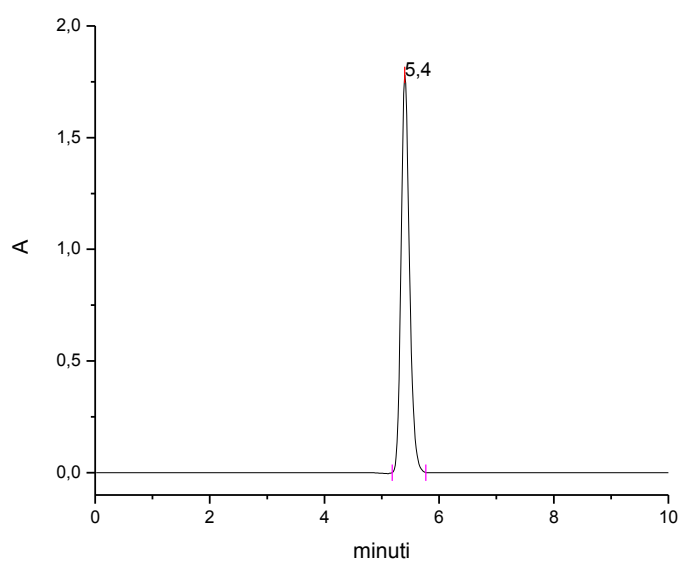


Figura 3.18 Cromatogramma del complesso *trans,cis,cis*- $[Pt(C_6H_5(CH_2)_2CO_2)_2Cl_2(NH_3)_2]$

La purezza del complesso di Pt(IV) sintetizzato (97.9 %) è stata verificata mediante tecnica RP-HPLC. Il cromatogramma ottenuto utilizzando come eluente una miscela di acido formico (15 mM) e MeOH (in rapporto 30:70) mostra un unico picco a 5.40 minuti.

ESI-MS

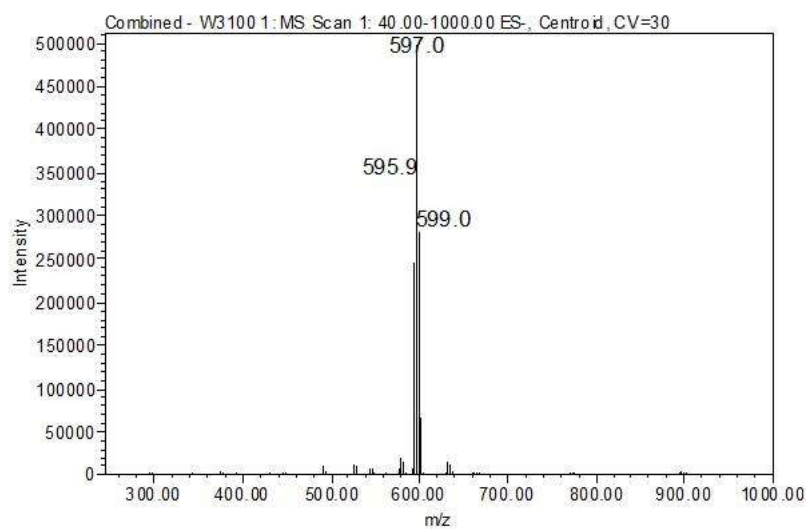


Figura 3.19 Spettro di massa, registrato in modalità ioni negativi, del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$

Dallo spettro ESI-MS, eseguito in modalità ioni negativi, è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[\text{M}-\text{H}]^-$ con valore di $m/z = 597.0$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico del platino.

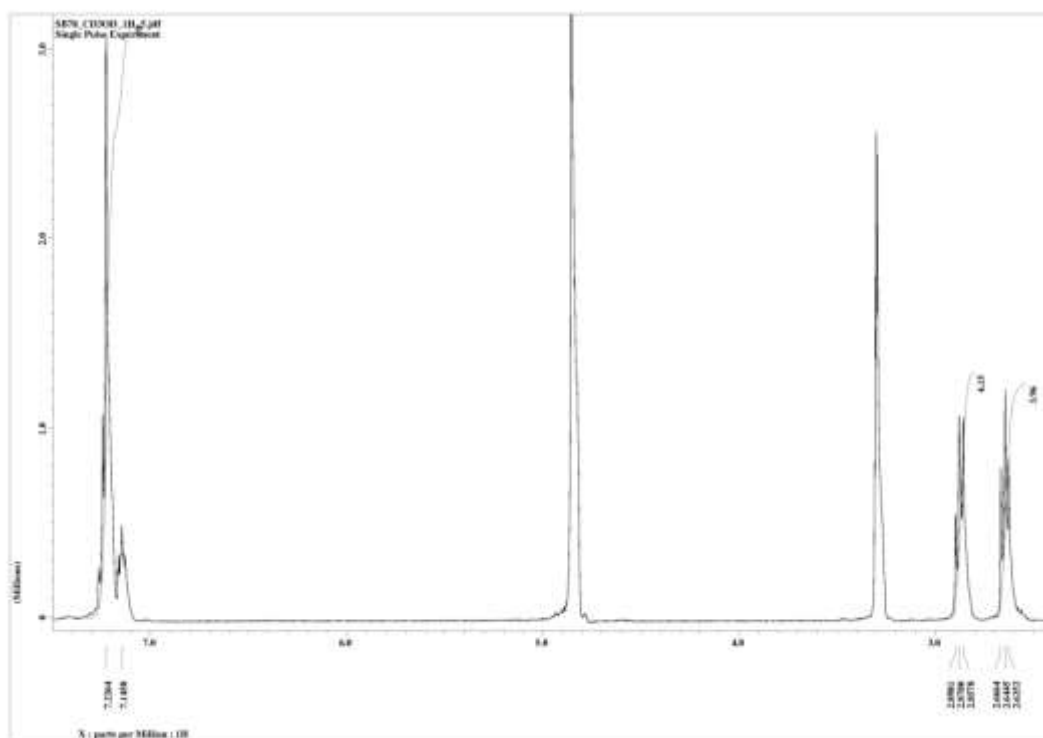
 ^1H -NMR

Figura 3.20 Spettro ^1H -NMR del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 2.644 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$, $^3\text{J} = 7.87$ Hz), 2.878 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{-C(O)O}$, $^3\text{J} = 7.87$ Hz), 7.145 (m, 2H, H_p), 7.226 (m, 8H, H_o/H_m) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$

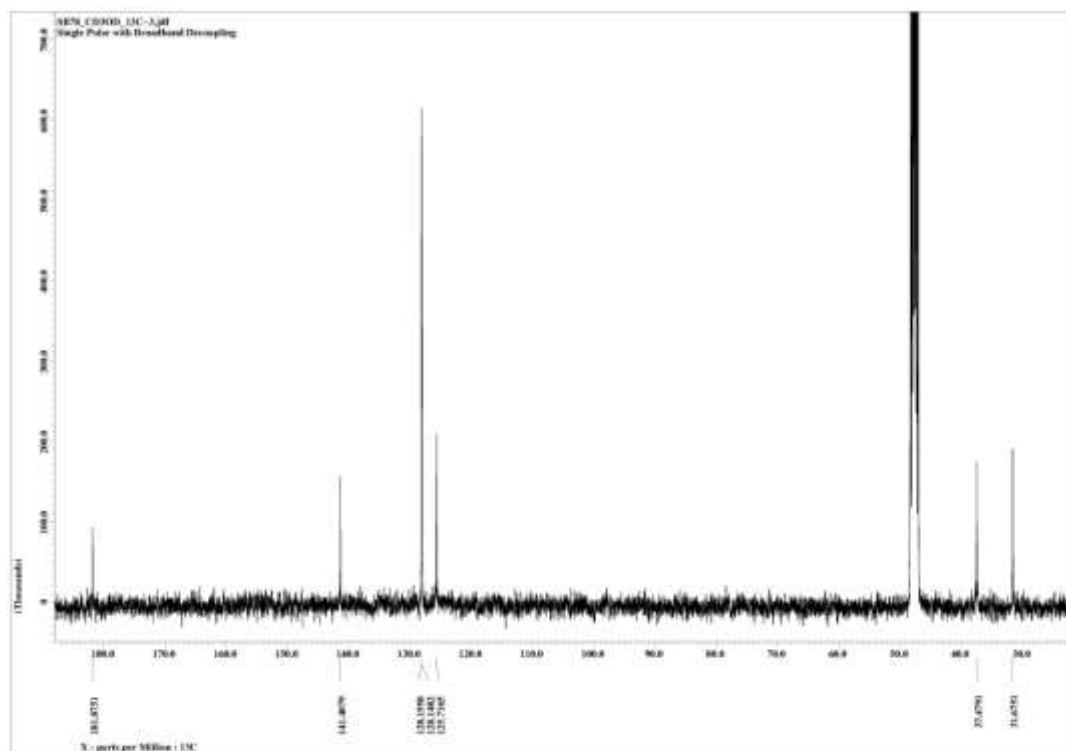


Figura 3.21 Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ 31.67 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 37.48 ($\text{CH}_2\text{-C(O)O}$), 125.7 (C_p), 128.1 (C_m), 128.2 (C_o), 141.4 (C_q), 181.9 (C(O)O) ppm.

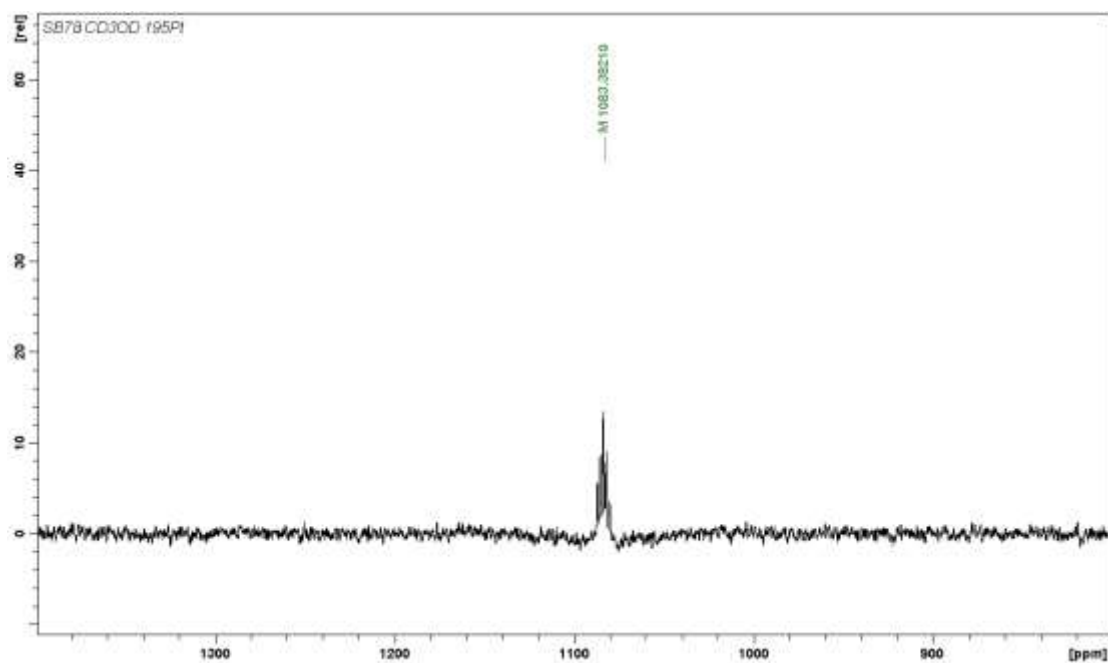
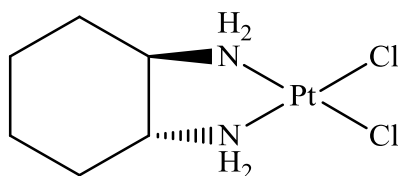
^{195}Pt -NMR

Figura 3.22 Spettro ^{13}C -NMR del complesso *trans,cis,cis*-[Pt (C₆H₅(CH₂)₂CO₂)₂Cl₂(NH₃)₂]

^{195}Pt -NMR (CD₃OD): δ 1083 ppm.

3.2.6 Caratterizzazione di *cis*-[PtCl₂(1,2-dach)], 4



RP-HPLC

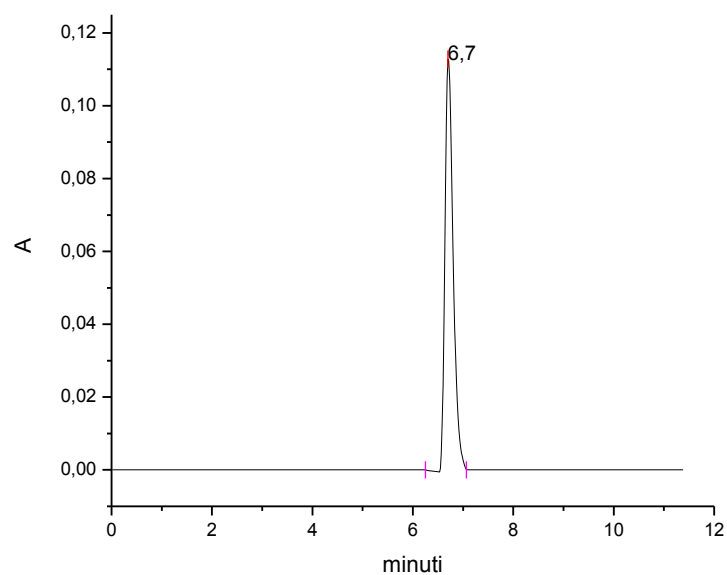


Figura 3.23 Cromatogramma del complesso *cis*-[PtCl₂(1,2-dach)]

La purezza del complesso di Pt(II) sintetizzato (98.6%) è stata verificata mediante tecnica RP-HPLC. Il cromatogramma ottenuto utilizzando come eluente una miscela di acido formico (15 mM) e MeOH (in rapporto 70:30) mostra un unico picco a 6.70 minuti.

ESI-MS

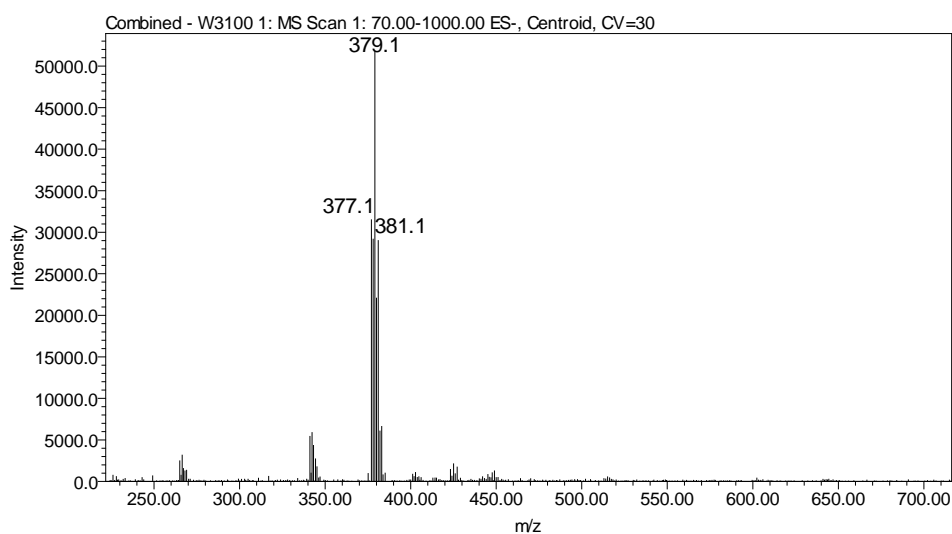


Figura 3.24 Spettro di massa, in modalità ioni negativi, del complesso *cis*-[PtCl₂(1,2-dach)]

Dallo spettro ESI-MS, eseguito in modalità ioni negativi, è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[M-H]^-$ con valore di $m/z = 379.1$, il quale mostra il pattern isotopico tipico del platino.

¹H-NMR

¹H-NMR (dms_o-d₆): δ 0.95-1.43 (m, 4H, NH₂-CH-CH₂-CH_{2(ax)} e NH₂-CH-CH_{2(ax)}-CH₂), 1.20-1.83 (m, 4H, NH₂-CH-CH_{2(eq)} e NH₂-CH-CH_{2(eq)}-CH₂), 2.07 (m, 2H, NH₂-CH-CH₂-CH₂) e 5.02-5.56 (m, 4H, NH₂) ppm.

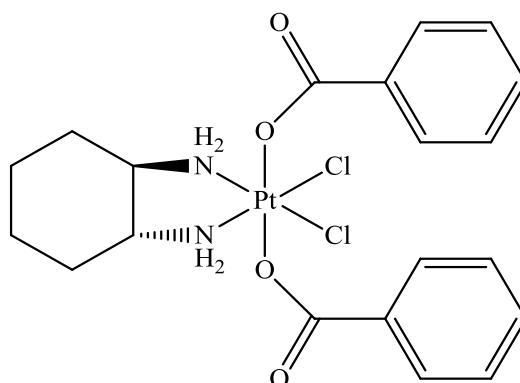
¹³C-NMR

¹³C-NMR (dms_o-d₆): δ 24.09 (c), 31.29 (b), 62.68 (a) ppm.

¹⁹⁵Pt-NMR

¹⁹⁵Pt-NMR (dms_o-d₆): δ - 2278 ppm.

3.2.7 Caratterizzazione del *trans,cis,cis*- $[Pt(C_6H_5CO_2)_2Cl_2(1,2-dach)]$, 2a



RP-HPLC

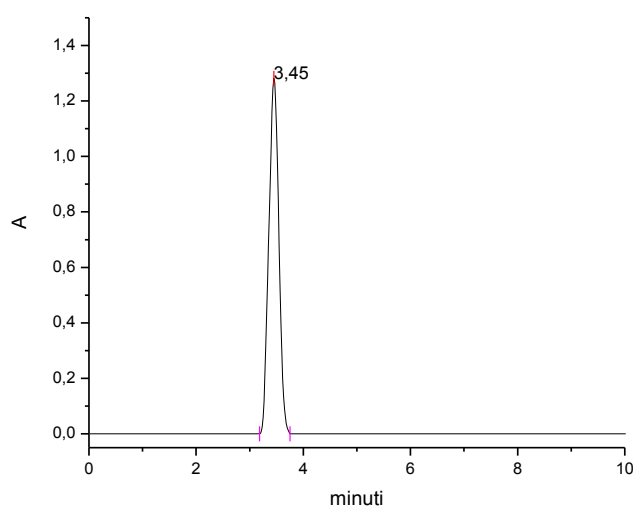


Figura 3.25 Cromatogramma del complesso *trans,cis,cis*- $[Pt(C_6H_5CO_2)_2Cl_2(1,2-dach)]$

La purezza del complesso di Pt(IV) sintetizzato (98.5 %) è stata verificata mediante tecnica RP-HPLC. Il cromatogramma ottenuto utilizzando come eluente una miscela di acido formico (15 mM) e MeOH (in rapporto 30:70) mostra un unico picco a 3.45 minuti.

ESI-MS

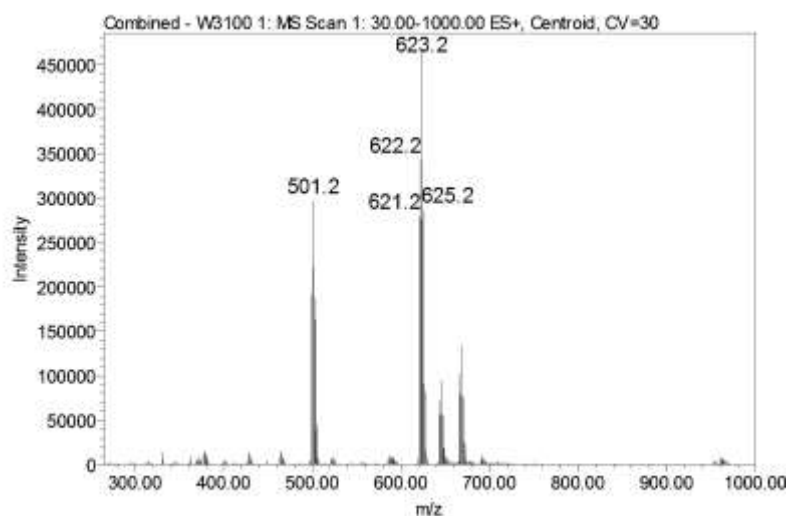


Figura 3.26 Spettro di massa, in modalità ioni positivi, del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅CO₂)₂Cl₂(1,2-dach)]

Dallo spettro ESI-MS, eseguito in modalità ioni positivi, è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[\text{M}+\text{H}]^+$ con valore di $m/z = 623.2$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico del platino. Sono inoltre presenti gli addotti $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e $[\text{M}+\text{K}]^+$ rispettivamente a $m/z = 646.5$ e 662.1 . Infine a $m/z = 501.2$ troviamo la frammentazione del complesso $[\text{M-benzoato}]^+$.

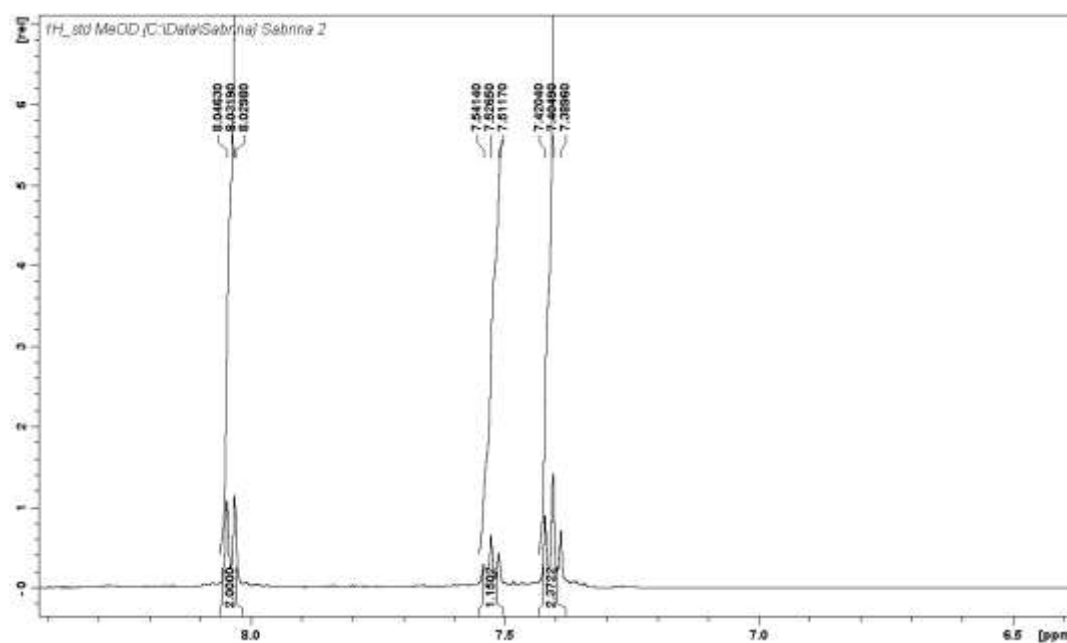
¹H-NMR

Figura 3.27 Spettro ¹H-NMR a campi bassi del complesso *cis-trans-cis*-[PtCl₂(C₆H₅CO₂)₂(1,2-dach)] in CD₃OD

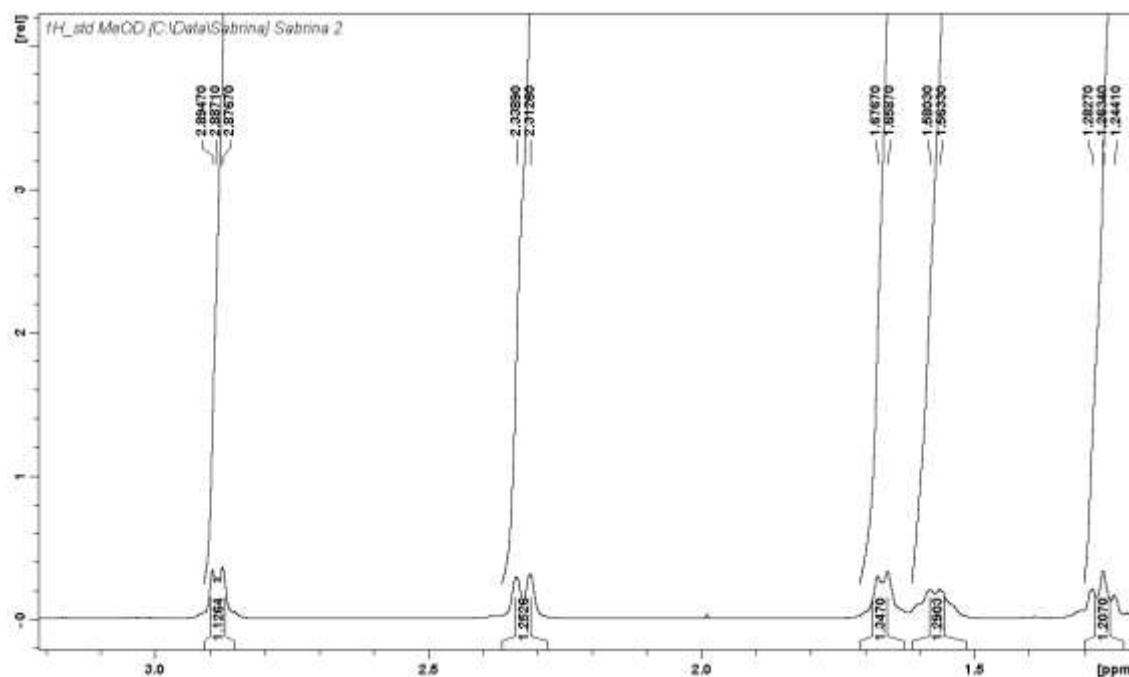


Figura 3.28 Spettro $^1\text{H-NMR}$ a campi alti del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(1,2\text{-dach})]$ in CD_3OD

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 1.26 (m, 2H, $\text{NH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_{2(\text{ax})}$), 1.56 (m, 2H, $\text{NH}_2\text{-CH-CH}_{2(\text{ax})}\text{-CH}_2$), 1.65 (m, 2H, $\text{NH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_{2(\text{eq})}$), 2.31 (m, 2H, $\text{NH}_2\text{-CH-CH}_{2(\text{eq})}\text{-CH}_2$), 2.88 (m, 2H, $\text{NH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2$), 7.40 (t, 4H, H_m , $^3J = 7.69$ Hz), 7.53 (t, 2H, H_p , $^3J = 7.32$ Hz), 8.03 (d, 4H, H_o , $^3J = 8.26$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$

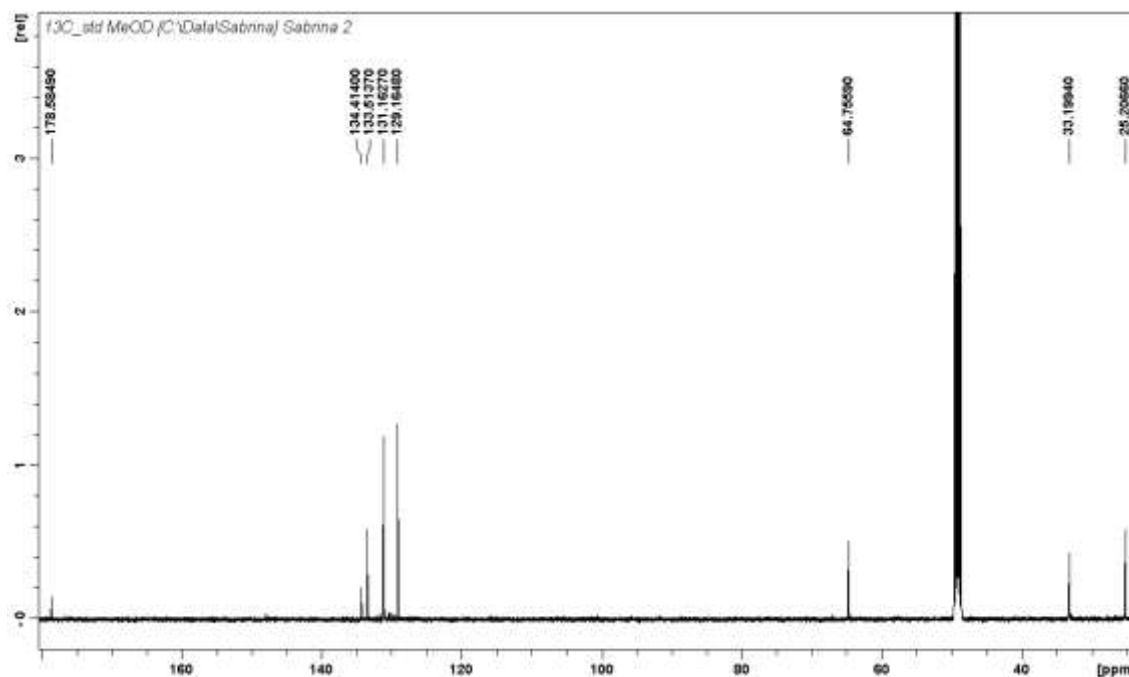


Figura 3.29 Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(1,2\text{-dach})]$

^{13}C -NMR (CD_3OD): δ 25.21 (c), 33.20 (b), 64.7 (a), 129.1 (C_p), 131.6 (C_m), 133.5 (C_o), 134.4 (C_q), 178.6 ($\text{C}(\text{O})\text{O}$) ppm.

^{195}Pt -NMR

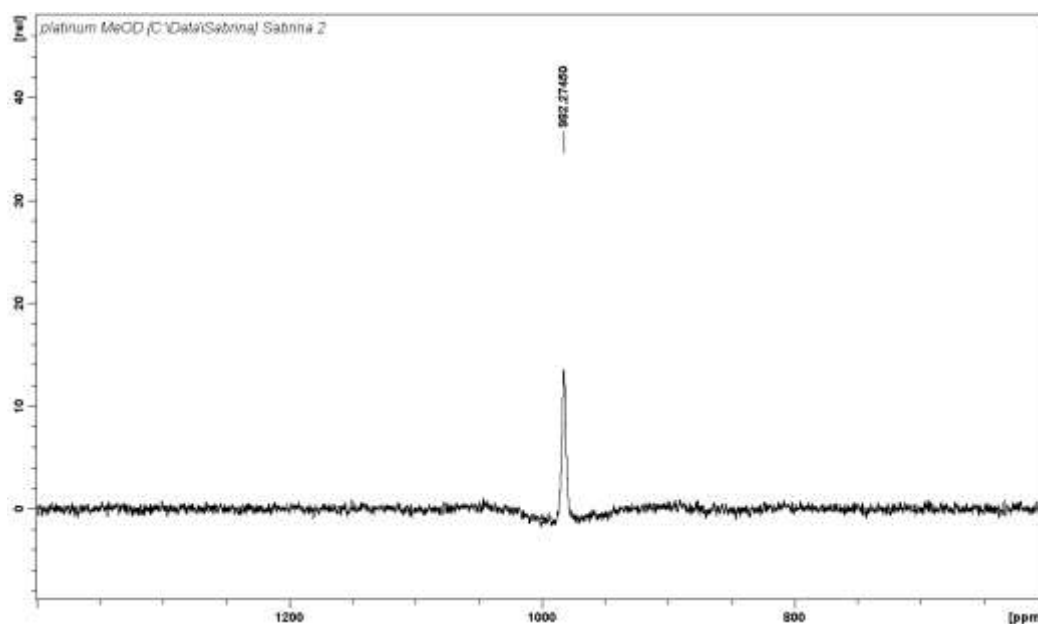


Figura 3.30 Spettro ^{195}Pt -NMR del complesso *trans,cis,cis*-[Pt($\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2$) $_2\text{Cl}_2$ (1,2-dach)]

^{195}Pt -NMR (dmsO-d_6): δ 1088 ppm.

STRUTTURA CRISTALLOGRAFICA

Il cristallo è stato ottenuto per lenta evaporazione di una soluzione satura del complesso **2a** in MeOH.

Come si può osservare dal modello ORTEP (figura 3.31), il complesso di Pt(IV) analizzato presenta una geometria ottaedrica distorta, con il piano equatoriale occupato da due atomi di cloro (legame Pt-Cl tra 2.295 e 2.338 Å) e due gruppi amminici (legame Pt-N tra 2.036 e 2.073 Å) in posizione *cis* rispetto al centro metallico. I due gruppi benzoato (legami O1-Pt-O3 tra 171.0 e 171.6 Å) occupano invece le posizioni *trans* rimanenti (distanza di legame Pt-O tra 2.000 e 2.024 Å).

L'introduzione del legante equatoriale chirale (1R,2R-diamminocicloesano) favorisce la formazione di due conformeri. In entrambe le specie i gruppi benzoato formano due legami idrogeno, il primo con un gruppo NH₂ del dach e il secondo con quello della molecola adiacente, formando una struttura dimerica. L'altro gruppo amminico, in entrambi i complessi, rimane disponibile a formare due altri legami idrogeno con un atomo di cloro e con un ossigeno della molecola adiacente. Queste interazioni intermolecolari favoriscono la formazione di catene che si estendono lungo l'asse c e che costituiscono la base del *packing* del cristallo.

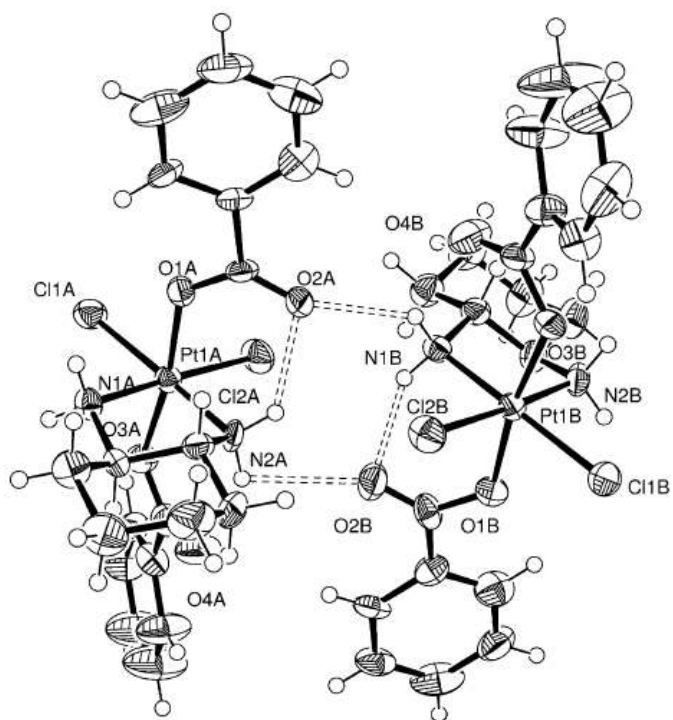
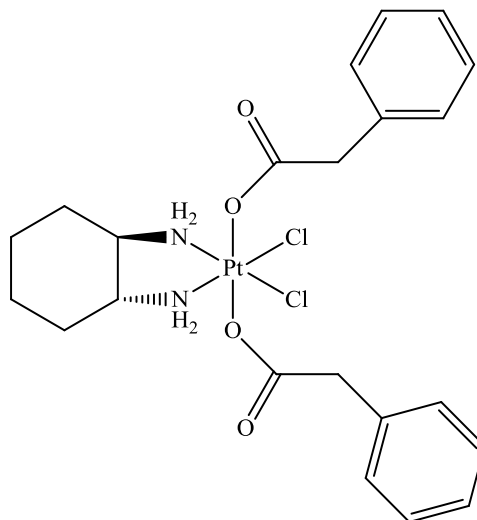


Figura 2.31 Modello ORTEP del complesso **2a**

3.2.8 Caratterizzazione del *trans,cis,cis*-[Pt($C_6H_5(CH_2)CO_2$) $_2Cl_2(1,2-dach)$], **2b**



RP-HPLC

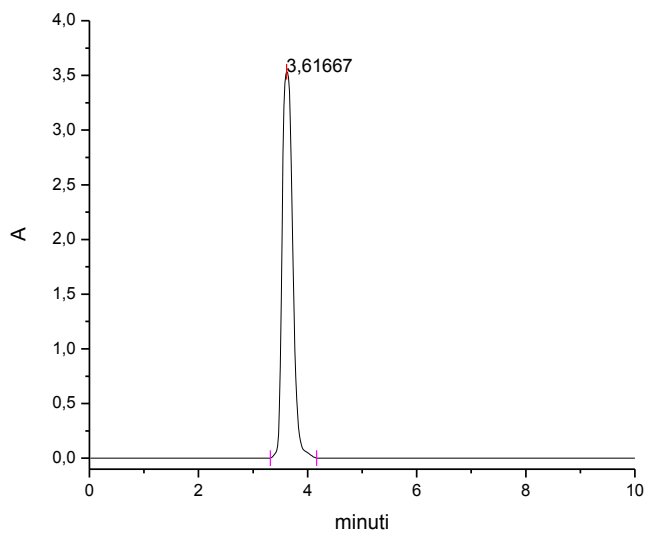


Figura 3.32 Cromatogramma del complesso *trans,cis,cis*-[Pt($C_6H_5(CH_2)CO_2$) $_2Cl_2(1,2-dach)$]

La purezza del complesso di Pt(IV) sintetizzato (99.8 %) è stata verificata mediante tecnica RP-HPLC. Il cromatogramma ottenuto utilizzando come eluente una miscela di acido formico (15 mM) e MeOH (in rapporto 30:70) mostra un unico picco a 3.62 minuti.

ESI-MS

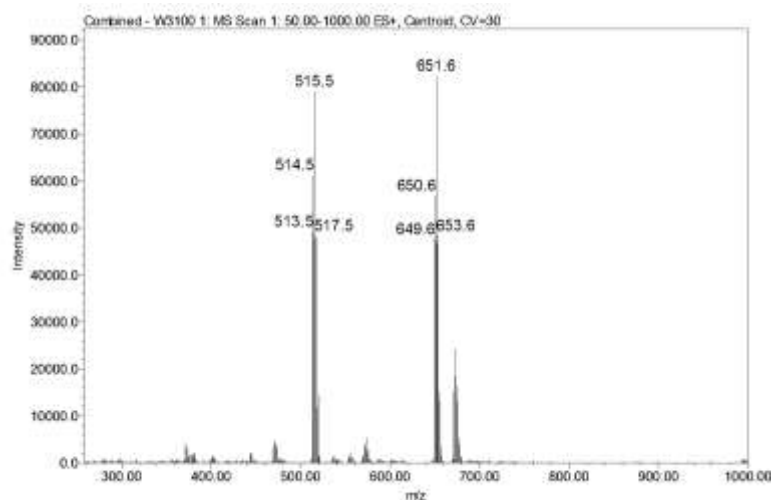


Figura 3.33 Spettro di massa, in modalità ioni positivi, del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)CO₂)₂Cl₂(1,2-dach)]

Dallo spettro ESI-MS, eseguito in modalità ioni positivi, è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare [M+H]⁺ con valore di m/z = 651.6, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico del platino. E' inoltre presente l'addotto [M+Na]⁺ a m/z = 674.6. Infine a m/z = 515.5 troviamo la frammentazione del complesso [M-fenilacetato]⁺.

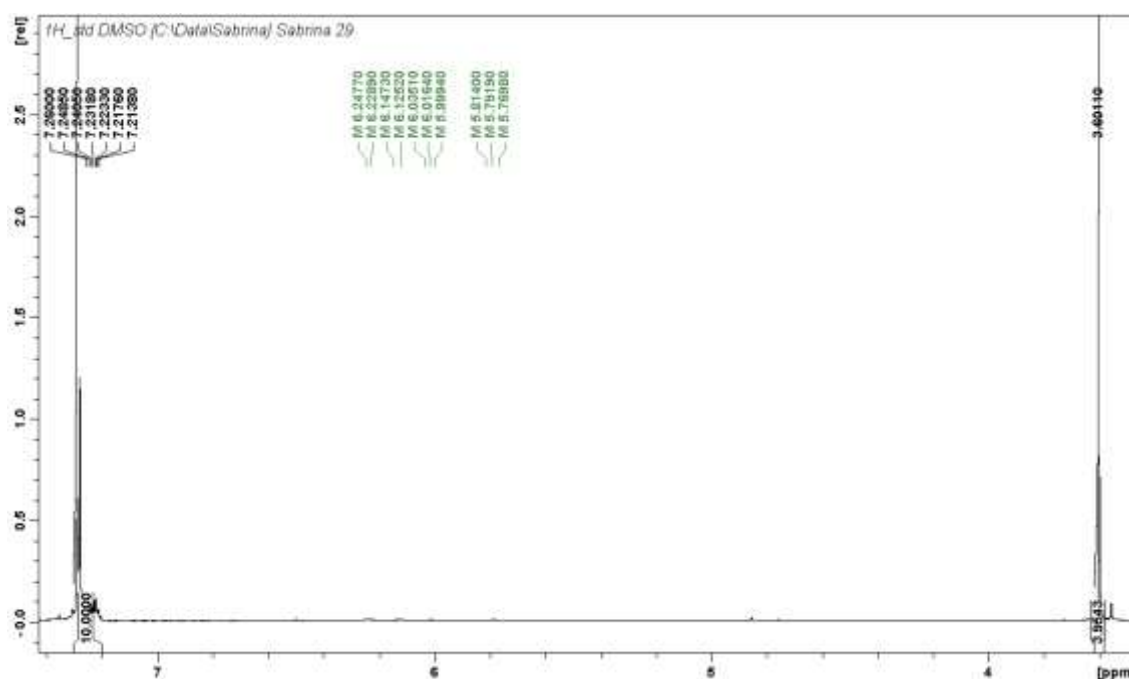
¹H-NMR

Figura 3.34 Spettro ¹H-NMR a campi bassi del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)CO₂)₂Cl₂(1,2-dach)]

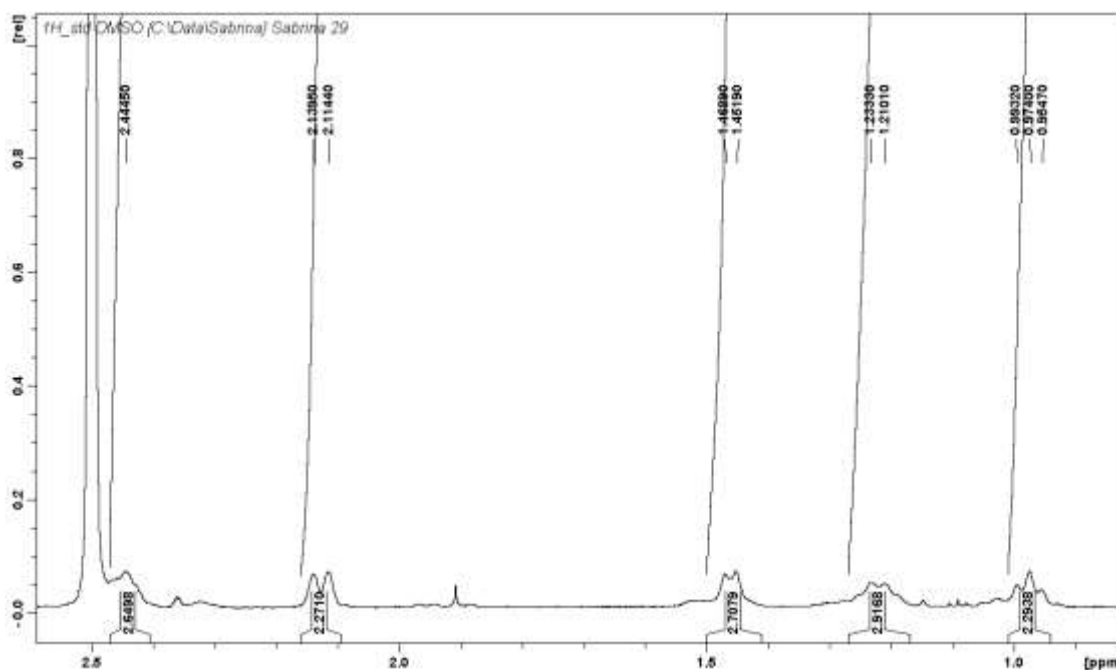


Figura 3.35 Spettro $^1\text{H-NMR}$ a campi alti del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)CO₂)₂Cl₂(1,2-dach)]

$^1\text{H-NMR}$ (dms_o-d₆): δ 0.97 (m, 2H, NH₂-CH-CH₂-CH_{2(ax)}), 1.22 (m, 2H, NH₂-CH-CH_{2(ax)}-CH₂), 1.46 (m, 2H, NH₂-CH-CH₂-CH_{2(eq)}), 2.12 (m, 2H, NH₂-CH-CH_{2(eq)}-CH₂), 2.44 (m, 2H, NH₂-CH-CH₂-CH₂), 3.60 (s, 4H, 2 CH₂), 7.21-7.30 (m, 10H, *H_o*, *H_m* and *H_p*), 8.18 e 9.37 (m, 4H, NH₂) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$

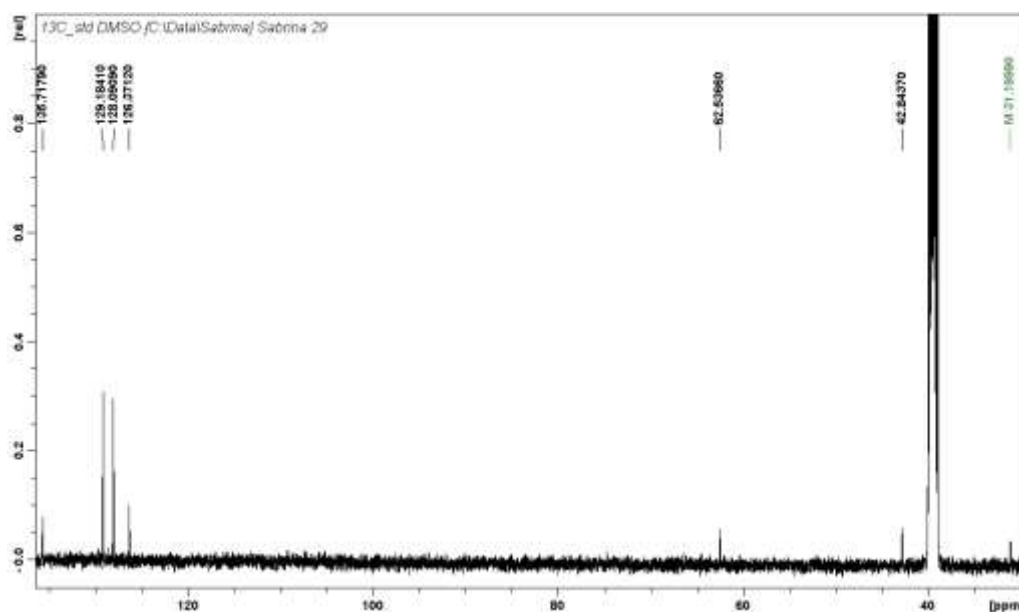


Figura 3.36 Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)CO₂)₂Cl₂(1,2-dach)]

^{13}C -NMR (dms o -d $_6$): δ 23.4 (c), 31.9 (b), 42.8 (CH_2), 62.5 (a), 126.4 (C_p), 128.1 (C_m), 129.2 (C_o), 135.7 (C_q), 180.9 ($\text{C}(\text{O})\text{O}$) ppm.

^{195}Pt -NMR

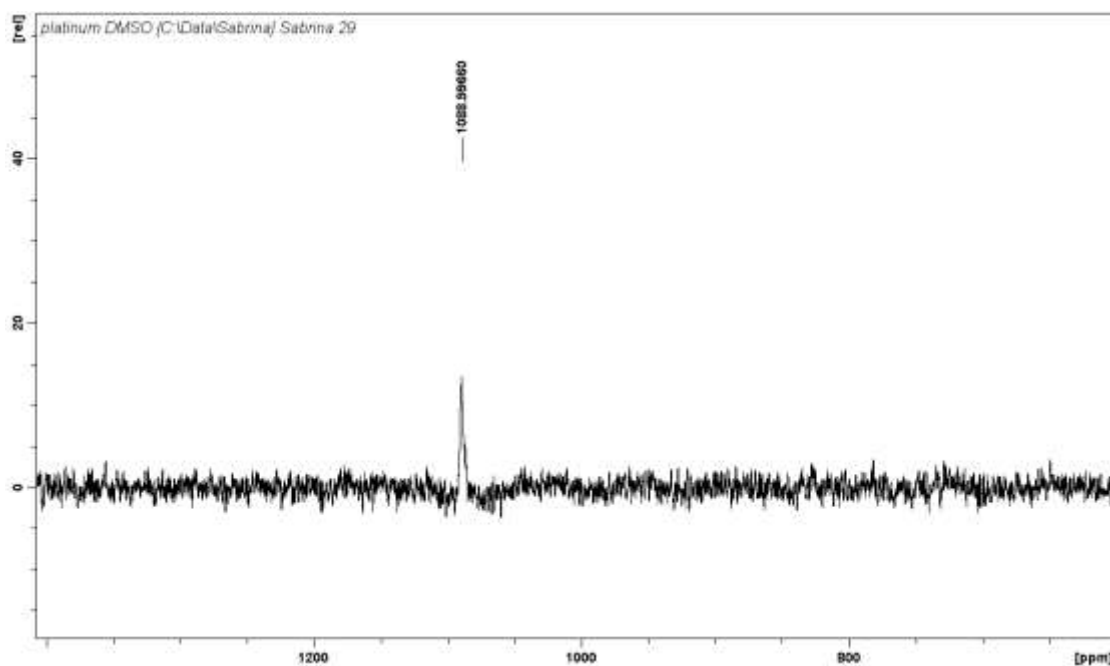
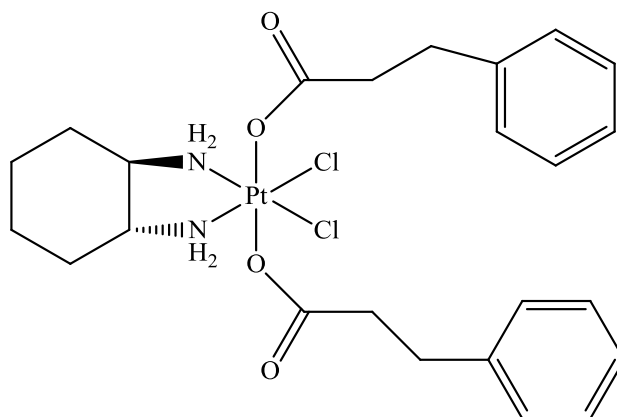


Figura 3.37 Spettro ^{195}Pt -NMR del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(1,2\text{-dach})]$

^{195}Pt -NMR (dms o -d $_6$): δ 1088 ppm.

3.2.9 Caratterizzazione del *trans,cis,cis* [Pt(C₆H₅(CH₂)₂CO₂)₂Cl₂(1,2-dach)], 3b



RP-HPLC

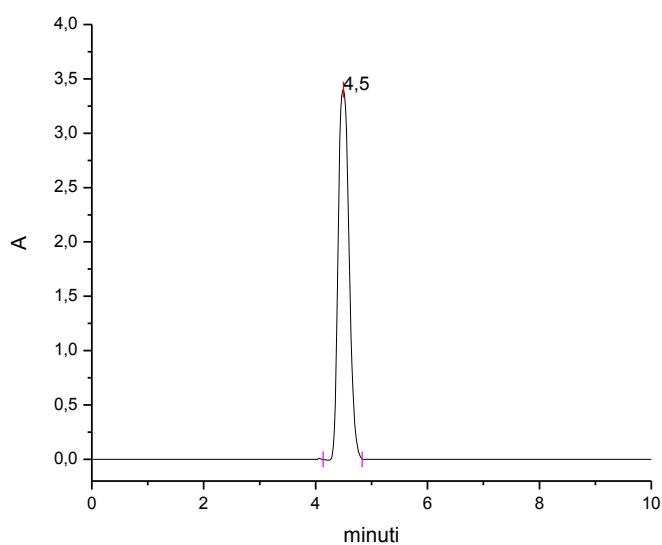


Figura 3.38 Cromatogramma del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)₂CO₂)₂Cl₂(1,2-dach)]

La purezza del complesso di Pt(IV) sintetizzato (98.8 %) è stata verificata mediante tecnica RP-HPLC. Il cromatogramma ottenuto utilizzando come eluente una miscela di acido formico (15 mM) e MeOH (in rapporto 30:70) mostra un unico picco a 4.50 minuti.

ESI-MS

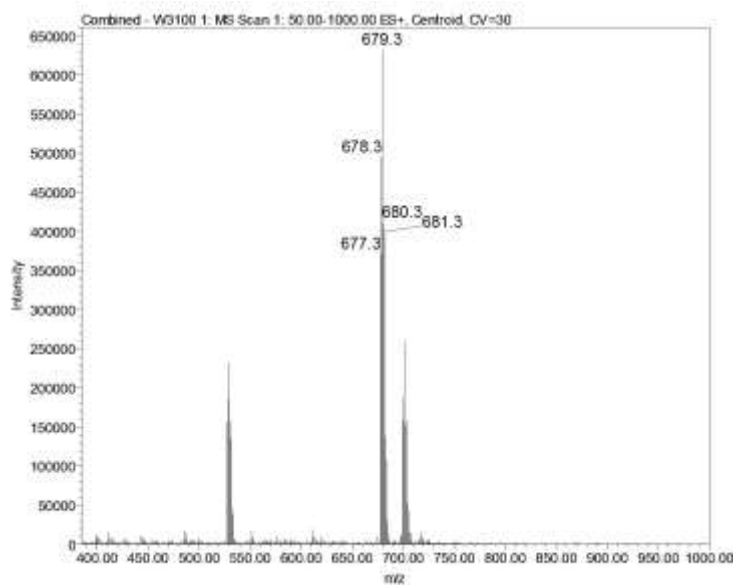


Figura 3.39 Spettro di massa, in modalità ioni positivi, del complesso $trans,cis,cis-[Pt(C_6H_5(CH_2)_2CO_2)_2Cl_2(1,2-dach)]$

Dallo spettro ESI-MS, eseguito in modalità ioni positivi, è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[M+H]^+$ con valore di $m/z = 679.3$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico del platino. E' inoltre presente l'addotto $[M+Na]^+$ a $m/z = 702.5$. Infine a $m/z = 529.3$ troviamo la frammentazione del complesso $[M-idrocinnammato]^+$.

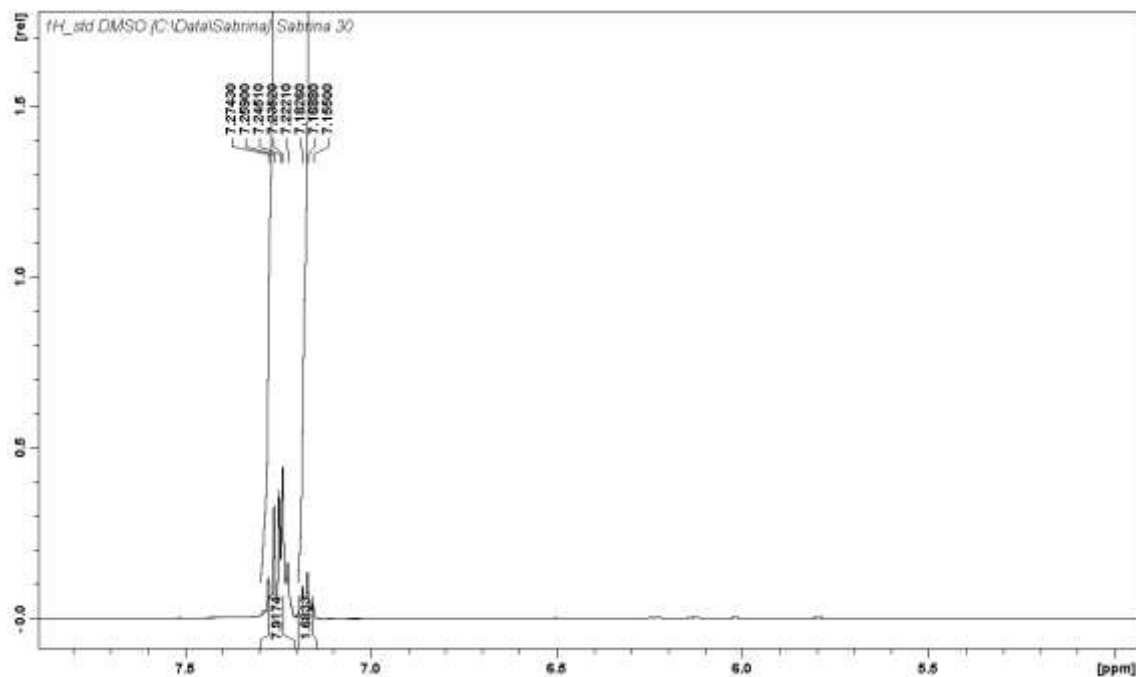
$^1\text{H-NMR}$ 

Figura 3.39 Spettro $^1\text{H-NMR}$ a campi bassi del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)₂CO₂)₂Cl₂(1,2-dach)]

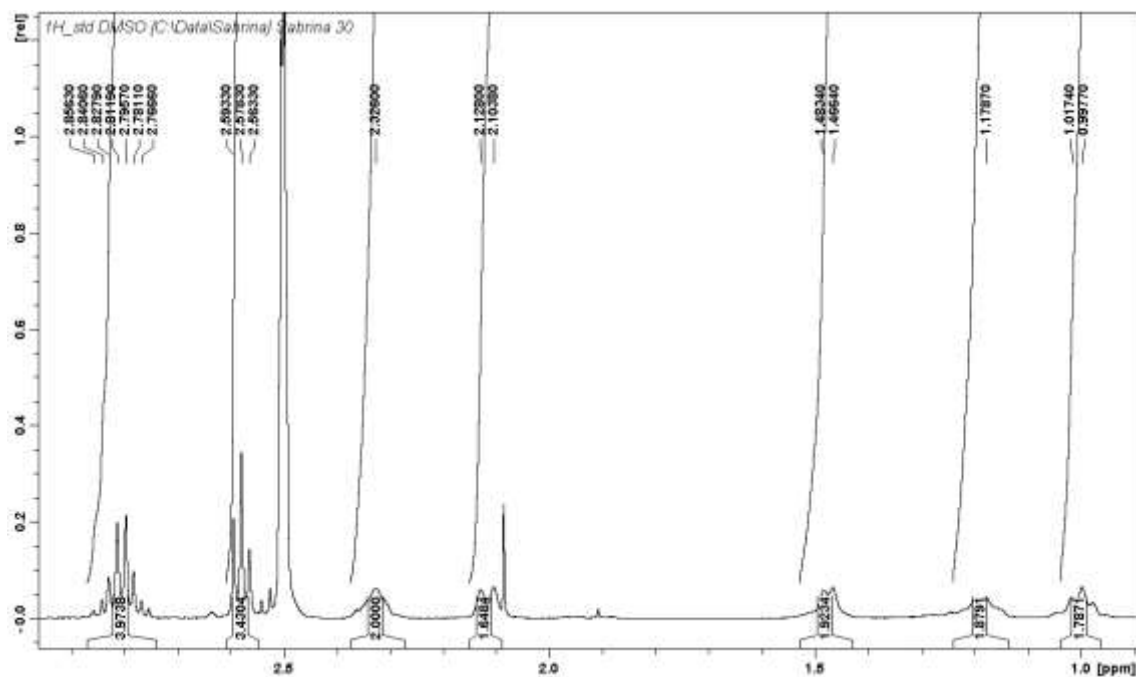


Figura 3.40 Spettro $^1\text{H-NMR}$ del complesso *trans,cis,cis*-[Pt(C₆H₅(CH₂)₂CO₂)₂Cl₂(1,2-dach)]

$^1\text{H-NMR}$ (dms_o-d₆): δ 0.99 (m, 2H, NH₂-CH-CH₂-CH₂(ax)), 1.18 (m, 2H, NH₂-CH-CH₂(ax)-CH₂), 1.47 (m, 2H, NH₂-CH-CH₂-CH₂(eq)), 2.11 (m, 2H, NH₂-CH-CH₂(eq)-CH₂),

2.32 (m, 2H, $\text{NH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.58 (t, 4H, 4 $\text{CH}_2\text{-Ph}$, $^3\text{J}= 7.59$), 2.76-2.83 (m, 4H, 4 $\text{CH}_2\text{-C(O)O}$), 7.21-7.30 (m, 10H, H_o , H_m and H_p), 8.25 and 9.17 (m, 4H, NH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$

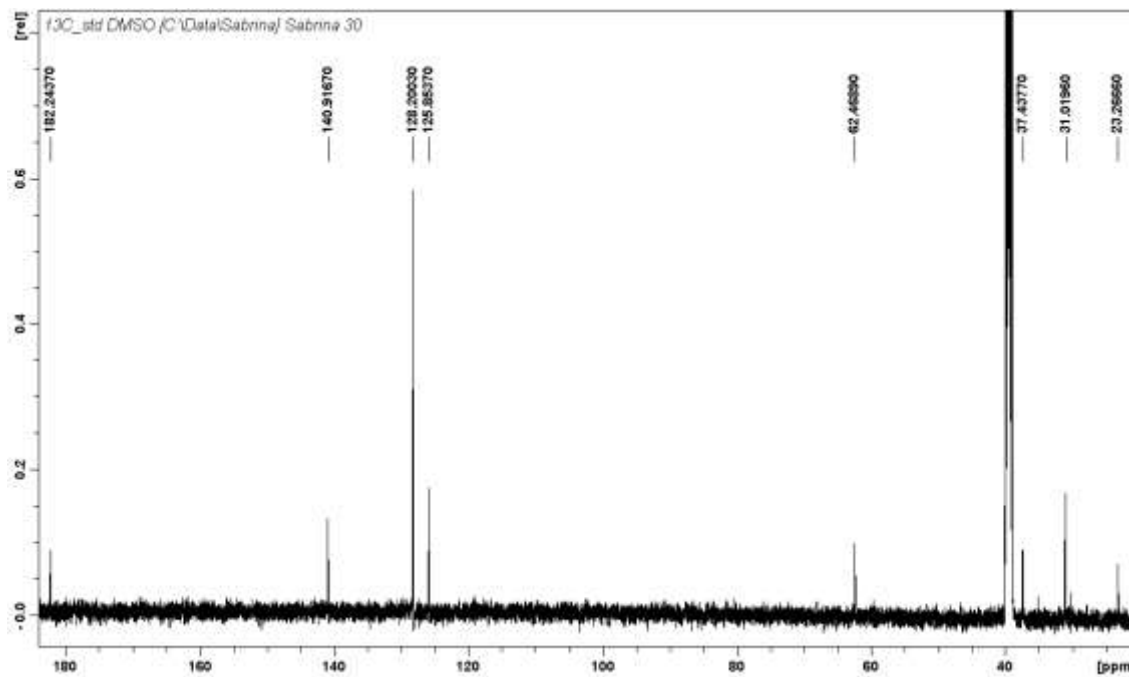


Figura 3.41 Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(1,2\text{-dach})]$

$^{13}\text{C-NMR}$ (dms $o\text{-d}_6$): δ 23.26 (*c*), 30.05 (*b*, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 37.4 ($\text{CH}_2\text{-C(O)O}$), 62.5 (*a*), 125.8 (C_p), 128.2 (C_m , C_o), 140.9 (C_q), 182.2 (C(O)O) ppm.

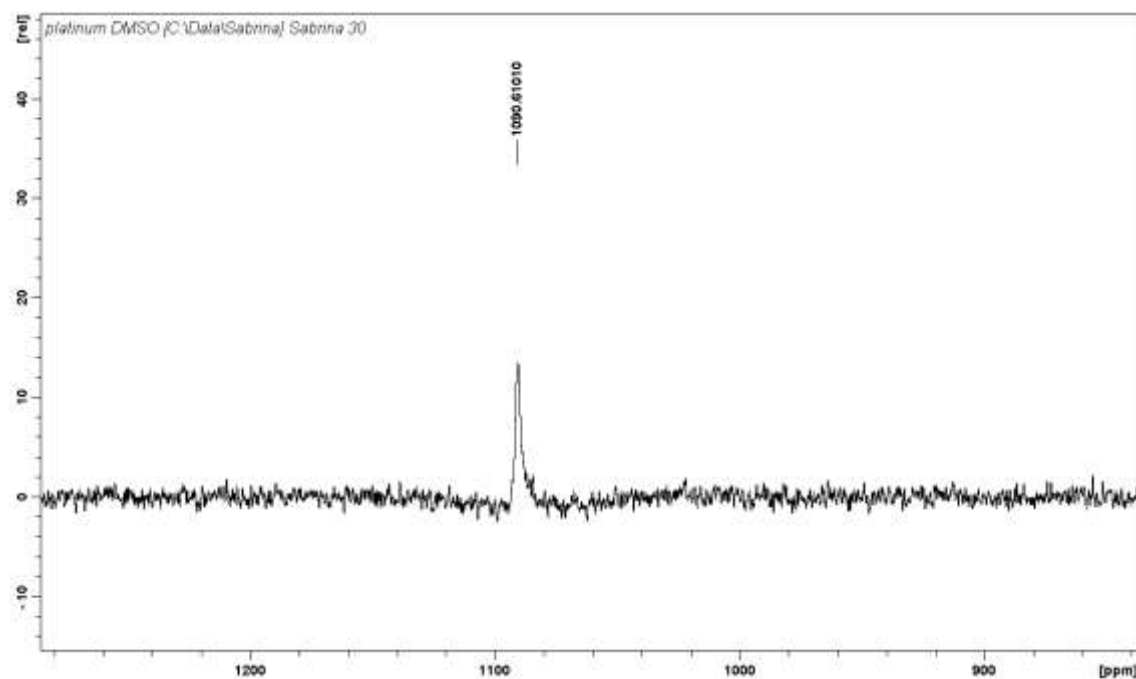
^{195}Pt -NMR

Figura 3.42 Spettro ^{195}Pt -NMR del complesso *trans,cis,cis*- $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2)_2\text{Cl}_2(1,2\text{-dach})]$

^{195}Pt -NMR (dms o - d_6): δ 1090 ppm.

Capitolo 4

*Proprietà chimico-fisiche e
biologiche dei complessi 1a-1c e
2a-2c*

4.1 Descrizione del lavoro

La conoscenza delle proprietà biofarmaceutiche di un farmaco, ossia delle relazioni tra alcune proprietà chimico-fisiche e gli effetti biologici osservati dopo la sua somministrazione, rappresenta una fase molto importante dello sviluppo di nuovi composti a potenziale attività terapeutica.

Di fatto, un farmaco deve superare varie barriere biologiche ed interagire con i fluidi inter- e intra-cellulari prima di raggiungere la cosiddetta “sede d’azione”. In questa prospettiva, le proprietà chimico-fisiche di un composto devono concorrere a facilitarne l’assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l’escrezione (spesso abbreviati in ADME).

In questo capitolo verranno prese in considerazione alcune caratteristiche delle due serie di complessi di Pt(IV), precedentemente sintetizzati e caratterizzati, come la lipofilità, la solubilità e l’attivazione mediante riduzione. Inoltre, verrà testata l’attività antiproliferativa e l’*accumulation* cellulare di tutti i composti in esame mediante studi *in vitro*.

Infine, sul complesso **2a** verrà effettuato un ulteriore studio condotto su particolari linee cellulari tumorali colon-rettali.

4.2 Lipofilità

La scelta dei leganti assiali, presi in considerazione per il *design* di queste due serie di complessi **1a-1c** e **2a-2c**, è stata suggerita da alcuni lavori di Dyson⁴⁵ e Ang⁴⁶, che evidenziano come i gruppi aromatici siano capaci di aumentare l’attività citotossica dei complessi di Pt(IV) ad essi correlati. E’ infatti noto che l’incremento di lipofilità di un determinato farmaco influenza in maniera positiva l’*accumulation* cellulare.

⁴⁵ W.H. Ang, S. Pilet, R. Scopelliti, F. Bussy, L. Juillerat-Jeanneret, P. Dyson, *Synthesis and characterization of Pt(IV) anticancer drugs with functionalized aromatic carboxylate ligands: influence of the ligands on drugs efficacies and uptake.*, J. Med. Chem., 2005, 48, 8060-8069.

⁴⁶ C. F. Chin, Q. Tian, M. I. Setyawati, W. R. Fang, E. S. Q. Tan, D. T. Leong, W. H. Ang, J. Med. Chem. 2012, 55, 7571 – 7582.

Inoltre, è stato dimostrato che nei complessi di Pt(IV) aventi leganti assiali carbossilati alifatici l'attività citotossica aumenta all'aumentare degli atomi di carbonio presenti sulla catena⁴⁷.

I valori dei fattori di capacità $\log k'_0$ sono stati ottenuti mediante la procedura descritta nel capitolo 2 e vengono mostrati in tabella 4.1.

Composti	$\log k'_0$
3	-0.567
1a	2.26
1b	2.34
1c	3.30
4	-0.131 ^a
2a	3.02
2b	2.55
2c	3.68

Tabella 4.1 Valori di $\log k'_0$ per i complessi studiati. a) valori tabulati⁴⁸

Tutti i complessi di Pt(IV) risultano essere molto più lipofili (possiedono maggiori valori di $\log k'_0$) rispetto alle corrispondenti specie di Pt(II) (composti **3** e **4**).

Le differenze tra i valori di $\log k'_0$ dei complessi **a-c** di una stessa serie sono veramente minime. Infatti, l'introduzione di uno o due gruppi metilenici tra il fenile ed il gruppo carbonilico non comporta effetti rilevanti sul grado di lipofilità, al contrario di quanto ci si sarebbe aspettato.

⁴⁷ S. Shamsuddin, C. C. Santillan, J. L. Stark, K. H. Whitmire, Z. H. Siddik, A. R. Khokhar, J. Inorg. Biochem. 1998, 71, 29–35

⁴⁸ G. Ermondi, G. Caron, M. Ravera, E. Gabano, S. Bianco, J. Platts, D. Osella, *Molecular Interaction Fields vs quantum-mechanical-based descriptors in the modelling of lipophilicity of platinum(IV) complexes*, Dalton Trans., 2013, 42, 3482-3489.

Infatti, i composti alifatici analoghi di formula generale *cis,cis,trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2(\text{carboxylato})_2]$ e $[\text{PtCl}_2(\text{dach})_2(\text{carboxylato})_2]$ mostrano un progressivo aumento di lipofilità all'aumentare del numero di gruppi metilenici sui leganti assiali^{49,50}.

Nys e Rekker suggeriscono un metodo per il calcolo della lipofilità classificato come “metodo additivo”, secondo il quale una molecola viene sezionata nei suoi frammenti base (gruppi funzionali o atomi) ed il suo valore di $\log P_{\text{oct}}$ si ottiene dai contributi di ogni singolo frammento⁵¹.

Questo approccio è stato validato sui complessi di Pt(IV) da Lippard⁵². Considerando un contributo costante di ogni “ PtA_2Cl_2 ” al valore di $\log k'_0$, questa procedura ha evidenziato per questa serie di complessi di Pt(IV) un *trend* irregolare: acido benzoico $\log P_{\text{oct}} = 1.87$, acido 2-fenilacetico $\log P_{\text{oct}} = 1.41$, acido 3-fenilpropionico $\log P_{\text{oct}} = 1.84$ ^{53,54}.

⁴⁹ P. Gramatica, E. Papa, M. Luini, E. Monti, M. B. Gariboldi, M. Ravera, E. Gabano, L. Gaviglio and D. Osella, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2010, 15, 1157–1169.

⁵⁰ J. A. Platts, G. Ermondi, G. Caron, M. Ravera, E. Gabano, L. Gaviglio, G. Pelosi and D. Osella, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, 16, 361–372.

⁵¹ M. S. Tute, in *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology (Methods and Principles in Medicinal Chemistry vol. 4)*, eds. V. Pliška, B. Testa and H. van de Waterbeemd, VCH Weinheim, 1996, pp. 7–26.

⁵² T. C. Johnstone and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 2013, 52, 9915-9920.

⁵³ T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86, 5175-5180.

⁵⁴ J. Iwasa, T. Fujita and C. Hansch, *J. Med. Chem.*, 1965, 8, 150-153.

4.3 Solubilità

La velocità di dissoluzione di un farmaco, assunto per via orale, nei fluidi gastrointestinali è spesso il fattore limitante il processo di assorbimento. La velocità di dissoluzione, dc/dt , di un solido in un liquido avviene in accordo con l'equazione di Noyes-Whitney:

$$dc/dt = K \cdot A \cdot (C_s - C_t)$$

dove dc/dt (variazione di concentrazione in funzione del tempo) è la velocità di dissoluzione, K è una costante di proporzionalità, A è l'area di superficie del solido, C_s rappresenta la solubilità del farmaco nel solvente e C_t la concentrazione del soluto al tempo t nel solvente circostante.

La Farmacopea Ufficiale classifica la solubilità secondo la scala riportata in tabella 4.2.

Indicazione	V di solvente (ml) per g di sostanza
solubilissimo	meno di 1
molto solubile	da 1 a 10
solubile	da 10 a 30
moderatamente solubile	da 30 a 100
poco solubile	da 100 a 1000
molto poco solubile	da 1000 a 10000
praticamente insolubile	più di 10000

Tabella 4.2 Solubilità di un farmaco

La conoscenza del comportamento alla dissoluzione e dei fattori che influenzano tale proprietà è quindi essenziale nella progettazione, nella valutazione e nel controllo dell'efficacia terapeutica delle forme farmaceutiche solide.

Procedure sperimentali e risultati

I valori di solubilità dei complessi di Pt(IV) **1a-1c** e **2a-2c** sono stati determinati attraverso la misura del contenuto di platino in un volume noto di soluzione satura, mantenuta alla temperatura di 25° C e in agitazione per 24 h. Il platino è stato quantificato tramite uno spettrometro ICP-AES Genesis (Spectro Analytical Instruments, Kleve, Germany) con un nebulizzatore di tipo *cross-flow*. Una soluzione di platino standard alla concentrazione di 1000 mg L⁻¹ è stata diluita con HNO₃ 1.0% (v/v) per preparare gli standard di calibrazione.

La procedura si suddivide in varie fasi:

- dissoluzione di ogni composto in un volume noto di H₂O deionizzata (1 mL) fino ad ottenimento di una soluzione satura;
- agitazione della soluzione a 25°C, al buio per 24 h;
- filtrazione della soluzione in modo da eliminare il complesso residuo non sciolto;
- diluizione del campione con HNO₃ all'1% per l'analisi ICP-AES.

Complessi di Pt(IV)	Solubilità (mM 10 ⁻²)
1a	30.4 ± 1.5
1b	31.2 ± 0.3
1c	12.1 ± 0.5
2a	1.06 ± 0.32
2b	13.6 ± 1.1
2c	5.05 ± 1.80

Tabella 4.3 Valori di solubilità ottenuti per i composti in esame

I risultati in tabella 4.3 mostrano una differenza di solubilità in acqua abbastanza netta tra le due serie di complessi. La serie **2** risulta molto più insolubile rispetto alla serie **1**. Inoltre, non è possibile osservare una diminuzione della solubilità all'aumentare della lunghezza della catena carbossilica, come è stato osservato per una serie analoga di complessi di Pt(IV) aventi leganti assiali dicarbossilati alifatici. Tuttavia, è interessante notare come in entrambe le serie il composto **b** risulti essere il più solubile.

4.4 Meccanismo d'azione intracellulare dei complessi di Pt(IV): attivazione mediante riduzione

Il meccanismo intracellulare secondo cui i complessi di Pt(IV) esercitano i loro effetti antitumorali può essere suddiviso in cinque fasi principali⁵⁵:

- Ingresso del farmaco all'interno della cellula
- Attivazione nel citosol (riduzione del Pt(IV) nella specie di Pt(II) attiva)
- Acquazione del complesso di Pt(II)
- Interazione e legame con il principale *target* biologico, ossia il DNA
- Risposta cellulare al danno del DNA

I complessi di Pt(IV) risultano essere meno reattivi dei corrispondenti composti di Pt(II) a causa della presenza di due ulteriori leganti assiali, che conferisce una maggiore stabilità di tali composti nei fluidi biologici. Questa caratteristica permetterebbe di ridurre l'insorgenza di effetti collaterali e favorirebbe la somministrazione per via orale.

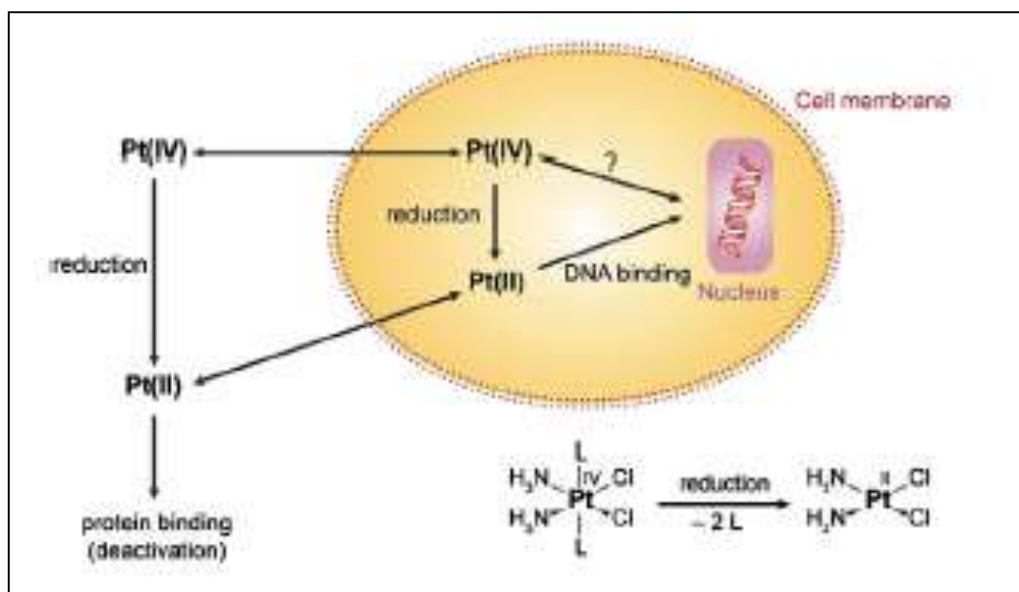


Figura 4.1: Meccanismo d'azione dei complessi di Pt(IV): una volta giunto nella cellula, il composto ottaedrico si riduce, perdendo i due leganti assiali (L) e dando origine al corrispettivo Pt(II), legandosi in seguito al suo principale *target* biologico. Se la riduzione si verifica all'esterno si va incontro ad una inattivazione del pro-farmaco.

⁵⁵ H. Kostřhunova, J. Kasparikova, D. Gibson, V. Brabec, *Studies on Cellular Accumulation of Satraplatin and Its Major Metabolite JM118 and Their Interactions with Glutathione*. Molecular Pharmaceutics Vol. 7, NO. 6, 2093-2102.

Dopo aver attraversato la membrana fosfolipidica mediante diffusione passiva, i complessi di Pt(IV) raggiungono il citosol dove vengono attivati per riduzione da sostanze come l'acido ascorbico (AA), il glutatione (GSH), l' α -tocoferolo, il NAD(P)H ed il citocromo c^{56} .

Nonostante la vasta disponibilità, si ritiene che il ruolo fondamentale sia svolto dal glutatione e dall'ascorbato. All'interno della cellula, infatti, si riscontra una maggiore concentrazione di queste specie, rispetto all'ambiente extracellulare.

Inoltre, l' α -tocoferolo risulta essere il più importante riducente liposolubile utilizzato dalle cellule. Esso è presente sulle membrane cellulari e nelle lipoproteine plasmatiche.

Per questi motivi è stato condotto uno studio sulla riduzione dei complessi **1a-1c** e **2a-2c** impiegando come agenti riducenti l'acido L(+)-ascorbico (AA), L-glutatione ridotto (GSH) e α -tocoferolo (Figura 4.2).

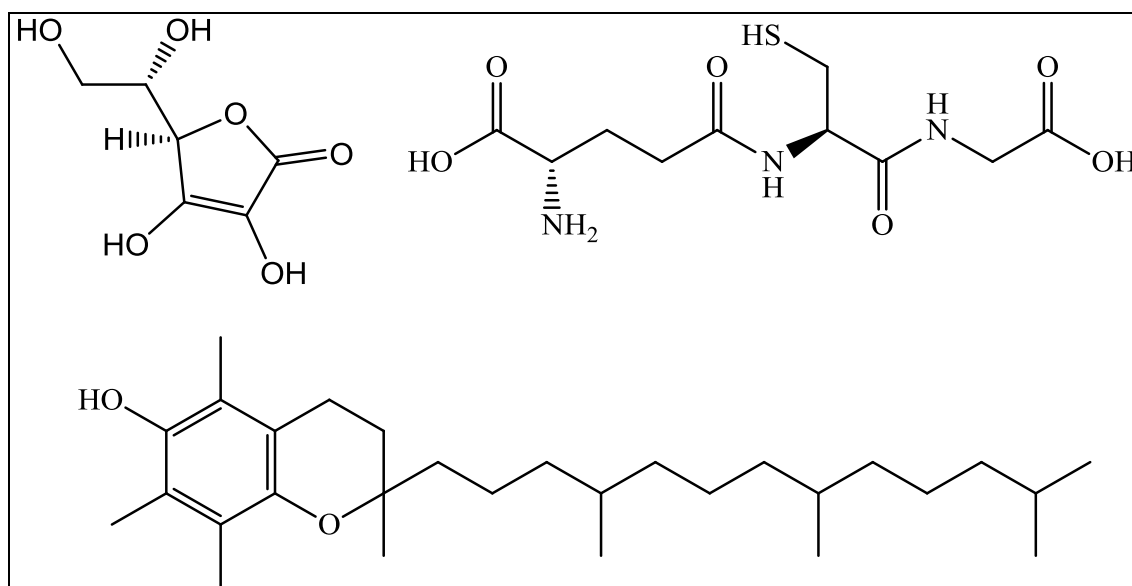


Figura 4.2 Strutture degli agenti riducenti utilizzati: acido L(+)-ascorbico, L-glutatione ridotto (GSH) e α -tocoferolo.

Il GSH è un tripeptide costituito da cisteina, glicina e glutammato. I primi due amminoacidi sono legati mediante un normale legame peptidico tra il gruppo amminico della glicina ed il gruppo carbossilico della cisteina. Il glutammato, al contrario, è legato alla cisteina mediante un legame peptidico atipico tra il gruppo carbossilico della catena laterale del glutammato stesso ed il gruppo amminico della cisteina (Figura 4.3).

⁵⁶ N. Graf, S. J. Lippard, *Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64, 993-1004.

Per quanto riguarda il meccanismo con cui avviene il processo di riduzione sono stati effettuati molti studi di tipo cinetico.

In alcuni casi si è parlato di un meccanismo che coinvolge la sfera esterna ed in altri di un meccanismo che coinvolge la sfera interna.

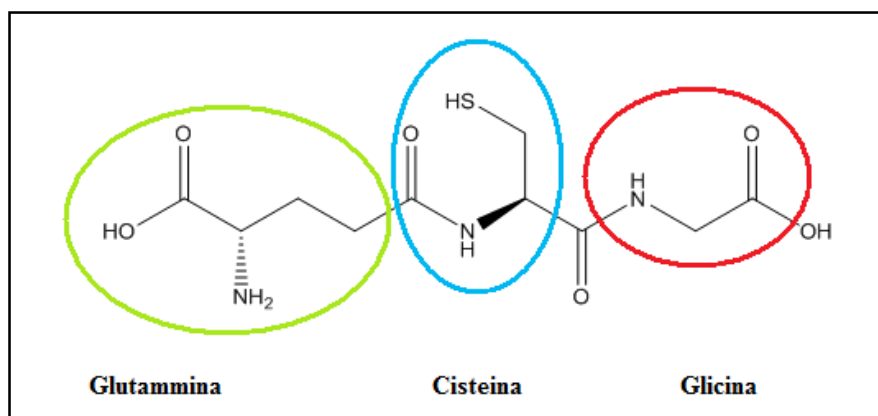


Figura 4.3 Struttura molecolare del Glutatione ridotto (GSH) in cui vengono messi in evidenza i suoi componenti costitutivi

In particolare, quest'ultimo prevede la formazione di legami a ponte tra un legante equatoriale cloruro del complesso di Pt(IV) ed un gruppo dell'agente riducente stesso (-OH per l'acido ascorbico ed -SH per il glutatione).

Alcuni ricercatori hanno invece proposto un processo riduttivo suddiviso in due fasi: nel corso del primo step si verifica una riduzione che coinvolge un elettrone e porta all'ottenimento di un Pt(III) e di un radicale ascorbato, mentre nel secondo step si verifica un'ulteriore riduzione mediante l'impiego di un solo elettrone per ottenere un Pt(II).

Da altri studi è risultato come i complessi di Pt(IV) che presentano leganti cloruro equatoriali in *trans* tra loro prediligano il meccanismo di sfera interna, formando relativi complessi di Pt(II) in cui i leganti cloruro sono stati sostituiti da quelli che prima erano i leganti assiali. La presenza, invece, di leganti cloruro in *cis* prevede l'impiego dell'altro meccanismo, ossia a sfera esterna, conducendo al prodotto con i leganti cloruro equatoriali⁵⁷.

E' possibile fare un discorso analogo per il glutatione: anche in questo caso, i due isomeri dello stesso complesso possono essere ridotti con meccanismi diversi.

Tuttavia, non è ancora possibile definire un preciso meccanismo di attivazione per riduzione per ciascun complesso di Pt(IV). Certo è che, se il meccanismo di riduzione

avviene per sfera interna, la facilità di rottura e formazione di legami è fondamentale per fare avvenire la reazione e di conseguenza l'ingombro sterico dei reagenti svolge un ruolo importante. Il potenziale di riduzione dà solo un'informazione termodinamica ma la cinetica di reazione può essere determinante. Si è verificato sperimentalmente che complessi contenenti OH^- o Cl^- sono ridotti più velocemente di quelli che contengono solo ammine e carbossilati.

Procedure sperimentali e risultati

L-Glutatione ridotto (GSH)

Le cinetiche di riduzione dei complessi di Pt(IV) **1a-1c** e **2a-2c** con il glutatione ridotto sono state seguite mediante spettrofotometria UV. La procedura⁵⁸ prevede la preparazione di soluzioni 32 μM dei complessi di Pt(IV) in esame in una soluzione 16 mM di GSH in Tris-HCl 0.1 mM + NaCl 4.6 mM (pH = 7.4) con 1% di EtOH come cosolvente. Il rapporto tra le concentrazioni di GSH e Pt è tale da simulare i valori che si raggiungono in clinica tra tioli e composto metallico.

Le soluzioni sono state analizzate a 260 nm (l'aumento di assorbanza indica la formazione di legami Pt-S e S-S) ed i dati raccolti sono stati elaborati per ottenere una curva di assorbanza in funzione del tempo (circa 48 h).

Per tutti e 6 i complessi analizzati sono state rilevate soltanto trascurabili variazioni di assorbanza, spesso non riproducibili ed imputabili all'inevitabile ossidazione del GSH in soluzione. Il glutatione si è quindi rivelato un agente riducente inefficace per questo tipo di complessi di Pt(IV), in accordo a quanto osservato per altri composti a base equatoriale *cis*⁵⁹ come il satraplatino.

Acido L(+)-Ascorbico (AA) e α -tocoferolo

Le cinetiche di riduzione dei complessi di Pt(IV) **1a-1c** e **2a-2c** con α -tocoferolo e acido L(+)-Ascorbico sono state seguite mediante tecnica HPLC-MS, che ha permesso di misurare il tempo di semi-vita (ossia il tempo impiegato per ridurre metà picco cromatografico del composto in esame) e di identificare le specie risultanti dalla reazione di riduzione.

⁵⁸ J. C. Dabrowiak, J. Goodisman, A. K. Soud, *Kinetic study of the reaction of cisplatin with thiols*. Drug Metab. Dispos. 30, 2002, 1378–1384.

⁵⁹ E. Wexselblatt, D. Gibson, *J Inorg Biochem.* 9, 2012, 117:220.

La procedura prevede l'impiego di un eccesso molare di 1:10 Pt : agente riducente in una soluzione di MeOH/Hepes (70/30 MeOH/Hepes per l'AA e 95/5 MeOH/Hepes per l' α -tocoferolo). E' stata utilizzata una colonna C18 ed una fase mobile costituita da metanolo ed acido formico 15 mM, nei rapporti di seguito riportati:

- 90/10 MeOH/HCOOH per i complessi **1a-1c** e **2a-2c** con α -tocoferolo
- 70/30 MeOH/HCOOH per i complessi **1a,1b,2a,2b** con AA
- 80/20 MeOH/HCOOH per i complessi **1c,2c** con AA.

Il processo di riduzione è stato seguito ad intervalli di 20 minuti fino a completa riduzione, ad una temperatura di 37° C, monitorando la diminuzione dell'area sottesa al picco cromatografico dei complessi di Pt(IV).

Per la riduzione con α -tocoferolo i risultati sembrano riflettere quanto già mostrato dall'impiego del glutatione ridotto: non è stato registrato alcun cambiamento del profilo cromatografico dei complessi **1a-1c** e **2a-2c** nel corso dell'intero esperimento (48 h).

L' α -tocoferolo non sembra dunque essere un buon agente riducente per questo tipo di complessi di Pt(IV).

La riduzione dei complessi **1a-1c** e **2a-2c** con acido L(+)-ascorbico mostra invece risultati differenti. Le condizioni sperimentali impiegate, frutto di un compromesso che ha reso possibile solubilizzare sia i complessi di Pt(IV) sia l'AA, hanno influenzato l'accuratezza dei tempi di semi-vita misurati: 16.5 h per **1a**, 38 h per **1b**, 57 h per **1c**, 12 h per **2a**, 11 h per **2b** e 16 h per **2c**.

E' stato comunque possibile notare come la serie di complessi **2** mostri una più alta velocità di riduzione rispetto alla serie **1**. E' probabile infatti che leganti equatoriali ingombrati, come il dach, siano in grado di destabilizzare i complessi esa-coordinati di Pt(IV), causando una più veloce riduzione alla specie tetra-coordinata di Pt(II).

Gli spettri di massa acquisiti durante le riduzioni mostrano la diminuzione del picco del Pt(IV) e la progressiva formazione dei complessi **3** e **4**, insieme ai corrispondenti prodotti di solvolisi.

La riduzione non è infine associata a nessun specifico riarrangiamento della sfera di coordinazione, come trovato in alcuni processi simili^{60,61}.

⁶⁰ M. Ravera, E. Gabano, I. Zanellato, I. Bonarrigo, E. Escibano, V. Moreno, M. Font-Bardia, T. Calvet and D. Osella, *Dalton Trans.*, 2012, 41, 3313–3320.

4.5 Test di vitalità cellulare

La ricerca di potenziali farmaci antitumorali ha come obiettivo principale la determinazione della potenza e dell'efficacia dei composti in esame attraverso specifici *test* condotti *in vitro* ed *in vivo*.

Questi studi vengono eseguiti su opportuni modelli cellulari, di tipo tumorale e non, al fine di individuare una possibile azione del farmaco:

- citostatica, se blocca la proliferazione cellulare;
- citotossica, se innesca un meccanismo di morte cellulare che può accompagnare il blocco della proliferazione;
- anti-metastatica, quando impedisce la sopravvivenza in assenza di adesione, la capacità di degradare la matrice, di migrare attraverso di essa ed il flusso sanguigno, e di colonizzare nuovi siti.

Per agente citotossico si intende un composto in grado di provocare la morte cellulare, mentre un farmaco viene considerato citostatico se capace di fermare la riproduzione cellulare.

Il danno al DNA e l'induzione di apoptosi sono conseguenze del meccanismo citotossico primario di molti agenti antitumorali, quali gli agenti alchilanti, i composti di platino, gli inibitori della topoisomerasi e gli antimetaboliti. Poiché la sintesi del DNA risulta direttamente coinvolta nel fenomeno di citotossicità, alcuni studi mostrano come solo le cellule in fase S siano sensibili a questo tipo di agenti.

E' importante sottolineare che molti farmaci classificati come citotossici possono essere anche citostatici e causare ritardi nella crescita cellulare nei modelli preclinici.

Inoltre, le condizioni di sperimentazione *in vitro* ed *in vivo* spesso influenzano la determinazione di citotossicità e citostaticità.

I *test* di vitalità cellulare permettono di quantificare le cellule vive rimanenti dopo il trattamento con il farmaco in esame.

Esistono diversi tipi di *test* di vitalità cellulare:

- adesione al supporto e quantificazione della massa residua di proteine/acidi nucleici con il saggio del DNA, del cristalvioletto e del blu di metilene;

⁶¹ A. Nemirovski, I. Vinograd, K. Takrouri, A. Mijovilovich, A. Rompel and D. Gibson, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 1842–1844.

- attività metabolica e mitocondriale con il saggio dell'ATP, dell'MTT/XTT e della resazurina;
- capacità di riproduzione con il saggio clonogenico e della ^3H -timidina.

Tramite i *test* di citotossicità, invece, è possibile quantificare le cellule morte determinando la vitalità per differenza con il numero di cellule nel campione di controllo non trattato.

Esistono diverse tipologie di *test* di citotossicità:

- integrità della membrana plasmatica, lisosomiale e mitocondriale con il saggio della lattato deidrogenasi (LDH), del *trypan blue* e del *neutral red*;
- modalità di apoptosi con il saggio del citocromo c e dell'attivazione delle caspasi.

4.5.1 Mesotelioma pleurico maligno MPM

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore altamente aggressivo che origina dal mesotelio, la sottile membrana che riveste e protegge i polmoni, ed è associato principalmente all'esposizione all'amianto per motivi lavorativi o ambientali.

Questo tumore è caratterizzato da versatilità fenotipica (insieme di tutte le caratteristiche osservabili come la morfologia, lo sviluppo, le proprietà biochimiche e fisiologiche) che va dal tipo epitelioide a quello sarcomatoide, con combinazione di entrambi (misto o bifasico):

- il mesotelioma epitelioide colpisce specificamente le cellule epiteliali, che vanno a costituire il tessuto che riveste la parete esterna degli organi interni;
- il mesotelioma sarcomatoide può verificarsi in molti punti del tessuto mesoteliale, ed è classificato dalla presenza di cellule ovali ed irregolari, con un nucleo dai contorni non bene distinti e poco visibili;
- il mesotelioma bifasico è diagnosticato in quei pazienti in cui si ha un riscontro sia di cellule epitelioidee e sia di cellule sarcomatoidi miste fra loro o in aree separate del tumore.

La terapia sistemica è l'unico trattamento possibile per la maggior parte dei pazienti (spesso solo con finalità palliative), anche se i tassi di risposta alla chemioterapia di combinazione non sono elevati, con una sopravvivenza media di circa un anno dalla diagnosi. Infatti, a causa del lungo periodo d'infiammazione dovuto all'esposizione

delle fibre di amianto, le cellule MPM sono caratterizzate da una elevatissima chemio-resistenza intrinseca.

Protocolli clinici chemioterapici includono il cisplatino insieme ad altri farmaci antitumorali con differenti meccanismi d'azione (soprattutto antimetaboliti): la terapia *gold-standard* consiste nella combinazione di cisplatino e pemetrexed⁶², un antifolato. Quest'ultimo può essere sostituito dalla gemcitabina.

4.5.2 *Colture cellulari*

Le linee cellulari utilizzate in questo lavoro per la determinazione dell'inibizione di crescita da parte dei complessi di Pt(IV) in esame sono:

- tre linee cellulari di mesotelioma pleurico maligno, MPM, chiamate BR95 (epiteloidi), MM98 (sarcomatoidi) e MG06 (miste con predominanza di epiteloidi). Tali linee cellulari tumorali sono state ottenute dall'Ospedale di Alessandria (Unità di Patologia e Biobanca del Mesotelioma);
- cellule non tumorali di mesotelio HMC (*human mesothelial cells*) isolate da asportazione chirurgica di appendicite (Unità Chirurgia Pediatrica).
- due linee cellulari umane: carcinoma ovarico A2780 e carcinoma al colon HCT116. Tali linee sono state acquistate dalla ECACC (*European Collection of Cell Cultures*, UK).

Le linee HMC, BR95 e MG06 sono state fatte crescere con il terreno Ham's F-10 (GIBCO, Invitrogen Life Science, San Giuliano Milanese, Italia), mentre per la linea di sarcomatoidi è stato usato il DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich).

Le cellule A2780 e A549 sono state coltivate in RPMI1640 (Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium), mentre il terreno McCoy's 5A è stato usato per la linea HCT116.

A tutti i terreni sono stati aggiunti L-glutamina (2 mM), penicillina 100 IU mL⁻¹, streptomina (100 mg L⁻¹) e siero bovino fetale (FBS) 10%.

I trattamenti sono stati seguiti a 37°C in una incubatore umidificato con il 5% di CO₂ per 72h mediante un trattamento continuo (CT).

⁶² H.L. Kindler, *Curr. Treat. Options Oncol.* 9, 2008, 171–179.

Il cisplatino viene sciolto in una soluzione di NaCl 0,9% (pH 3 corretto con HCl, concentrazione soluzione standard 1 mM). Tutti i complessi di Pt(IV) vengono sciolti in etanolo (concentrazione soluzione madre 5 mM) e conservati a -66°C . Le soluzioni concentrate vengono diluite nel terreno fino alla concentrazione richiesta. La concentrazione dell'etanolo, usato come co-solvente, non supera lo 0,2% finale, concentrazione non tossica per le cellule testate.

4.5.3 Saggio della resazurina

La determinazione dell'integrità della membrana e della vitalità cellulare in risposta a farmaci, agenti chimici, ambientali ed alimenti può essere misurata attraverso il saggio della resazurina⁶³.

In caso di danno cellulare, l'enzima intracellulare lattato deidrogenasi (LDH) viene rilasciato rapidamente nel terreno cellulare. La vitalità cellulare è pertanto inversamente proporzionale alla quantità di LDH rilasciato. Si avrà l'ossidazione di NADH in NAD^+ per concomitante riduzione del piruvato a lattato. La quantità di LDH rilasciata viene misurata grazie ad una reazione enzimatica accoppiata che consiste nella conversione della resazurina nella fluorescente resorufina ad opera di una diaforasi (Figura 4.4).

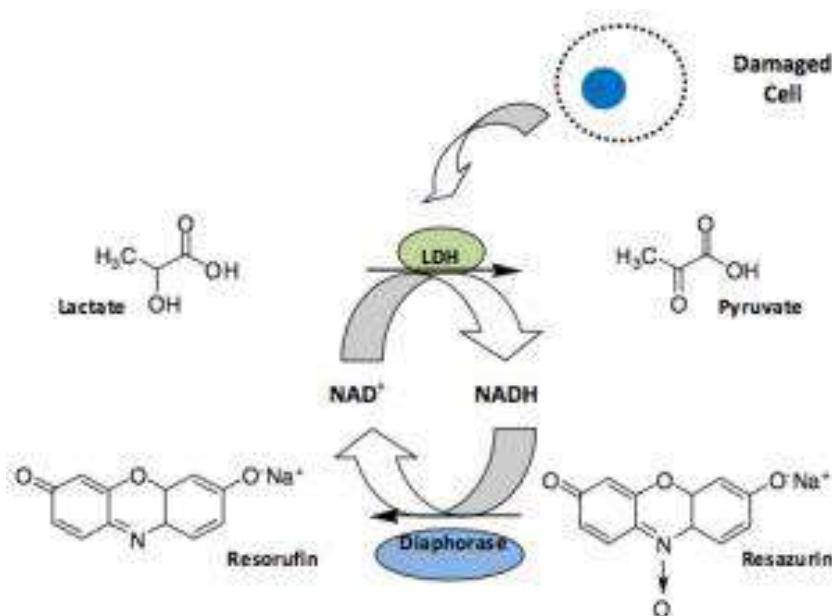


Figura 4.4 Schema di reazione

⁶³ E. Magnani, E. Bettini, Brain Res. Protoc. 5, 2000, 266–272.

Le cellule vengono seminate in una piastra da 96 pozzetti. Alla fine del trattamento, vengono aggiunti 10 µg/mL di resazurina (Acros Chemicals, Francia) nel terreno fresco per 1h a 37°C e la quantità di prodotto ridotto, la resofurina, viene misurata in fluorescenza (eccitazione a 535 nm ed emissione a 595 nm) con un lettore di piastre Tecan Infinite F200Pro (Tecan Austria).

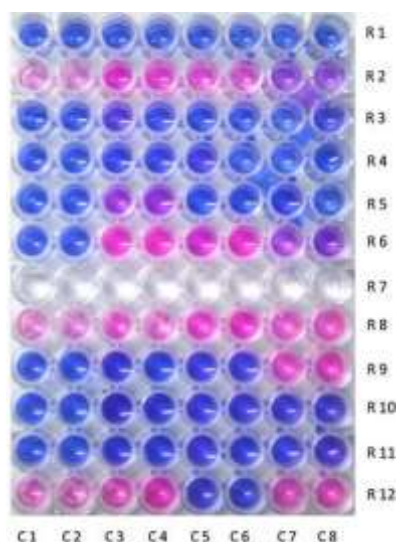


Figura 4.5 Piastra da 96 pozzetti

In ogni esperimento, le cellule vengono trattate con concentrazioni differenti di farmaco e i dati finali di tossicità vengono calcolati su almeno tre repliche indipendenti dello stesso esperimento effettuate in triplicato.

La fluorescenza misurata negli otto pozzetti contenenti il terreno senza cellule viene usata come bianco. I dati ottenuti vengono normalizzati al 100% di vitalità cellulare per le cellule non trattate (controllo).

Alla fine si otterrà un valore di IC_{50} (*half inhibiting concentration*) definito come concentrazione del farmaco in grado di ridurre del 50% la vitalità cellulare. L' IC_{50} viene ricavato mettendo in relazione la risposta farmacologica con il log della concentrazione del farmaco ed ottenendo una curva con andamento sigmoide (curva dose-risposta graduale, Figura 4.6).

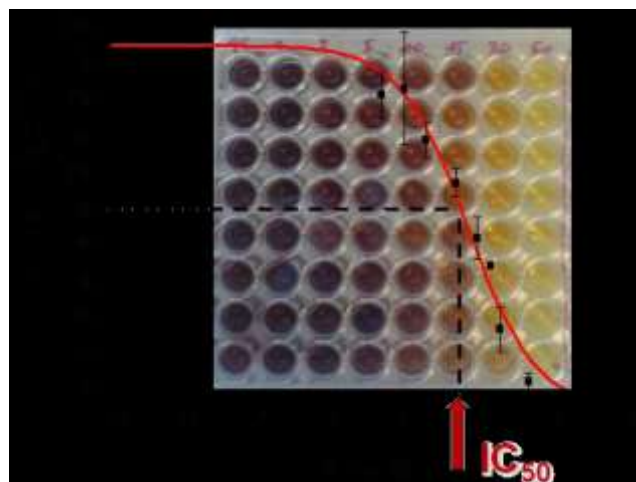


Figura 4.6 Curva dose-risposta

Nel caso del MPM dall'insieme dei dati ottenuti è possibile ricavare altri due importanti parametri: SI (*Selectivity Index*) e RF (*Resistance Factor*).

SI viene calcolato dal rapporto tra il valore di IC_{50} della linea di cellule non tumorali HMC e la media delle IC_{50} ottenute su tutte le linee di mesotelioma (MPM); l'indice di selettività indica la capacità di un farmaco di produrre un effetto in modo selettivo sulle cellule malate rispetto a quelle sane dello stesso fenotipo.

RF viene calcolato dal rapporto tra la IC_{50} della linea cisplatino-resistente MM98R e la IC_{50} della linea MM98. Un basso fattore di resistenza di un farmaco porta a concludere che lo stesso mantenga una buona citotossicità anche su cellule divenute resistenti al cisplatino (che ha un RF ovviamente elevato).

4.5.4 Risultati

In tabella 4.4 vengono riportati i valori di IC_{50} , di RF e di SI dei complessi **1a-1c** e **2a-2c** e dei due Pt(II) corrispondenti, **3** e **4**, usati come riferimento per l'interpretazione dei risultati.

Tutti i complessi di Pt(IV) studiati risultano essere più attivi dei corrispettivi Pt(II) su tutte le linee cellulari tumorali prese in considerazione. In particolare, la linea A2780 mostra valori di IC_{50} più bassi di circa 2 ordini di grandezza rispetto ai composti **3** e **4** e di un ordine di grandezza per la linea MPM.

Come già osservato per altri complessi a base di platino, le linee cellulari epiteliali BR95 e MG06 risultano più chemio-resistenti rispetto alle sarcomatose MM98. Sulle HTC-116 l'aumento della potenza citotossica è molto più pronunciato per i complessi della serie **2** rispetto alla **1**.

In generale, i composti **2a-2c** risultano più citotossici dei **1a-1c**, a causa della più alta lipofilità del legante dach rispetto alle due molecole di ammoniaca. Al contrario, all'interno di ogni serie i valori di IC_{50} sono abbastanza simili tra di loro.

Infine, tutti i complessi mostrano un alto valore di SI, suggerendo una bassa selettività verso le cellule tumorali ed un basso RF, indicando una buona abilità nel superare i meccanismi di resistenza al cisplatino. In particolare, i composti della serie **2** hanno valori di RF più bassi rispetto ai composti della serie **1**, a causa dell'alta lipofilità del dach e delle differenze strutturali dei metaboliti di Pt(II) **3** e **4**.

Cmpd	IC ₅₀ [μ M]						
	A2780	HCT 116	BR95	MG06	MM98	MM98R	HMC
3	0.5±0.1	2.3±0.3	6.2±0.9	4.1±1.5	3.2±1.0	19.4±2.8 [6.1]	6.7±1.2 (1.5)
1a	4.0±0.1×10 ⁻⁶	54.0±10.0×10 ⁻⁶	0.33±0.09	0.48±0.09	0.12±0.03	0.47±0.08 [3.9]	0.32±0.05 (1.0)
1b	49.6±3.6×10 ⁻⁶	0.21±0.05	1.97±0.64	1.24±0.57	0.64±0.28	1.23±0.33 [1.9]	4.16±0.80 (3.2)
1c	5.4±0.1×10 ⁻⁶	51.0±5.2×10 ⁻⁹	0.53±0.27	0.71±0.15	0.20±0.07	0.44±0.12 [2.2]	0.90±0.42 (1.9)
4	0.12±0.04	0.27±0.03	1.0±0.2	0.8±0.2	2.2±0.4	2.5±0.6 [1.1]	0.8±0.1 (0.6)
2a	2.2±0.3×10 ⁻⁶	2.4±0.7×10 ⁻⁶	21.7±4.9×10 ⁻⁶	38.0±20.8×10 ⁻⁶	15.0±3.3×10 ⁻⁶	18.0±3.5×10 ⁻⁶ [1.2]	0.13±0.08 (5.2)
2b	1.3±0.1×10 ⁻⁶	2.7±0.6×10 ⁻⁶	14.0±7.1×10 ⁻⁶	82.0±21.2×10 ⁻⁶	62.2±17.9×10 ⁻⁶	71.6±37.2×10 ⁻⁶ [1.2]	0.15±0.08 (2.8)
2c	3.6±0.9×10 ⁻⁶	4.9±1.1×10 ⁻⁶	19.3±5.5×10 ⁻⁶	90.4±8.0×10 ⁻⁶	58.1±19.1×10 ⁻⁶	32.9±9.7×10 ⁻⁶ [0.6]	0.23±0.07 (4.1)

Tabella 4.4 Valori di IC₅₀ (M) dopo 72h di trattamento continuo (CT). Dati espressi come media ± deviazione standard di almeno 3 repliche indipendenti. Gli (SI) e gli [RF] sono riportati tra parentesi.

4.6 Accumulation cellulare

L'abilità dei complessi a base di platino di inibire la crescita tumorale è il risultato di una combinazione di fattori, tra i quali la diffusione attraverso la membrana cellulare, l'accumulo intracellulare e la reattività verso il DNA nucleare che porta alla distorsione della doppia elica.

L'*accumulation* cellulare rappresenta il valore risultante, ad un certo tempo di trattamento, tra la quantità di farmaco che entra nella cellula (*uptake* o influsso) e quella che viene eliminata da trasportatori e pompe varie.

L'*accumulation* è il primo step del meccanismo d'azione del farmaco nelle cellule tumorali. Il contenuto di platino intracellulare è infatti un fattore molto importante per determinare l'azione citotossica del composto in esame e la resistenza farmacologica.

La procedura utilizzata per la determinazione dell'*accumulation* cellulare dei complessi di Pt risulta molto più semplice rispetto a quella generica usata per i composti organici. Infatti, nonostante i complessi di Pt(IV) vadano incontro a varie reazioni di riduzione e acquazione, la quantità di metallo intracellulare (che viene misurato a livello atomico tramite spettroscopia di assorbimento atomico AAS o spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente ICP-MS) corrisponde alla quantità di farmaco originariamente entrato.

Il cisplatino entra nelle cellule principalmente attraverso diffusione passiva. Infatti, l'*accumulation* è direttamente proporzionale alla sua concentrazione (legge di Fick), non è inibito da analoghi strutturali e non è saturabile. Fattori come l'ipertermia, le radiazioni o gli stimoli chimici causano un più elevato *uptake*, probabilmente dovuto ad una maggiore permeabilità della membrana cellulare.

Un'alternativa alla diffusione passiva è il sistema di trasporto mediato da proteine di membrana: alcuni agenti farmacologici, che non alterano la permeabilità di membrana, possono inibire l'*uptake* del cisplatino. E' stato dimostrato che la chemioresistenza dei farmaci a base di Pt mostra una correlazione con i cambiamenti nell'*uptake* e nell'efflusso del Cu e suggerisce che il cisplatino attraversi la membrana cellulare con un sistema di trasporto proteico (Ctr1) mediato, che normalmente controlla l'omeostasi del Cu.

E' stata evidenziata una connessione tra la proteina Ctr1, un trasportatore di Cu ad elevata affinità, ed il cisplatino. La mutazione del gene che codifica per la proteina Ctr1 porta ad un aumento della resistenza del cisplatino e ad una riduzione dei livelli di Pt

nelle cellule di topo. Mentre la sovra-espressione di Ctr1 umana porta ad un aumento dell'*uptake* del cisplatino nelle cellule. Anche la proteina ATP7B (Copper-transporting P-type adenosine triphosphate), che ha un ruolo importante nella regolazione dei livelli di Cu cellulare in questo caso in uscita (efflusso), è associata alla resistenza del cisplatino in vitro ed in vari tumori.

L'accumulo cellulare viene influenzato da diversi fattori come il tempo di trattamento, la concentrazione di farmaco ed il tipo di linea cellulare usata. Anche il protocollo di crescita delle cellule, il lavaggio delle cellule e la mineralizzazione influiscono sulla sua misura.

Come già descritto nel capitolo 1, l'attivazione tramite riduzione è necessaria affinché un complesso di platino(IV) possa legare il DNA; la platinazione del DNA in molti casi ha un andamento parallelo a quello dell'accumulo cellulare, con un tempo di latenza dipendente dalla cinetica di riduzione. Allo stesso tempo, i metaboliti dei complessi di Pt(IV) potrebbero essere eliminati attraverso i meccanismi di efflusso dei Pt(II). Quindi, la quantità finale degli addotti Pt-DNA che si formano è una conseguenza di tale equilibrio. Per il cisplatino, il valore IC₅₀ è inversamente correlato con la formazione di addotti platino-DNA, ma non è chiaro se i complessi di Pt(IV) agiscono in modo simile. Infatti, è stato osservato che a concentrazioni equimolari di cisplatino e del complesso JM216, si ha un maggiore accumulo cellulare per quest'ultimo ma un valore comparabile di platinazione del DNA, con conseguente minore attività in termini di IC₅₀ per il complesso JM216⁶⁴. La diversa attività è stata attribuita alla formazione di addotti di DNA di tipo diverso.

L'*accumulation* del Pt, A, è una misura normalizzata per numero di cellule, ma è poco confrontabile da un sistema sperimentale all'altro, in quanto dipende dalla concentrazione extracellulare del composto di Pt:

$$A = \frac{\text{ng Pt}}{10^6 \text{cellule}}$$

Perciò è conveniente esprimere la quantità di platino all'interno delle cellule dopo il trattamento come rapporto di accumulo⁶⁵ (*accumulation ratio* AR), definito come il

⁶⁴ L. Martelli, F. Di Mario, P. Botti, E. Ragazzi, M. Martelli, L. Kelland, *Biochem. Pharmacol.*, 74, 2007, 20–27.

⁶⁵ A. Ghezzi, M. Aceto, C. Cassino, E. Gabano, D. Osella, J. *Inorg. Biochem.*, 98, 2004, 73–78.

rapporto fra la concentrazione intracellulare di Pt e la concentrazione extracellulare (ovvero quella del mezzo di cultura). In questo modo si ottiene un valore indipendente dalla concentrazione iniziale:

$$AR = \frac{[Pt]_{IC}}{[Pt]_{EC}} = \frac{ng Pt}{PA_{Pt} \times V} \cdot \frac{1}{[Pt]_{EC}}$$

dove:

$[Pt]_{IC}$ = concentrazione di platino intracellulare

$[Pt]_{EC}$ = concentrazione di platino extracellulare

V = volume cellulare totale.

Il volume cellulare totale viene calcolato moltiplicando il volume cellulare ($V' \cdot [L]$) per il numero effettivo di cellule (10^6); il volume cellulare V' viene ricavato dal diametro (d, [μm]) cellulare ottenuto dalla lettura di un emocitometro automatico (Countess, Invitrogen).

In molti lavori riguardanti l'AR, il volume cellulare totale medio è sempre stato assunto pari a 2 pL (come riportato da Alberts et al.⁶⁶).

Per questo lavoro invece è stato determinato il volume reale come segue: prendendo in considerazione quattro linee cellulari (tabella 4.3) è possibile notare valori di volume cellulare differenti, quindi non è possibile utilizzare un unico valore, ma quello specifico per la linea presa in considerazione.

Linea cellulare	r (m) 10^{-6}	V (pL)
A2780	5.5	0.70
HCT-116	6.94	1.40
MM98	7.00	1.44
BR95	7.50	1.77

Tabella 4.3 Volumi cellulari a confronto per le linee principali

⁶⁶ B. Alberts , A. Johnson , J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, volume unico, p.1792 biologia molecolare ISBN 978-8808-20185-0 Casa Editrice: Zanichelli

Procedure sperimentali e risultati

La linea cellulare HCT 116 è stata seminata in piastre Petri da 10 mm o in *flasks* da 175 cm² e trattata con 10 µM dei complessi in esame per 4 ore (CT, *continuous treatment*). Alla fine dell'esposizione, le cellule sono state lavate tre volte con PBS, staccate dalle piastre Petri utilizzando tripsina 0,05% ed EDTA 2% e ricoltivate in terreno fresco. Per la conta cellulare è stato utilizzato un dispositivo automatico (Contessa®, Life Technologies) che misura il numero ed il diametro medio delle cellule. Dallo stesso campione, circa 5×10^6 cellule vengono usate per l'*accumulation* cellulare.

Le cellule sono state trasferite in una provetta di vetro borosilicato e centrifugate a 1100 rpm per 5 min. a temperatura ambiente fino ad ottenere un pellet cellulare che viene conservato a -80 °C fino a successiva mineralizzazione. I campioni dedicati alla misura dell'*accumulation* cellulare vengono scongelati e trattati con 300-350 µL di HNO₃ al 70% ed incubate per 1 ora a 60 °C in un bagno ad ultrasuoni. I campioni vengono diluiti in modo che la concentrazione finale di HNO₃ non superi il 5%.

Sono stati determinati i valori di AR per i 6 complessi di Pt(IV) in esame sulla linea cellulare HCT 116 dopo 4 h di trattamento.

L'*uptake* cellulare di ogni composto risulta più alto rispetto a quello del corrispettivo precursore di Pt(II) e questo giustifica il sostanziale aumento di citotossicità ed i più bassi valori di RF passando dagli analoghi Pt(II) a Pt(IV) (Figura 4.7).

I *test in vitro* confermano quindi quanto già riportato da Dyson¹ per una vasta serie di complessi di Pt(IV) aventi come leganti assiali carbossilati aromatici, ossia la mancanza di una stretta correlazione esistente tra lipofilità, *accumulation* e citotossicità (Figura 4.8).

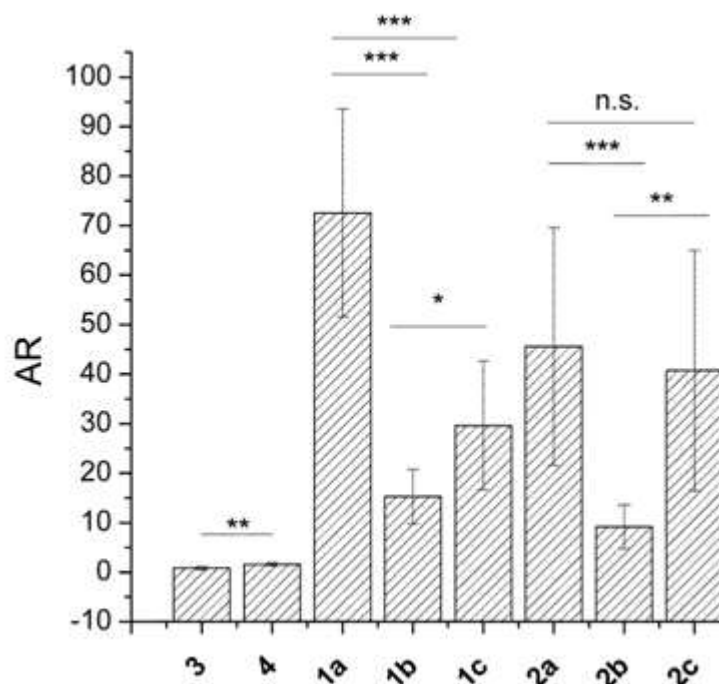


Figura 4.7 Valori di AR per i complessi **1a-1c** e **2a-2c** sulla linea cellulare HCT 116. I dati sono espressi come la media \pm deviazione std di 3 repliche indipendenti e sono stati confrontati con due campioni t-test (* $p < 0.5$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s. = statisticamente non significativi).

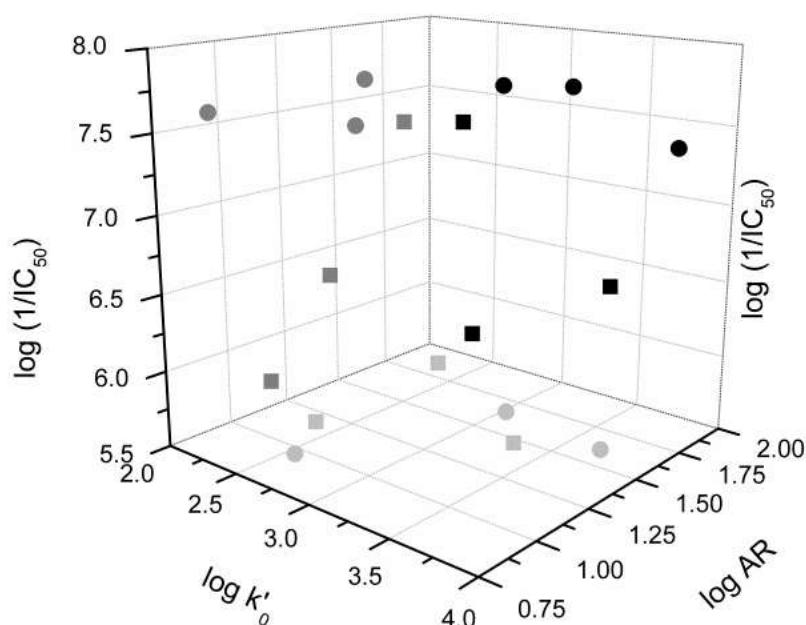


Figura 4.8 Grafico 3D che riporta la relazione tra lipofilit  (log k'_0), citotossicit  (log(1/IC₅₀)) e *accumulation ratio* sulle A2780 (log AR) per i complessi **1a-1c** (quadrati) e **2a-2c** (cerchi). Le proiezioni sui vari piani corrispondono alle rispettive correlazioni (in nero log(1/IC₅₀) vs. log k'_0 , in grigio scuro log(1/IC₅₀) vs. log AR, in grigio chiaro log AR vs. log k'_0).

4.7 *Trans,cis,cis-[Pt(C₆H₅CO₂)₂Cl₂(1,2-dach)]: potenziale candidato per il trattamento del carcinoma del colon-retto⁶⁷*

Il carcinoma del colon-retto è il terzo tumore maligno più frequente al mondo.

La chirurgia rappresenta il più importante presidio terapeutico nella lotta contro questo cancro, ma la terapia adiuvante risulta altrettanto fondamentale per evitare recidive dopo l'intervento. La combinazione di farmaci più efficace attualmente in uso viene chiamata "FOLFOX" e comprende l'impiego di acido folinico, 5-fluoroacetile e oxaliplatino (Figura 4.9.)⁶⁸.

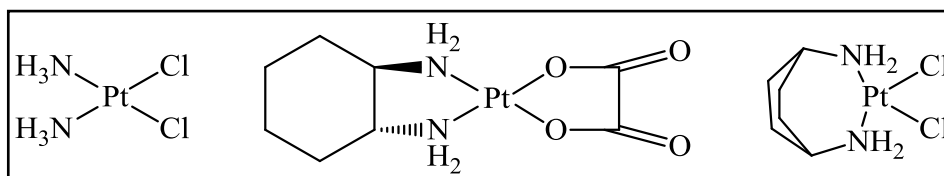


Figura 4.9 Cisplatino, oxaliplatino e kiteplatin

Questo farmaco a base di Pt(II) di terza generazione è stato progettato per eludere i meccanismi di resistenza al cisplatino, è molto più solubile di quest'ultimo ed è risultato sensibile a differenti linee cellulari, in particolare verso tumori Pt-resistenti come il cancro colon-rettale.

Le differenze tra cisplatino ed oxaliplatino, che riguardano la loro distribuzione nell'organismo, l'*accumulation* cellulare ed il meccanismo d'azione sul DNA, sono

⁶⁷ V. Gandin, C. Marzano, G. Pelosi, M. Ravera, E. Gabano, D. Osella, *Trans,cis,cis-Bis-(benzoato)dichlorido(cyclohexane-1R,2R-diamine)platinum(IV): a Prodrug Candidate for the Treatment of Oxaliplatin-Refractory Colonrectal Cancer*, *ChemMedChem*, 2014, 9, 1299-1305.

⁶⁸ a) D. Machover, E. Diaz-Rubio, A. de Gramont, A. Schilf, J. J. Gastiaburu, S. Brienza, M. Itzhaki, G. Metzger, D. N'Daw, J. Vignoud, A. Abad, E. Francois, E. Gamelin, M. Marty, J. Sastre, J. F. Seitz, M. Ychou, *Ann. Oncol.* 1996, 7, 95–98; b) S. Giacchetti, B. Perpoint, R. Zidani, N. Le Bail, R. Faggiuolo, C. Focan, P. Chollet, J. F. Llory, Y. Letourneau, B. Coudert, F. Bertheaut-Cvitkovic, D. Larregain-Fournier, A. Le Rol, S. Walter, R. Adam, J. L. Misset, F. Livi, *J. Clin. Oncol.* 2000, 18, 136– 147; c) M. L. Rothenberg, A. M. Oza, R. H. Bigelow, J. D. Berlin, J. L. Marshall, R. K. Ramanathan, L. L. Hart, S. Gupta, C. A. Garay, B. G. Burger, N. Le Bail, D. G. Haller, *J. Clin. Oncol.* 2003, 21, 2059– 2069; f) R. M. Goldberg, D. J. Sargent, R. F. Morton, C. S. Fuchs, R. K. Ramanathan, S. K. Williamson, B. P. Findlay, H. C. Pitot, S. R. Alberts, *J. Clin. Oncol.* 2004, 22.

ascrivibili alla presenza di un legante diamminico chelante ed ingombrante che induce differenti *crosslinks* Pt-1,2-*intrastrand* sulla catena del doppio filamento⁶⁹.

Al momento, nessun altro farmaco a base metallica è risultato attivo verso il carcinoma del colon-retto.

Recentemente sono stati riportati alcuni studi relativi al kiteplatino (Figura 4.9): l'attività di questo complesso è stata comparata a quella del cisplatino, dell'oxaliplatino e dell'omologo dicloruro⁷⁰, **4**.

Sebbene il meccanismo d'azione dell'oxaliplatino sia ancora poco conosciuto, la resistenza a questo farmaco è da imputare ad una serie di fattori come la diminuzione dell'*accumulation* cellulare, la bassa tossicità citoplasmatica ed una maggiore riparazione dei danni prodotti dagli addotti sul DNA⁷¹.

Nonostante i valori di lipofilità simili ed una egual propensione alla diffusione passiva, l'*accumulation* del kiteplatino risulta essere molto più alta rispetto a quella dell'oxaliplatino ed è aumentata di un fattore 1.9 sulle cellule oxaliplatino-resistenti.

La sorprendente bassa resistenza al kiteplatino (RF = 1.2) rispetto all'oxaliplatino (RF = 17) sembra causata proprio dai differenti *uptakes* cellulari di questi due farmaci. Inoltre, è ormai noto che gli addotti kiteplatino-DNA vengono rimossi da sistemi di riparazione cellulare meno efficienti rispetto a quelli utilizzati per gli addotti oxaliplatino-DNA. Questi ultimi risultano quindi meno efficaci verso l'inibizione della DNA polimerasi⁷².

Una via alternativa per superare la chemio-resistenza all'oxaliplatino nella terapia del cancro colon-rettale potrebbe essere rappresentata dall'inserimento del legante *carrier* 1R,2R-dach (lo stesso presente nell'oxaliplatino) in uno *scaffold* ottaedrico di Pt(IV) ad alta lipofilità (Figura 4.10).

In passato sono stati studiati molti complessi di Pt(IV) aventi come legante *carrier* 1R,2R-dach⁷³. Il più famoso è l'ormaplatino (PtCl₄(1R,2R-dach)) che è stato abbandonato alla fase I dei *trials* clinici a causa dell'alta neurotossicità.

⁶⁹ B. Spingler, D. A. Whittington, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* 2001, 40, 5596–5602.

⁷⁰ N. Margiotta, C. Marzano, V. Gandin, D. Osella, M. Ravera, E. Gabano, J. A. Platts, E. Petruzzella, J. D. Hoeschele, G. Natile, *J. Med. Chem.* 2012, 55, 7182–7192.

⁷¹ C. A. Rabik, M. E. Dolan, *Cancer Treat. Rev.* 2007, 33, 9–23

⁷² N. Margiotta, C. Marzano, V. Gandin, D. Osella, M. Ravera, E. Gabano, J. A. Platts, E. Petruzzella, J. D. Hoeschele, G. Natile, *J. Med. Chem.* 2012, 55, 7182–7192.

⁷³ S. R. A. Khan, S. Huang, S. Shamsuddin, S. Inutsuka, K. H. Whitmire, Z. H. Siddik, A. R. Khokhar, *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 515–521.

Il legante 1,2-dach esiste sottoforma di differenti isomeri (chiamati RR, SS, RS) e l'attività citotossica dei corrispondenti complessi di Pt(IV) sembra dipendere dal modello tumorale impiegato per gli studi *in vitro*⁷⁴. Il legante 1R,2R-dach si è dimostrato essere il miglior *carrier group*⁷⁵.

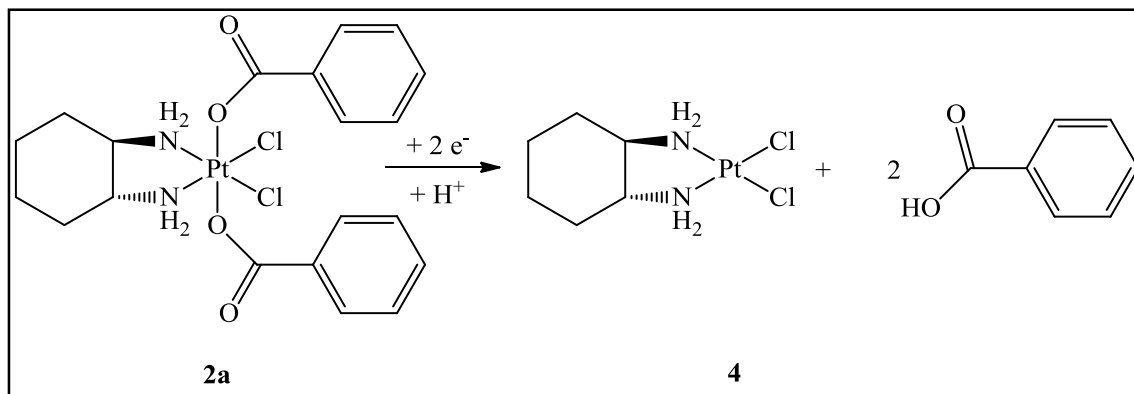


Figura 4.10 Riduzione del complesso **2a** che produce il suo metabolita attivo **4**.

Gli studi di citotossità e di *accumulation* cellulare che compaiono in questo lavoro²³ sono stati effettuati in collaborazione con la Prof.ssa Cristina Marzano e con la Dott.ssa Valentina Gandin presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco (Università di Padova).

Studi di citotossicità: procedura sperimentale e risultati

Le attività citotossiche del complesso **2a** e del corrispettivo Pt(II) **4** sono state testate *in vitro* su alcune linee cellulari tumorali di colon (HCT-115), di polmone (A549) e di ovaio (2008 e la variante cisplatino-resistente C13*). Sono state inoltre impiegate linee tumorali di colon (LoVo), la sua variante oxaliplatino-resistente (LoVo-OXP) ed una multi-resistente (LoVo-MDR).

Le cellule sono state mantenute a 37° C in atmosfera al 5% CO₂ usando il 10% di siero fetale, 50 U mL⁻¹ di penicillina, 50 mg mL⁻¹ di streptomina e 2 mM di l-glutamina in: a) un terreno RP-1640 per le linee HCT-15, 2008 e C13*, b) un terreno F-12 Ham's per le linee A459, LoVo, LoVo-OXP e LoVo-MDR.

⁷⁴ J. F. Vollano, S. Al-Baker, J. C. Dabrowiak, J. E. Schurig, J. Med. Chem. 1987, 30, 716–719.

⁷⁵ Z. H. Siddik, S. Al-Baker, G. Thai, A. R. Khokhar, Anti-Cancer Drug Des. 1994, 9, 139–151.

La citotossicità è stata valutata attraverso il *test* MTT dopo un trattamento di 72 h, con aumento delle concentrazioni dei composti.

Il *test* MTT è un *test* colorimetrico che permette di stimare il numero di cellule vive presenti in coltura e quindi di valutare l'effetto del trattamento con il farmaco sulla vitalità della popolazione cellulare. Il *test* si basa sulla capacità del composto MTT (sale di tetrazolio, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] di venire metabolizzato da un enzima mitocondriale, la succinato deidrogenasi. La riduzione del MTT porta alla formazione di cristalli di un prodotto blu, il formazano, insolubile in acqua. Le cellule vitali, a differenza di quelle non vitali, riducono il colorante MTT e l'ammontare del formazano prodotto è proporzionale al numero di cellule presenti. I cristalli formati vengono solubilizzati e i valori di assorbanza rilevati mediante lettura al Bio-Rad microplate reader a 570 nm.

Inoltre, come confronto sono state misurate le citotossicità del cisplatino e dell'oxaliplatino nelle stesse condizioni sperimentali. E' stata infine comparata una linea di fibroblastoma (CCD18-Co), utile per valutare la selettività dei composti in esame verso le varie tipologie di cellule tumorali.

In tabella vengono riportati i valori di IC₅₀ ottenuti, comparandoli con quelli del kiteplatin²⁵.

Compd	IC ₅₀ [µM]							
	HCT-15	A549	2008	C13*	LoVo	LoVo-OXP	LoVo MDR	CCD18-Co
cisplatino	11.32 ± 1.51	9.24 ± 1.08	2.22 ± 1.14	29.27 ± 3.17 (13.2)	9.12 ± 1.35	16.16 ± 3.36 (1.8)	9.06 ± 2.03 (1.0)	28.30 ± 1.53 [5.1]
oxaliplatino	1.15 ± 0.96	1.46 ± 0.54	1.53 ± 1.15	2.93 ± 1.31 (1.9)	0.89 ± 0.46	15.25 ± 2.24 (17.1)	1.36 ± 0.73 (1.5)	27.14 ± 2.17 [26.6]
kiteplatin	2.66 ± 0.95	2.01 ± 0.77	1.89 ± 1.04	1.77 ± 0.92 (0.9)	1.11 ± 0.45	1.29 ± 0.82 (1.2)	1.09 ± 0.46 (1.0)	15.24 ± 1.96 [4.0]
4	13.26 ± 2.73	17.36 ± 3.19	14.35 ± 3.00	27.52 ± 3.63 (1.9)	6.23 ± 2.34	12.86 ± 1.32 (2.0)	8.01 ± 0.74 (1.3)	33.89 ± 3.38 [3.5]
2a	0.051 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.05	0.058 ± 0.010 (0.6)	0.093 ± 0.030	0.068 ± 0.02 (0.7)	0.089 ± 0.02 (0.9)	0.57 ± 0.02 [8.1]

Tabella 4.5 Valori di IC₅₀ per i complessi studiati. I dati rappresentano la media ± dev. std calcolata su tre esperimenti indipendenti. In () vengono riportati i valori di RF, mentre in [] quelli di SI.

Il complesso **2a** ($\log'_0 = 3.02$) risulta molto più efficace del corrispettivo Pt(II) **4**, ($\log'_0 = -0.13$), del cisplatino, dell'oxaliplatino e del kiteplatin su tutte le linee cellulari prese in considerazione.

E' interessante notare come **2a** risulti di un ordine di grandezza più attivo sulle A549 rispetto all'analogo di benzoato a base cisplatino¹.

Il valore di RF sulle C13* diminuisce da 13.2 per il cisPt a 1.9 per l'oxaliplatino e per **4**, a 2 per **2a**. Questi dati supportano l'ipotesi secondo la quale il cisplatino e l'oxaliplatino mostrerebbero *patterns* di citotossicità diversi a causa della presenza di *carrier groups* differenti. Infatti gli addotti con il DNA indotti dall'oxaliplatino, a causa della loro

conformazione, impediscono la sua replicazione in maniera più efficiente rispetto a quelli formati dal cisplatino.

E' interessante notare che il complesso di Pt(IV) **2a**, basato sulla stessa struttura equatoriale del composto **4**, mostra valori molto più alti di citotossicità, a causa dell'alta lipofilicità conferita dai due leganti assiali aromatici.

La linea cellulare LoVo-OXP (che deriva dalla LoVo cresciuta in presenza di concentrazioni crescenti di oxaliplatino) risulta 17 volte più resistente all'oxaliplatino rispetto all'originale. Il complesso **4**, che presenta lo stesso *carrier group* del suddetto farmaco ma *leaving groups* cloruri, risulta solo moderatamente resistente, con un valore di RF = 2. Questo dato è abbastanza sorprendente se si pensa che il composto **4** e l'oxaliplatino producono lo stesso metabolita finale e quindi la stessa tipologia di addotti con il DNA.

In tabella 4.5 vengono inoltre riportati i risultati ottenuti su una linea tumorale di colon multi resistente (LoVo-MDR, *multidrug resistance*) in cui la resistenza alla doxorubicina è associata ad una sovraespressione di alcuni trasportatori di farmaco specifici, come la P-glicoproteina 170kDa, P-gp.

Per tutti i composti sono stati ottenuti risultati simili, sia sulle LoVo sia sulle LoVo-MDR, e questo suggerisce che i complessi studiati non sono substrati per la P-gp. Nonostante l'alta lipofilicità, il complesso **2a** non viene riconosciuto dalle pompe ATP-dipendenti⁷⁶. Al contrario Dyson¹, usando l'inibitore P-gp verapamil, aveva riscontrato che per il complesso *cis,cis,trans*-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OOC₆H₄CN)₂] l'efflusso cellulare veniva mediato proprio da questa tipologia di trasportatori.

Accumulation cellulare: procedura sperimentale e risultati

Gli esperimenti di *accumulation* sono stati condotti sulle linee cellulari LoVo e Lovo-OXP sopra descritte. Le cellule sono state trattate per 24 h con 5mM di oxaliplatino, di **4** e di **2a**. La concentrazione di platino è stata misurata mediante GF-AAS.

I risultati ottenuti vengono riportati in figura 4.11.

⁷⁶ M. D. Hall, M. Okabe, D. W. Shen, X. J. Liang, M. M. Gottesman, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008, 48, 495–535.

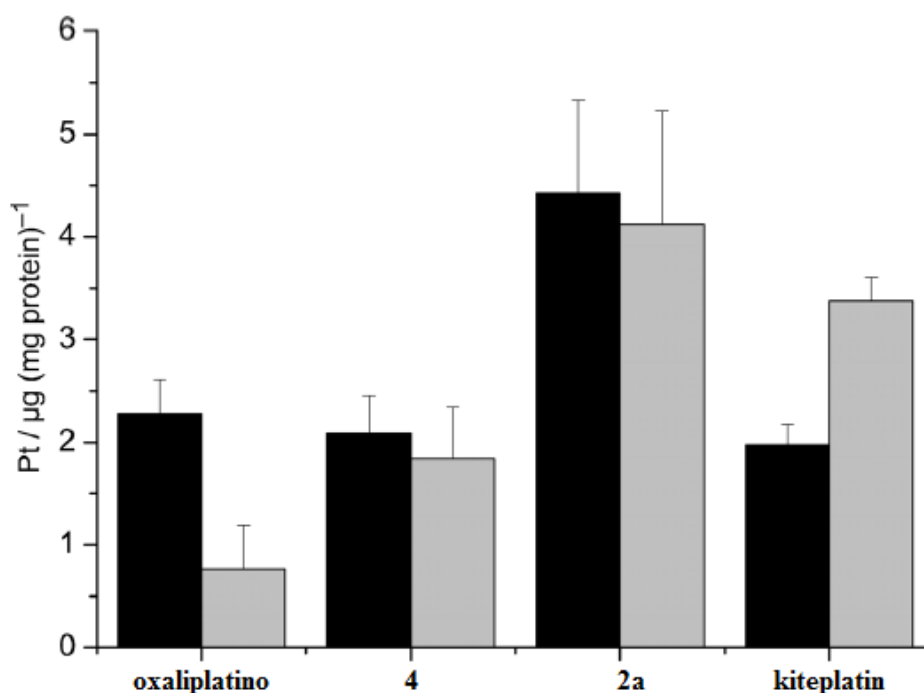


Figura 4.11 Accumulation cellulare dei complessi di platino in esame. Le linee LoVo (barre nere) e LoVo-OXP (barre grigie) sono state trattate con **2a**, **4**, oxaliplatino e kiteplatin²⁵ alla concentrazione 5µM.

Come precedentemente discusso, l'*accumulation* dell'oxaliplatino diminuisce sulle cellule resistenti, mentre quello del kiteplatin aumenta.

Il complesso di Pt(IV) **2a** mostra il maggiore *uptake*, seppure identico, sia sulle LoVo che sulle LoVo-OXP. La situazione è la stessa per il composto **4**, con un'*accumulation* ridotta della metà.

Data la maggiore lipoficità del complesso **2a** rispetto al composto **4**, il loro *uptake* sembra determinato dalla sola propensione alla diffusione passiva attraverso la membrana fosfolipidica, dove trasportatori specifici, certamente sensibili alla struttura del complesso, giocano solo un ruolo marginale.

Recenti studi condotti su linee cellulari di colon resistenti hanno evidenziato che la resistenza all'oxaliplatino dipende dalla diminuzione dell'*accumulation* cellulare⁷⁷.

⁷⁷ M. D. Hall, M. Okabe, D. W. Shen, X. J. Liang, M. M. Gottesman, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2008, 48, 495–535.

4.8 Conclusioni

In questa parte di lavoro sono state prese in considerazione due piccole serie di complessi di Pt(IV) aventi come leganti assiali dei carbossilati aromatici di diversa lunghezza.

Nonostante il generale aumento di lipofilità, di *accumulation* cellulare e di citotossicità, questi parametri non risultano strettamente correlati con la struttura dei composti, come era stato invece osservato per i complessi di Pt(IV) con leganti assiali carbossilati alifatici.

Inoltre, le cinetiche di riduzione di questi composti non evidenziano particolari relazioni struttura-attività.

Probabilmente i leganti aromatici interagiscono con i componenti cellulari attraverso *pathways* molto più complessi che non possono essere facilmente razionalizzati con lo studio dei semplici parametri chimico-fisici qui riportati.

Successivamente è stato condotto un ulteriore studio biologico con lo scopo di ottenere un nuovo composto in grado di superare i meccanismi di chemio-resistenza che coinvolgono l'oxaliplatino nella terapia del cancro colon-rettale.

Il complesso di Pt(IV) **2a**, scelto tra gli altri composti per le sue caratteristiche strutturali, è stato testato *in vitro* su un'ulteriore serie di linee cellulari tumorali.

Sebbene il complesso **2a** mostri le migliori *performances* in termini di attività antiproliferativa e di abilità di superare la chemio-resistenza, la sua selettività d'azione risulta comunque inferiore a quella dell'oxaliplatino.

L'aumento dell'attività del composto **2a** rispetto a quella dei suoi metaboliti, **4**, kiteplatin e cisplatino, è attribuibile all'alta lipofilità che favorisce l'*accumulation* cellulare attraverso diffusione passiva.

Di fatto, i fattori che determinano la potenza di un farmaco *in vitro* non sono necessariamente gli stessi che governano l'attività antitumorale *in vivo*. Per questa ragione l'attività antitumorale del complesso **2a** verrà valutata *in vivo* per cercare di comprendere il ruolo giocato dai leganti assiali e dai *carrier groups* sulla potenza dei farmaci.

Capitolo 5

*Sviluppo di sistemi di inclusione
per i complessi 1a-1c e 2a-2c con
le ciclodestrine*

5.1 Descrizione del lavoro

Le ciclodestrine (CDs) vengono impiegate in ambito farmaceutico per aumentare la solubilità in acqua dei farmaci attraverso la formazione di complessi di inclusione.

L'obiettivo di questa ultima parte di lavoro è stato quello di incrementare la solubilità in acqua dei composti di Pt(IV) studiati (paragrafo 4.3), **1a-1c** e **2a-2c**, attraverso sistemi di inclusione Pt(IV)/CD.

Gli addotti ottenuti sono stati caratterizzati mediante la tecnica $^1\text{H-NMR}$ e UV-Vis. Sono stati condotti studi di Light Scattering Dinamico per determinare le dimensioni dei complessi di inclusione isolati ed infine sono stati effettuati alcuni test *in vitro* per valutare l'attività citotossica e l'*accumulation* cellulare delle formulazioni ottenute.

5.2 Ciclodestrine

Le ciclodestrine (CDs) sono costituite da unità glucopiranosiche legate in forma ciclica a formare strutture a tronco di cono. Queste macromolecole comprendono tre prodotti naturali principali, definiti α -ciclodestrine, formate da sei residui glucosidici, β -ciclodestrine, formate da sette residui, e γ -ciclodestrine, che presentano otto residui (Figura 5.1).

La più comune è la β -ciclodestrina, che possiede 7 gruppi ossidrilici primari e 14 secondari⁷⁸.

I gruppi ossidrilici secondari del glucopiranosio (C2 e C3) sono situati a livello dell'estremità più larga del toroide mentre gli ossidrili primari (C6) si trovano attorno al margine inferiore, quello più stretto. La struttura presenta una cavità idrofobica costituita da atomi di idrogeno e da legami idrogeno tra gli H e gli O glicosidici⁷⁹. Il lato che mostra i gruppi ossidrilici secondari presenta un diametro maggiore rispetto a quello con gli ossidrili primari, poiché a questi è consentita una libera rotazione che causa la riduzione del diametro.

Gli elettroni di non legame dell'ossigeno glucosidico sono localizzati a livello della cavità, originando un'elevata densità elettronica che conferisce un carattere di base di Lewis.

⁷⁸ T. Loftsson, P. Jarho, M. Másson, T. Järvinen, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 2005, 335–351.

⁷⁹ H. Dodziuk, in: H. Dodziuk (Ed.), *Cyclodextrins and Their Complexes*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, 1–30.

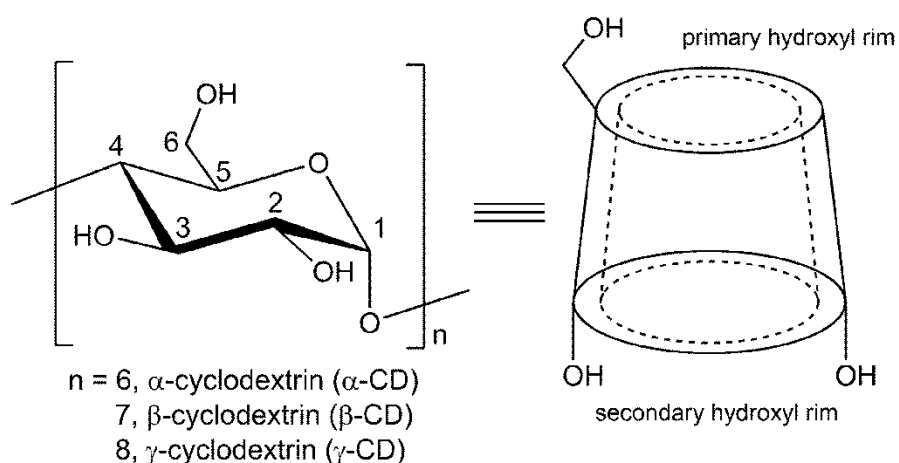
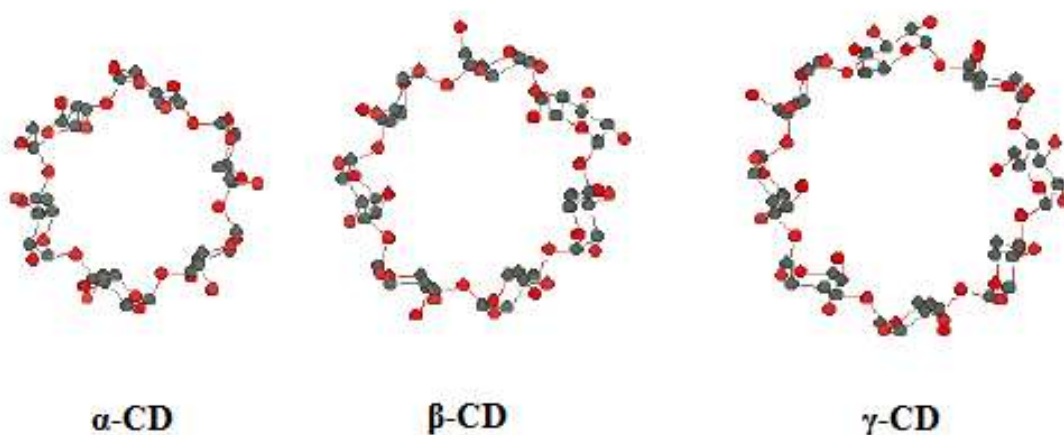


Figura 5.1 Struttura delle ciclodestrine

L'ossidrile in posizione 2 del glucopiranosio può formare un legame idrogeno con l'ossidrile in posizione 3 dell'unità adiacente. La formazione di questi legami idrogeno è alla base della struttura rigida di queste macromolecole e rappresenta la causa della loro bassa solubilità in acqua.

In soluzione acquosa la cavità delle ciclodestrine viene occupata da molecole d'acqua: trattandosi però di un'interazione debole, esse possono perciò essere facilmente sostituite. Tale cavità può ospitare varie molecole⁸⁰ a seconda delle loro caratteristiche chimico-fisiche.



⁸⁰ A. Ahuja, S. Baboota, J. Ali, G. Mustafa, in: E. Bilensoy (Ed.), *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2011, 19–43.

	α	β	γ
n° unità di glucosio	6	7	8
PM (anidro)	972	1135	197
solubilità in H₂O g/100mL 25° C	14.2	1.85	23.2
volume cavità (mL/mol)	174	262	472
diametro medio cavità anello maggiore (Å)	5.7	7.8	9.5
diametro esterno medio anello maggiore (Å)	13.7	15.3	16.9
altezza anello (Å)	8	8	8
molecole di H₂O dentro la cavità	6	11	17

Tabella 5.1 Caratteristiche chimico-fisiche delle ciclodestrine utilizzate in questo studio

La formazione del complesso di inclusione dipende da fattori entropici (spostamento di molecole di acqua) ed entalpici (interazioni idrofobiche tra il core delle ciclodestrine e la molecola inclusa). L'addotto formato viene quindi stabilizzato da forze di Van der Waals e da legami a idrogeno.

E' ormai noto che sono i fattori geometrici, più che quelli chimici, a determinare quale tipo di molecola possiede l'affinità maggiore per la ciclodestrina scelta. I diversi tipi di ciclodestrine presentano diametri interni diversi e saranno quindi in grado di accogliere molecole differenti, che si orienteranno nella cavità in modo da offrire la massima superficie di contatto della porzione idrofobica con la frazione apolare della cavità interna. La parte idrofila rimane invece all'esterno, assicurando il massimo contatto con il solvente e i gruppi ossidrilici della ciclodestrina.

La formazione di un complesso di inclusione tra ciclodestrina e farmaco porta ad un aumento della solubilità della molecola ospite (*guest*) all'aumentare della concentrazione di ciclodestrina (*host*). Inoltre l'interazione *host-guest* porta ad una variazione del comportamento cromatografico e delle proprietà spettroscopiche della molecola ospite.

5.3 Studi di solubilità

La capacità di solubilizzazione delle ciclodestrine può essere valutata quantitativamente con il metodo di solubilità di fase sviluppato da Higuchi e Connors⁸¹.

Questa procedura prevede l'aggiunta di un eccesso di farmaco in un certo volume di solvente contenente quantità crescenti di ciclodestrina, mantenuti ad una certa temperatura e sotto agitazione magnetica per un tempo necessario al raggiungimento dell'equilibrio. Si valuta la concentrazione del farmaco in soluzione all'equilibrio, raggiunto quando si ottengono due valori di concentrazione uguale per due successivi prelievi. Si ottiene così un profilo di solubilità di fase, diagrammando la concentrazione totale del farmaco su quella crescente di ciclodestrina.

Secondo la classificazione di Higuchi e Connors⁴ esistono due tipi di diagrammi: quelli di tipo A e quelli di tipo B.

I diagrammi di tipo A sono tipici di complessi solubili a tutte le concentrazioni ed hanno tre sottotipi (Figura 5.2):

- **A_L**: quando esiste una correlazione lineare tra concentrazione di farmaco in soluzione e concentrazione di ciclodestrina
- **A_P**: deviazione positiva dalla linearità, con formazione di complessi di stechiometria diversa da 1:1
- **A_N**: deviazione negativa dalla linearità, dovuta a fenomeni di auto-associazione del legante oppure a mancanza di corpo di fondo.

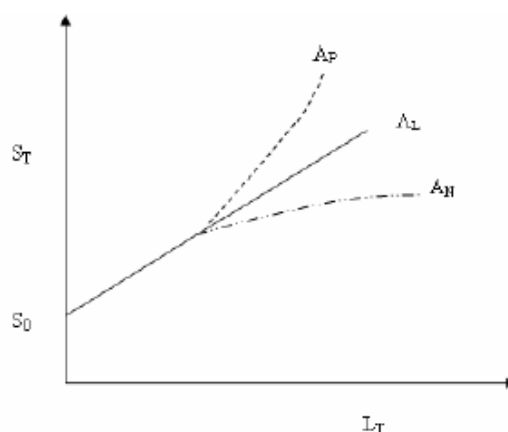


Figura 5.2 Diagrammi di solubilità di fase di tipo A

⁸¹ T. Higuchi, K.A. Connors, in: C.N. Reilly (Ed.) *Advances in Analytical Chemistry Instrumentation*, Vol. 4, Interscience, New York, NY, 1965, 117–212.

I diagrammi di tipo B sono invece caratteristici dei composti insolubili. Possono essere distinti in due sottotipi (Figura 5.3):

- **B_s**: se la concentrazione del substrato aumenta linearmente fino ad A, dove comincia a precipitare il complesso per ulteriore aggiunta di legante. Si raggiunge un plateau A-B dove la concentrazione di substrato rimane costante. Al punto B è esaurito tutto il substrato presente come corpo di fondo, il complesso continua a formarsi a discapito del substrato libero, la cui concentrazione raggiunge un secondo plateau
- **B_I**: analogo al precedente, ma senza aumento della concentrazione del substrato (il complesso precipita subito).

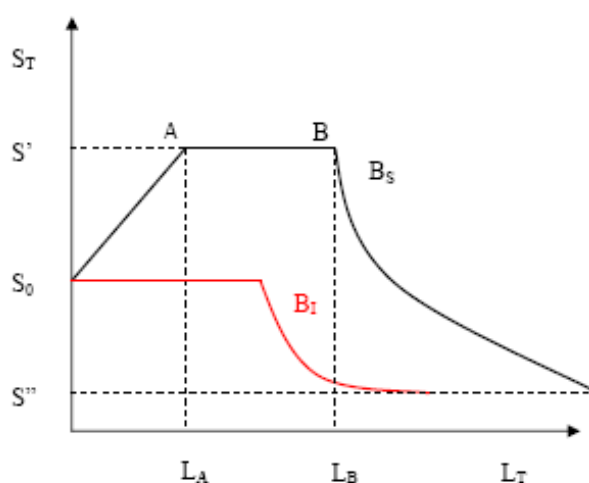


Figura 5.3 Diagrammi di solubilità di fase di tipo B

Per determinare il valore della costante di stabilità in genere vengono utilizzati metodi di regressione lineare. Per semplicità viene considerata la costante di equilibrio substrato-legante con stechiometria 1:1 (tipo A_L) che viene detta costante apparente di stabilità.

Tale costante viene calcolata mediante la seguente equazione:

$$K_{1:1} = \frac{\text{pendenza}}{\text{intercetta} \cdot (1 - \text{pendenza})}$$

Per determinare invece il rapporto *host/guest*, ossia la stechiometria del sistema di inclusione, viene utilizzato il metodo di Job⁸² o delle variazioni continue.

Questa procedura prevede la preparazione di soluzioni equimolari di farmaco e di ciclodestrina e di miscele delle due soluzioni, mantenendo costanti la concentrazione e i volumi finali.

Per ogni soluzione viene successivamente misurata una proprietà del farmaco che varia in funzione della complessazione, come l'assorbanza o la fluorescenza, e si calcola la variazione di questa stessa rispetto ad un riferimento (la soluzione del farmaco libero).

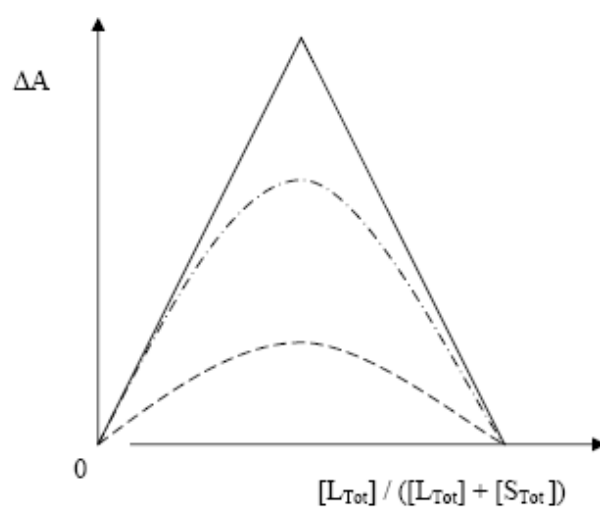


Figura 5.5 Diagramma di Job

Il diagramma di Job risultante (Figura 5.5), costruito rapportando la frazione molare del legante alla variazione della proprietà seguita, raggiunge un massimo che coincide con il miglior rapporto stechiometrico. Se tale massimo corrisponde ad un valore di x pari a 0.5 la stechiometria del complesso *host/guest* sarà 1:1.

Questo metodo inoltre permette di valutare la stabilità del complesso. Infatti, più netta è la variazione, più stabile sarà il complesso formatosi.

⁸² C. Tablet, I. Matej, M. Hillebrand, in: A. Innocenti (Ed.) Stoichiometry, Research - The Importance of Quantity in Biomedicine, InTech, Rijeka, Croatia, 2012, ch. 3.

Procedure sperimentali e risultati

Procedure sperimentali

Per lo studio di solubilità di fase condotto mediante il metodo Higuchi-Connors sono state preparate delle soluzioni sature dei complessi di Pt(IV) in esame, alle quali sono state aggiunte concentrazioni crescenti di α -CD (*range* 0.010-0.100 M), di β -CD (*range* 0.002-0.015 M) e di γ -CD (*range* 0.002-0.120 M). I campioni sono stati mantenuti sotto agitazione magnetica a 25° C per 24h. Successivamente le soluzioni sono state filtrate ed è stato misurato il contenuto di Pt mediante analisi ICP-OES. I dati ottenuti rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Per la determinazione della stechiometria del complesso di inclusione mediante il metodo di Job sono state preparate due soluzioni a concentrazioni equimolari di **1a** in MeOH e di β -CD in acqua. I campioni analizzati sono stati ottenuti miscelando volumi diversi di queste due soluzioni, in modo da mantenere costante la concentrazione totale di *host + guest* ($[1a] + [\beta\text{-CD}] = 1\text{mM}$) ed il rapporto MeOH/H₂O e variando la frazione molare del *guest* χ_{1a} ($\chi_{1a} = [1a]/[1a] + [\beta\text{-CD}]$) nel *range* 0.2-0.8.

Attraverso la tecnica di spettroscopia UV-Vis è stata seguita su tutti i campioni la variazione della λ di assorbimento ($\lambda = 233$ nm) in funzione della formazione dell'addotto. Il punto massimo sul diagramma di Job, costruito mettendo in relazione il prodotto $(A_{1a} - A_{\text{campione}}) \cdot \chi_{1a}$ con la frazione molare della ciclodestrina χ_{CD} indica la stechiometria del sistema di inclusione.

Per le analisi UV-Vis è stato utilizzato uno spettrofotometro JASCO V550. I campioni sono stati preparati diluendo con H₂O fino ad ottenere una concentrazione di Pt pari a 30 μ M.

Risultati

Dato che tutti i complessi di Pt(IV) in esame (**1a-1c** e **2a-2c**) possiedono strutture di dimensioni simili, è stato testato a titolo di esempio il complesso **1a** con tre ciclodestrine di diversa grandezza (α , β , γ), al fine di individuare quella più adatta all'interazione *host/guest*.

In Figura 5.6 vengono riportati i diagrammi di solubilità di fase per **1a** in presenza di α -, β - e γ -CD.

La solubilità del composto in esame aumenta a causa della formazione dei complessi di inclusione tra **1a** e tutte e tre le ciclodestrine.

Le costanti di formazione K corrispondenti vengono riportate in tabella 5.2.

Interessante notare che la pendenza delle tre curve ottenute risulta minore di 1, indicando la formazione di un complesso di stechiometria 1:1 Pt(IV)/CD.

Il profilo dei diagrammi di solubilità di fase di **1a** con la α - e la β -CD corrisponde in entrambi i casi alla tipologia A, che si ottiene quando la solubilità del *guest* aumenta all'aumentare della concentrazione dell'*host*.

La curva di solubilità del tipo A_L , ottenuta per il complesso **1a** con la β -CD, indica la formazione in soluzione dell'addotto 1:1 Pt/CD.

Al contrario, la curva di solubilità di **1a** con la α -CD è del tipo A_N e risulta di più difficile interpretazione.

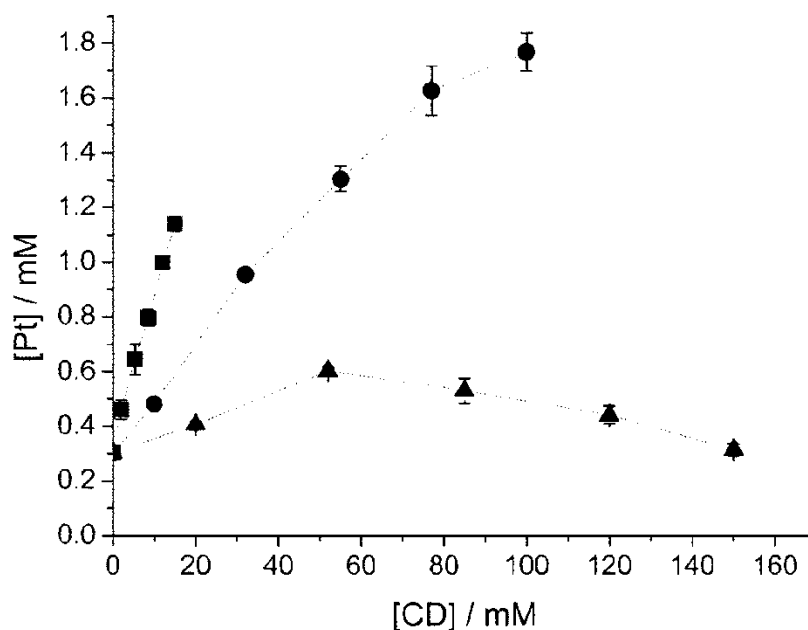


Figura 5.6 Diagrammi di solubilità di fase per il complesso **1a** con la α - (cerchio), β - (quadrato), γ - (triangolo).

Infatti, questa tipologia di diagramma si ottiene quando la solubilità del *guest* aumenta linearmente all'aumentare della concentrazione dell'*host*, ma viene bruscamente deviata in negativo ad alte concentrazioni di quest'ultimo. Tale deviazione negativa dalla linearità potrebbe essere associata a molte cause, come a cambiamenti di solubilità degli

addotti formati in soluzione oppure ad aggregazione di molecole di ciclodestrina in soluzione.

Infine, la curva di solubilità di fase di **1a** con la γ -CD è di tipo B ed indica la formazione di un complesso di inclusione con limitata solubilità in acqua.

Alla luce di questi risultati preliminari è stato possibile individuare la β -CD come il miglior *host* per la serie di complessi di Pt(IV) in esame, a causa dell'alto incremento di solubilità (circa 4 volte maggiore) ottenuto.

Lo studio di solubilità è quindi proseguito considerando i sistemi di inclusione tra i complessi **1a-1c** e **2a-2c** e la β -CD, selezionata come migliore *host*.

Tutte le curve di solubilità di fase ottenute per i composti **1b-1c** e **2a-2c** risultano corrispondere alla tipologia B, evidenziando come un piccolo aumento di lunghezza dello *spacer* assiale $-(\text{CH}_2)_n-$ ($n = 1, 2$) tra il gruppo fenilico e quello carbossilico porti ad una drammatica diminuzione di solubilità dei corrispondenti addotti di inclusione.

Sorprendentemente, lo *spacer* inserito sul gruppo assiale non provoca svantaggi evidenti sulla formazione dell'interazione *host/guest*, poiché essa avviene grazie alla formazione di forti legami ad idrogeno intramolecolari.

Viene riportata a titolo di esempio la curva di solubilità di fase dei complessi di Pt(IV) della serie **1** (Figura 5.7).

Il complesso **1a** risulta essere l'unico in grado di formare un complesso di inclusione stabile con la β -CD.

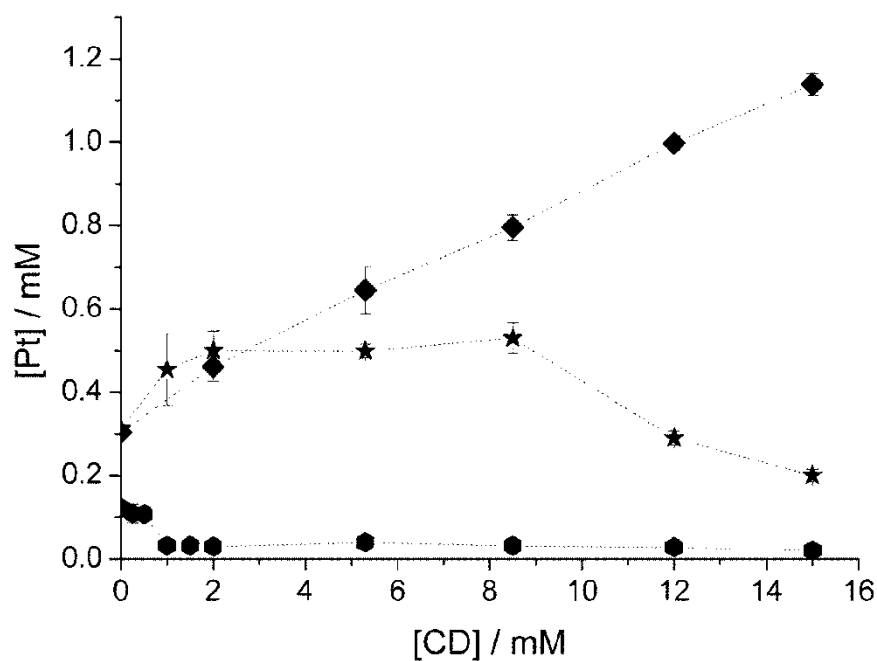


Figura 5.7 Diagrammi di solubilità di fase per i complessi 1a (quadrato), 1b (stella) e 1c (cerchio) con la β -CD.

La stechiometria del complesso **1a**/ β CD, l'unico individuato dal metodo Higuchi-Connors, è stata confermata utilizzando il metodo di Job o delle variazioni continue.

Il diagramma di Job (Figura 5.8) mostra un massimo a 0.5 che indica l'esistenza di un addotto di inclusione con rapporto molare 1:1 Pt/CD.

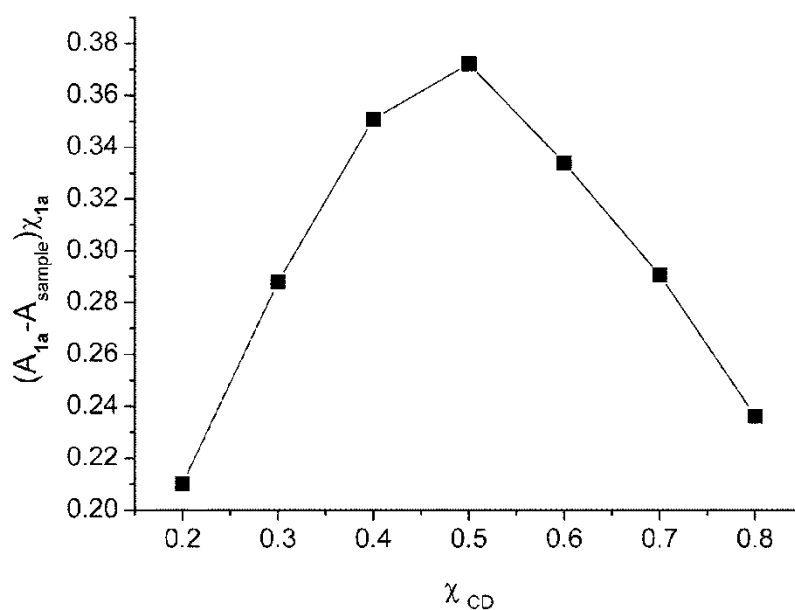


Figura 5.8 Diagramma di Job per il complesso 1a con la β -CD

5.4 Formulazione del complesso di inclusione e relativa caratterizzazione

I metodi impiegati per la preparazione dei complessi di inclusione vengono scelti in base a diversi parametri quali le caratteristiche del farmaco e della ciclodestrina, la facilità e la rapidità di esecuzione, la miglior resa e la valutazione dei costi.

Tali metodi di formulazione si possono suddividere in:

- preparazione in fase solida
- preparazione in fase semisolida
- preparazione in fase liquida.

Le procedure di preparazione in fase solida comprendono i metodi di miscelazione fisica, di macinazione e di *sealed heating*.

Il primo metodo consiste nella semplice miscelazione di un piccolo quantitativo di farmaco e di ciclodestrina, in un preciso rapporto stechiometrico e per un certo tempo. Questa procedura è alla base di tecniche più sofisticate di macinazione o *kneading*.

La macinazione avviene per azione meccanica dovuta allo sfregamento di alcune sfere di acciaio all'interno di particolari cilindri. Questo processo riduce la *particle-size* del farmaco introdotto e favorisce una migliore omogeneizzazione della miscela fisica.

Il metodo di *sealed heating* consiste nel riscaldamento in stufa di una piccola quantità di farmaco sciolto in acqua. L'alta temperatura (vicina a quella di fusione) e la pressione dovuta all'evaporazione dell'acqua favoriscono la formazione del complesso.

La preparazione del complesso di inclusione in fase semisolida prevede la procedura di *kneading* o impasto molle. Essa consiste nel trattamento della miscela fisica farmaco-ciclodestrina con alcune gocce di un solvente opportuno e nella miscelazione energica fino ad evaporazione del solvente stesso. Dall'impasto molle risultante si otterrà una nuova polvere.

Infine, i metodi in fase liquida prevedono processi di coevaporazione, di liofilizzazione e di *spray drying*.

La procedura di coevaporazione consiste nella solubilizzazione della ciclodestrina in acqua e del farmaco in un opportuno solvente volatile. Successivamente le due soluzioni vengono unite e sottoposte ad evaporazione sottovuoto.

Il metodo della liofilizzazione consiste in una procedura simile alla precedente, ma con eliminazione del solvente per sublimazione. Questo permette la completa eliminazione del solvente ed un aumento nella bagnabilità del farmaco.

Infine, mediante lo *spray-drying* la soluzione contenete farmaco e ciclodestrina viene nebulizzata con atomizzatore all'interno della camera di essiccamento. Le gocce di solvente formate vengono evaporate, permettendo di ottenere una polvere finissima.

Procedure sperimentali e risultati

Procedure sperimentali

In questo lavoro sono state utilizzate due procedure per la formulazione in fase liquida del complesso di inclusione **1a**/βCD.

Il primo metodo consiste nella procedura Higuchi-Connors, che è stata descritta nel paragrafo precedente. In questo caso è stata ottenuta una soluzione contenente l'addotto **1a**/βCD ed un eccesso di ciclodestrina (**1aHC**).

Nel tentativo di isolare il complesso di inclusione **1a**/βCD, ottenendo una polvere di elevata purezza, è stato utilizzato un secondo metodo.

Il complesso di Pt(IV) **1a** e la β-ciclodestrina sono stati sospesi in acqua in rapporto molare 1:2 e la miscela di reazione risultante è stata mantenuta sotto vigorosa agitazione a 70° C per 24h. Il solvente è stato successivamente eliminato mediante evaporazione sottovuoto. Si ottiene un polvere bianca che è stata raccolta ed asciugata in corrente d'aria anidra (**1aCD**).

Il complesso **1aHC** è stato studiato mediante spettroscopia UV-Vis e metodi elettrochimici. L'addotto **1aCD** è stato invece caratterizzato mediante spettroscopia NMR.

Per le analisi UV-Vis è stato utilizzato uno spettrofotometro JASCO V550. I campioni di **1a** libero e di **1aHC** sono stati preparati diluendo con H₂O fino ad ottenere una concentrazione di Pt pari a 30μM.

Per le misure elettrochimiche è stato utilizzato un analizzatore AutoLab PGSTAT12 interfacciato ad un software GPES 4.9.

Tutte le misure sono state condotte in atmosfera di azoto in 0.1 M NaClO₄ e la temperatura della soluzione è stata mantenuta costante a 25°C mediante bagno termostato.

E' stata utilizzata una cella standard a tre elettrodi che permette all'elettrodo di riferimento (elettrodo a calomelano) di avvicinarsi a quello di lavoro (elettrodo a vetro combinato).

La caratterizzazione NMR del complesso **1aCD** è stata condotta a $T = 25^{\circ}\text{C}$ con uno spettrometro Bruker Advance III , alla frequenza di ≈ 500 MHz per il protone e ≈ 125.7 MHz per il ^{13}C .

Risultati

Il complesso di inclusione **1aHC**, formatosi tra il complesso di Pt(IV) **1a** e la β -CD nella soluzione Higuchi-Connors, è stato inizialmente studiato mediante spettroscopia UV-Vis e metodi elettrochimici.

Il composto **1a** libero mostra una larga banda a $\lambda_{\text{max}} = 233$ nm, ma in presenza della β -CD il profilo roto-vibrazionale dell'anello aromatico viene risolto meglio e shiftato a lunghezze d'onda maggiori (Figura 5.9). Tale spostamento potrebbe essere causato dalla differente polarità dell'ambiente circostante, poiché il profilo è associato alle interazioni tra gli anelli aromatici di **1a** e la cavità della β -CD, risultando in una restrizione della libertà di vibrazione e rotazione del *guest*.

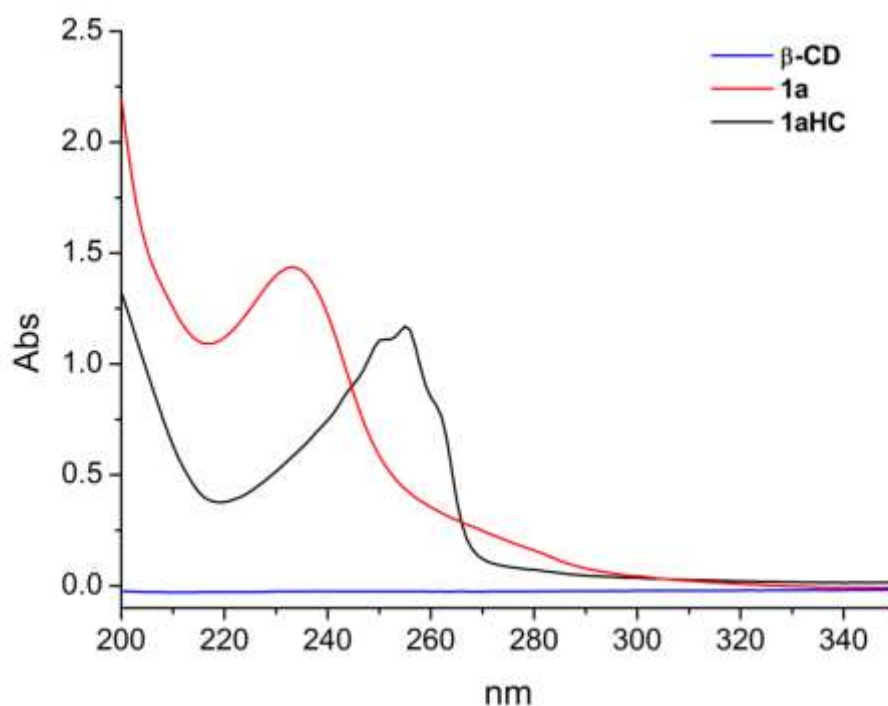


Figura 5.9 Spettro di assorbimento per il complesso **1a** libero (in rosso), per la β -CD libera (in blu) e per il complesso di inclusione **1aHC** (in nero).

Le misure elettrochimiche condotte sulla soluzione Higuchi-Connors confermano ulteriormente la formazione dell'addotto di inclusione. Il complesso **1a** mostra la riduzione irreversibile $2e^- \text{Pt(IV)} \rightarrow \text{Pt(II)}$.

Le misure voltammetriche delle tre differenti soluzioni di Higuchi-Connors (con concentrazioni di β -CD crescenti 5, 10 e 15 mM) mostrano il progressivo *shift* catodico del picco di potenziale come conseguenza della formazione del sistema di inclusione. Un'energia addizionale è richiesta per la disgregazione del complesso di inclusione, così lo *shift* catodico corrisponde alla costante di stabilità e alla concentrazione di β -CD. Allo stesso tempo l'aumento della concentrazione di *host* aumenta anche la concentrazione di **1a** e l'intensità (corrente catodica) del picco di riduzione (Figura 5.10).

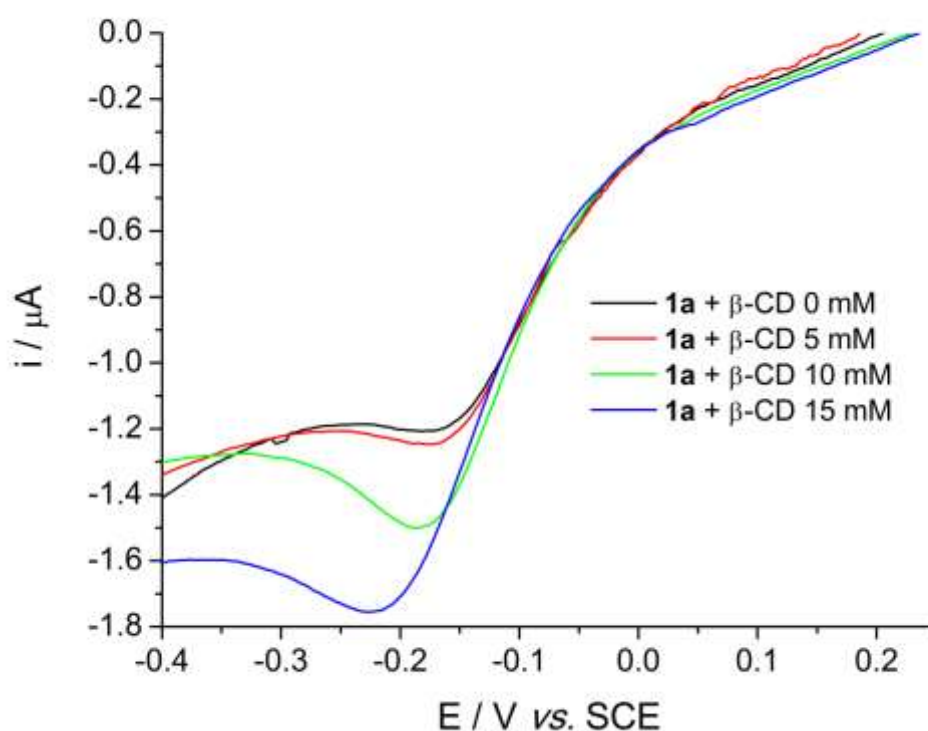


Figura 5.10 Misure voltammetriche per le soluzioni: a) **1a** (in nero), b) **1a** + β -CD 5 mM (in rosso), c) **1a** + β -CD 10 mM (in verde), d) **1a** + β -CD 15 mM (in blu).

La tecnica NMR è un utile strumento in grado di evidenziare il fenomeno di inclusione del *guest* nella cavità idrofobica di una ciclodestrina. Infatti, l'inclusione della molecola

nell'host causa una variazione della sua conformazione che coinvolge soltanto i protoni interni alla cavità⁸³.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei complessi **1aCD** e **1aHC** mostrano gli *shifts* dei segnali dei protoni direttamente coinvolti nell'interazione *host-guest* (Figura 5.11). Infatti, l'inclusione del complesso **1a** nella cavità della $\beta\text{-CD}$ è evidenziata dalla variazione dei *chemical shifts* di alcuni protoni del *guest* e dell'*host*, rispetto a quelli di riferimento dei due composti liberi.

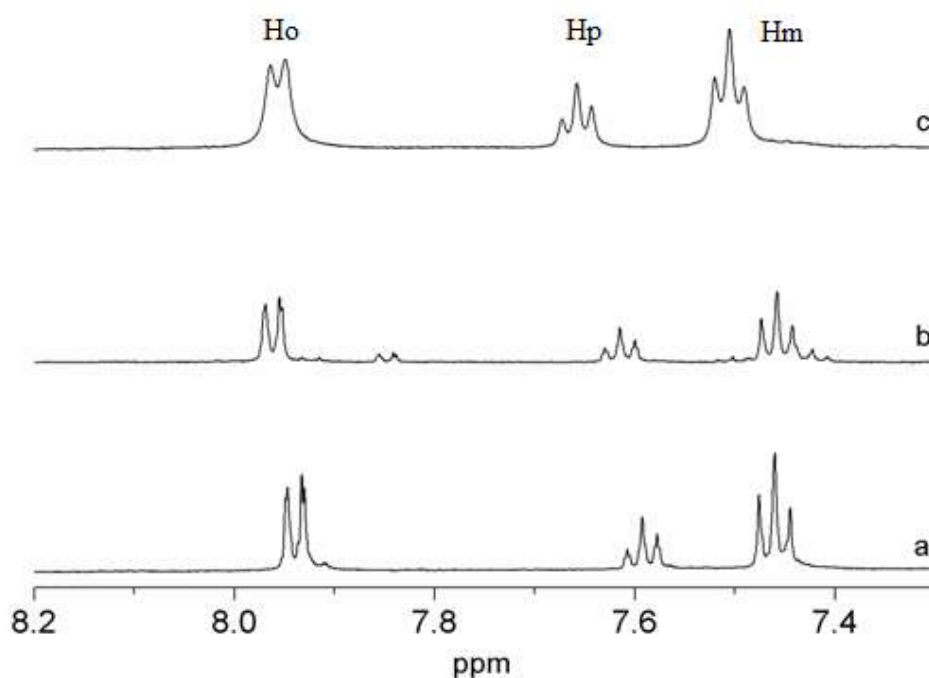
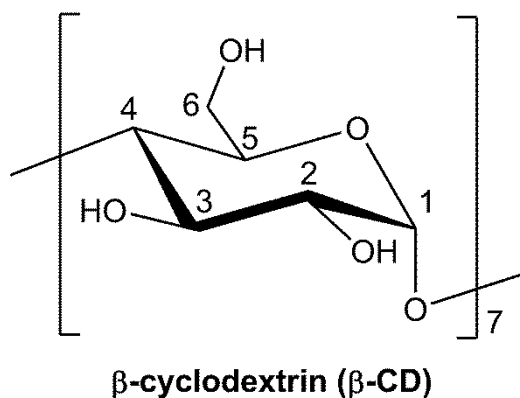


Figura 5.11 Confronto tra gli spettri $^1\text{H-NMR}$ in D_2O di (a) **1a**, (b) **1aHC**, (c) **1aCD**

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ di **1aHC** (Fig. 5.11, b) i segnali relativi ai protoni aromatici in posizione orto (H_o), meta (H_m) e para (H_p) risultano leggermente shiftati rispetto a quelli di riferimento del complesso **1a** libero (Fig. 5.11, a). Questo suggerisce la presenza di un processo dinamico, dove il complesso di Pt(IV) **1a** si trova in scambio veloce tra la sua forma libera e quella inclusa nella $\beta\text{-CD}$.

Le differenze di *chemical shift* tra **1a** e **1aHC** sono abbastanza basse, a causa del basso valore di $K_{1:1}$.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ di **1aCD** mostra uno *shift* maggiore dei segnali dei protoni H-3, H-5 e H-6, che si trovano all'interno della cavità della $\beta\text{-CD}$ (Tabella 5.2).



Protons	free δ (ppm)	1aCD δ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
β-CD			
H-1	5.027	4.986	-0.041
H-2	3.607	3.574	-0.033
H-3	3.921	3.793	-0.128
H-4	3.541	3.512	-0.029
H-5	3.821	3.665	-0.156
H-6	3.836	3.794	-0.042
1a			
H _m	7.460	7.505	0.045
H _p	7.592	7.657	0.065
H _o	7.939	7.959	0.020

Tabella 5.2 Variazione dei valori di chimica shifts tra la forma libera e quella inclusa per il complesso di Pt(IV) 1a e la β -CD

Per studiare in maniera piú approfondita la struttura del complesso di inclusione **1aCD** è stato condotto un esperimento bidimensionale $^1\text{H-NMR}$ ROESY (*Rotating frame*

Overhauser Effect Spectroscopy) che ha permesso di chiarire le interazioni dipolari esistenti tra i protoni di *host* e *guest* (Figura 5.12).

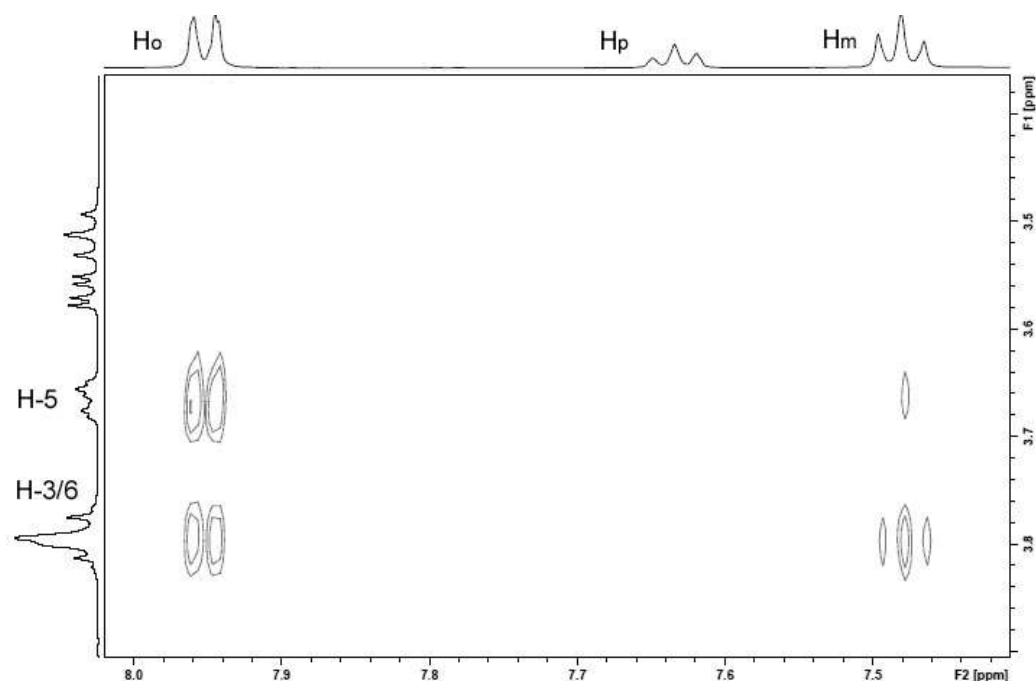


Figura 5.12 Particolare dello spettro ROESY di **1a**CD

Lo spettro 2D ROESY mostra alcuni cross-peaks intramolecolari tra i protoni H-3, H-5 e H-6 della β -CD ed i protoni H_o e H_m dei gruppi fenilici di **1a**, confermando l'inclusione dell'anello aromatico nella cavità della ciclodestrina.

Infine, non è stata osservata nessuna correlazione tra i protoni interni della β -CD e H_p , indicando la sua posizione esterna rispetto alla cavità (Figura 5.13).

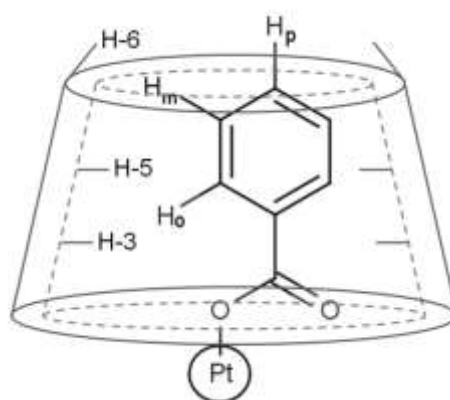


Figura 5.13 Geometria proposta per il sistema di inclusione dedotta dagli esperimenti ROESY

5.5 Molecular modelling

E' stato tentato un approccio di tipo computazionale sul sistema di inclusione tra **1a** e le varie ciclodestrine in esame al fine di confermare e spiegare in modo più approfondito i dati sperimentali ottenuti in questo lavoro.

I calcoli computazionali presentati in questa parte di lavoro sono stati condotti in collaborazione con il Prof. Giuseppe Ermondi e la Dott.ssa Giulia Caron presso il CASMedChem, Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze della Salute (Università di Torino).

La struttura cristallografica di **1a** è disponibile in letteratura⁸⁴ ed è stata usata come punto di partenza per le analisi conformazionali sul software Spartan '10 (Wavefunction Inc., 18401 Von Karman Avenue, Suite 370, Irvine, CA 92612) senza alcuna modifica. E' stato utilizzato un algoritmo in grado di ruotare ogni singolo legame aciclico di uno specifico angolo in modo da creare una serie di conformeri che sono stati successivamente minimizzati dall'hamiltoniano PM6 semiempirico⁸⁵.

I conformeri di partenza delle tre CDs sono state scaricate dal Structural Database (CSD)⁸⁶. In particolare, sono stati usati WILJAC, TUXKUS e NUNRIX rispettivamente per la α , β e γ -CD.

E' stato infine utilizzato il metodo QM⁸⁷ per la ricerca del minimo d'energia dei vari sistemi di inclusione.

L'energia di legame è stata valutata come differenza tra l'energia totale dell'addotto **1a**-CD e quella del singolo *host* (CD) e *guest* (**1a**) nelle due conformazioni: quella minimizzata dell'addotto stesso e quella minimizzata dei due composti liberi. Più è bassa l'energia di stabilizzazione più sarà termodinamicamente favorita la formazione del complesso di inclusione.

La figura 5.4 mostra i conformeri al minimo d'energia dei tre potenziali complessi di inclusione di **1a** con la α , β e γ -CD. In tutte e tre le strutture i gruppi amminici equatoriali di **1a** sono in grado di formare legami ad idrogeno con la parte idrossilica delle ciclodestrine.

⁸⁴ W.H. Ang, S. Pilet, R. Scopelliti, F. Bussy, L. Juillerat-Jeanneret, P.J. Dyson, J. Med. Chem. 48 (2005) 8060–8069.

⁸⁵ J.J.P. Stewart, J. Mol. Model. 13 (2007) 1173–1213.

⁸⁶ F.H. Allen, Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem. 58 (2002) 380–388.

⁸⁷ L. Liu, Q. X. Guo, J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem. 50 (2004) 95–103.

Il centro metallico di **1a** è posizionato vicino all'anello ossidrilico primario, nel caso del complesso di inclusione con la α -CD, mentre si affianca ai gruppi ossidrilici secondari nel caso della β -CD.

Le maggiori dimensioni della cavità della γ -CD permettono a **1a** di entrarvi all'interno più profondamente e di posizionarsi al centro dell'*host*.

Soltanto poche molecole di *guest* riescono infatti a penetrare le CDs dalla parte terminale idrossilica primaria⁸⁸.

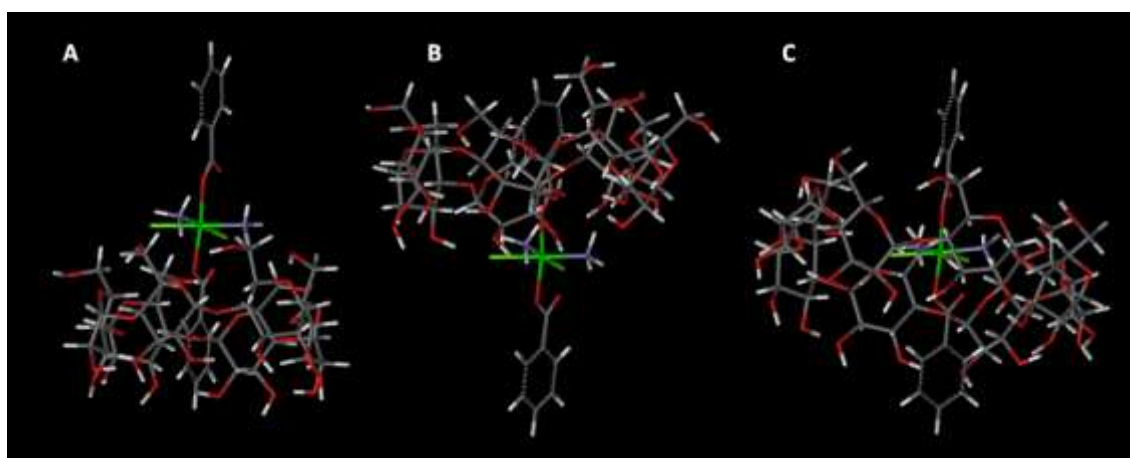


Figura 5.14 Conformazione ad un minimo di energia del complesso di inclusione **1a** con A) α -, B) β -. C) γ -CD. Le molecole di ciclo destrina sono orientate con il residuo idrossilico primario verso l'alto della figura mentre la parte idrossilica secondaria verso il basso.

La struttura a più bassa energia per l'addotto **1a**- β -CD concorda con i dati NMR, in quanto suggerisce distanze molto corte come $H_m:H-5$ (1.79 Å), $H_m:H-6$ (2.49 Å), $H_o:H-3$ (2.23 Å) and $H_o:H-5$ (2.03 Å).

Inoltre, al fine di quantificare le interazioni tra **1a** e le tre ciclodestrine è stata calcolata l'energia di legame ΔE per le strutture ottimizzate, utilizzando la seguente equazione:

$$\Delta E = E_{\text{addotto}} - (E_1 + E_{\text{CD}})$$

dove E_{addotto} rappresenta l'energia totale calcolata dalla struttura ottimizzata del complesso di inclusione più stabile, mentre E_1 e E_{CD} quelle per il complesso **1a** libero e per la ciclodestrina.

⁸⁸ S. Siva, J. Thulasidhasan, N. Rajendiran, Spectrochim. Acta, Part A 115 (2013) 559–567.

I risultati (Tabella 5.3) mostrano che il sistema di inclusione di **1a** è termodinamicamente favorito con tutte le CDs, ma l'addotto **1a**- β -CD risulta essere il piú stabile.

Tale addotto di inclusione mostra una notevole differenza tra le energie di legame ΔE e $\Delta E'$, quest'ultima calcolata prendendo in considerazione tutte le conformazioni minimizzate per **1a** e la ciclodestrina. In particolare, la conformazione per la β -CD del sistema di inclusione piú stabile è 11 Kcal mol⁻¹ meno stabile di quella minimizzata.

La α - e la γ -CD mostrano una piú lieve differenza tra la conformazione libera e quella di inclusione (circa 2 e 5 Kcal mol⁻¹ rispettivamente). Questo risultato suggerisce una maggiore propensione della β -CD ad adattare la sua struttura per massimizzare l'interazione con il *guest*.

	Conformazione addotto				Conformazione composto libero		
	E_{addotto}	E_1	E_{CD}	Energia di legame ΔE	E_1'	$E_{\text{CD}'}$	Energia di legame $\Delta E'$
α -CD	-1550.38	-174.69	-1350.37	-25.32	-174.69	-1352.59	-23.10
β -CD	-1771.28	-171.87	-1556.41	-43.00	-174.64	-1567.88	-28.76
γ -CD	-1970.57	-174.55	-1772.67	-23.35	-174.55	-1777.13	-18.90

Tabella 5.3 Energia totale E calcolata per le molecole in esame (sistemi di inclusione **1a** e CDs) ed energia di legame ΔE [kcal mol⁻¹].

5.6 Studi biologici in vitro

Gli addotti **1aHC** e **1aCD** sono stati testati sulle linee cellulari prese in considerazione nei precedenti esperimenti. Per informazioni riguardo la procedura seguita e per ulteriori dettagli sulle linee cellulari impiegate, rivedere il capitolo 4, paragrafo 4.4.

L'attività citotossica della β -CD libera è stata studiata preliminarmente alle alte concentrazioni raggiunte nel mezzo di coltura durante i *tests* biologici. La vitalità cellulare rimane inalterata a concentrazioni di β -CD di 0.27 mM, che sono molto più alte di quelle raggiunte dalla soluzione di **1aHC** (Tabella 5.4).

I dati sperimentali evidenziano come il complesso **1aHC** sia un po' meno attivo (da 1.7 a 2.7 volte) del composto **1a** libero, mentre **1aCD** mostra il peggior risultato in termini di potenza citotossica, con un rapporto $IC_{50}(\mathbf{1aCD}) / IC_{50}(\mathbf{1a})$ che va dai 100 ai 500, a seconda della linea cellulare considerata.

Cmpd	IC ₅₀ [μ M]						
	A2780	HCT 116	BR95	MG06	MM98	MM98R	HMC
1a	4.0 $\pm 0.1 \times 10^{-6}$	54.0 $\pm 10.0 \times 10^{-6}$	0.33 ± 0.09	0.48 ± 0.09	0.12 ± 0.03	0.47 $\pm 0.08[3.9]$	0.32 $\pm 0.05(1.0)$
1aHC	7.0 $\pm 3.0 \times 10^{-3}$	0.14 ± 0.01	1.3 ± 0.1	0.86 ± 0.01	0.31 ± 0.05	0.89 $\pm 0.03[2.9]$	0.77 $\pm 0.03(0.94)$
1aCD	1.41 ± 0.03	20.8 ± 3.5	53.2 ± 4.5	55.0 ± 21.2	60.6 ± 8.0	63.7 $\pm 29.9[1.1]$	42.1 $\pm 16.5(0.75)$

Tabella 5.4 Attività citotossica degli addotti di inclusione **1aCD** e **1aHC**

Con lo scopo di verificare se la differente citotossicità osservata per i vari addotti di **1a** possa essere causata da un differente *accumulation* cellulare del farmaco, è stato determinato il valore di AR (*accumulation ratio*) sulla linea cellulare HCT 116 (Figura 5.15).

Il valore di AR di **1aHC** è di poco inferiore rispetto a quello di **1a**, in accordo con quanto osservato per l'attività citotossica. Infatti, l'addotto **1aHC** non sembra essere così dannoso per l'attività di **1a**.

Al contrario, il complesso di inclusione **1aCD** mostra un valore molto più basso di AR, correlato con la sua trascurabile attività citotossica.

Il motivo di questa diminuzione coinvolge il meccanismo di uptake cellulare del farmaco incluso nella ciclodestrina: il complesso **1a** libero potrebbe entrare nella cellula

dopo la sua dissociazione dal sistema di inclusione tramite diffusione passiva oppure l'intero addotto potrebbe subire endocitosi⁸⁹. In quest'ultimo caso è la tipologia di farmaco, di trattamento cellulare e di sistema *host/guest* a determinare se la ciclodestrina migliori od ostacoli l'*accumulation* cellulare del farmaco.

La maggiore aggregazione del complesso **1aCD** potrebbe ostacolare le dinamiche di equilibrio per il rilascio di **1a** dal sistema di inclusione o l'internalizzazione dell'intero sistema via endocitosi a causa delle più grandi dimensioni.

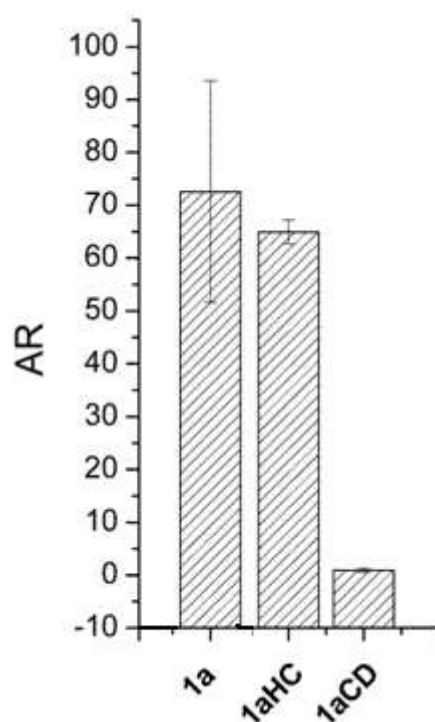


Figura 5.15 Valori di AR per il complesso **1a**, **1aHC** e **1aCD**.

⁸⁹ A.P. Plazzo, C.T. Höfer, L. Jicsinszky, É. Fenyvesi, L. Szente, J. Schiller, A. Herrmann, P Müller, Chem. Phys. Lipids 165 (2012) 505–511.

5.7 Dynamic Light Scattering

Gli esperimenti di *Dynamic Light Scattering* (DLS) sono stati condotti in soluzione acquosa a 298 K, utilizzando uno strumento Zetasizer NanoZS (Malvern, UK), operante nel range di 0.6 nM a 6 μ M ed equipaggiata di un laser He-Ne con $\lambda = 633$ nm. Le soluzioni sono state diluite ad una concentrazione finale di circa 1nM.

Le misure di DLS condotte su **1aHC** e **1aCD** mostrano come le due formulazioni abbiano proprietà completamente diverse tra loro. Infatti, mentre l'addotto **1aHC** tende a formare aggregati di circa 170 nm, il profilo del complesso **1aCD** è caratterizzato dalla presenza di aggregati molto più grandi (circa 1 μ m).

E' importante sottolineare che le misure DLS sono state effettuate ad un singolo angolo fisso (173°). Questo potrebbe stimare in maniera poco precisa la grandezza delle particelle in esame.

Di fatto, per aggregati di grandi dimensioni (dell'ordine della lunghezza d'onda incidente) si dovrebbe prendere in considerazione la dipendenza angolare della luce scatterata⁹⁰. Inoltre, le particelle più piccole in soluzioni poco concentrate sono praticamente impossibili da rilevare e quindi la loro presenza non può essere esclusa a priori⁹¹.

Tenendo in considerazione queste limitazioni, i risultati mostrano che la preparazione dell'addotto **1aCD** aumenta la formazione di aggregati di grosse dimensioni.

In letteratura⁹² è riportato come le CDs possano aggregarsi in soluzione acquosa e come la formazione di questi aggregati sia influenzata dall'aumento della concentrazione della CD e dall'agitazione della soluzione⁹³.

Tali aggregati non possono essere eliminati con la semplice filtrazione, poiché tendono a riformarsi velocemente: è stato osservato un aumento dello *scattering* delle particelle già a due ore dalla filtrazione a 0.02 μ m.

⁹⁰ C. Graf, Q. Gao, I. Schutz, C.N. Noufele, W.T. Ruan, U. Posselt, E. Korotianskiy, D. Nordmeyer, F. Rancan, S. Hadam, A. Vogt, J. Lademann, V. Haucke, E. Ruhl, *Langmuir* 28 (2012) 7598–7613.

⁹¹ F. Rancan, Q. Gao, C. Graf, S. Troppens, S. Hadam, S. Hackbarth, C. Kembuan, U. Blume-Peytavi, E. Ruehl, J. Lademann, A. Vogt, *ACS Nano* 6 (2012) 6829–6842.

⁹² M. Messner, S.V. Kurkov, P. Jansook, T. Loftsson, *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* 387 (2010) 199–208.

⁹³ M. Messner, S.V. Kurkov, M.M. Palazon, B.A. Fernandez, M.E. Brewster, T. Loftsson, *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* 419 (2011) 322–328.

A causa della bassa sensibilità del metodo, non è stato quindi possibile effettuare esperimenti DLS alle concentrazioni molto basse utilizzate negli esperimenti biologici per verificare la reale presenza di aggregati in tali condizioni.

5.8 Conclusioni

In questa ultima parte di lavoro sono stati studiati alcuni sistemi di inclusione dei complessi di Pt(IV) **1a-1c** e **2a-2c** con le tre ciclodestrine più comuni, α - β - e γ -CD, al fine di migliorare la loro solubilità in ambiente acquoso.

Gli studi di solubilità condotti hanno evidenziato che l'interazione *host-guest* e la solubilità degli addotti finali dipendono strettamente dalla tipologia di complesso di Pt(IV) e di ciclodestrina usata.

L'unica interazione *host-guest* che ha causato un aumento della solubilità in acqua è stata quella del complesso **1a** con la β -CD.

Gli esperimenti chimico-fisici condotti confermano la formazione di un complesso di inclusione **1a**/ β CD con stechiometria 1:1 e moderata stabilità termodinamica ($K_{1:1} = 170 \text{ M}^{-1}$).

Inoltre, mentre la presenza di un eccesso di β -CD nella formulazione in soluzione **1a**HC non altera in maniera significativa le proprietà biologiche del complesso **1a**, l'isolamento dell'addotto **1a**CD porta alla completa aggregazione del sistema, con conseguente diminuzione dell'*uptake* cellulare e citotossicità.

E' stato quindi possibile individuare una formulazione (**1a**HC) che permette l'impiego farmacologico del complesso **1a**, mantenendo le sue proprietà biologiche costanti ma evitando l'uso di un cosolvente.

