

UNIVERSITA' DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE

XXVIII CICLO

Tesi di Dottorato

***STRATEGIE DI DRUG TARGETING AND DELIVERY
APPLICATE A COMPLESSI DI PLATINO***

Relatore: Prof. OSELLA Domenico

Coordinatore: Prof. OSELLA Domenico

Candidato: Dr. FREGONESE Federico

Sommario

1.	Introduzione	5
1.1	Il tumore.....	5
1.2	La terapia antitumorale	8
1.3	Complessi di Pt ^{II} come farmaci antitumorali.....	13
1.3.1	Il cisplatino: struttura e proprietà.....	14
1.3.2	Meccanismo d'azione del cisplatino.....	16
1.3.3	Effetti collaterali del cisplatino.....	18
1.3.4	Derivati del cisplatino.....	19
1.4	Farmaci a base di Pt ^{IV}	21
1.4.1	Meccanismo di azione dei complessi di Pt ^{IV}	24
1.4.2	Sintesi dei complessi di Pt ^{IV}	26
1.5	Obiettivo della tesi.....	27
1.6	Bibliografia	29
2.	Sintesi di complessi di Pt^{II} contenenti eterocicli	30
2.1	Le microonde	30
2.1.1	Natura delle onde elettromagnetiche	31
2.1.2	Principio del riscaldamento	32
2.1.3	La scelta del solvente.....	34
2.2	Sintesi dei complessi di Pt ^{II} con eterocicli.....	37
2.2.1	Sintesi via microonde con leganti monodentati.....	39
	[PtCl ₂ (py) ₂] (1).....	41
	[Pt(4-picolina) ₂ Cl ₂] (2).....	45
	[Pt(3-picolina) ₂ Cl ₂] (3).....	49
2.2.2	Sintesi via microonde con leganti bidentati.....	53
	[Pt(2,2'-bipy)Cl ₂] (5)	53
2.2.3	Sintesi con riscaldamento tradizionale con leganti bidentati.....	57

	[Pt(COD)Cl ₂] (9).....	57
	[Pt(Lpor1)Cl ₂] (6).....	61
2.3	Conclusioni	66
2.4	Bibliografia	67
3.	<i>Pt^{IV} asimmetrici [Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)(Y)]</i>	68
3.1	Sintesi del cisplatino	70
	<i>cis</i> -[Pt(NH ₃)(Cl) ₂] (10).....	71
3.2	Sintesi dei complessi di Pt ^{IV}	73
3.2.1	Ossidazione in solvente coordinante	73
	[Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂ (OH)(acetato)] (11).....	74
3.2.2	Sostituzione “stechiometrica” su [Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂ (OH) ₂]	77
	[Pt(NH ₃) ₂ (Cl) ₂ (OH) ₂] (12).....	78
3.2.3	Ossidazione con acido perossiacetimidico	82
	[Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂ (OH)(acetilamido)] (16)	85
3.3	Sintesi dei complessi 11 e 16 marcati ¹⁵ N	88
	[Pt(acetato)Cl ₂ (¹⁵ NH ₃) ₂ (OH)] (17).....	89
	[Pt(acetamidato)Cl ₂ (¹⁵ NH ₃) ₂ (OH)] (18).....	91
3.4	Conclusioni	93
3.5	Bibliografia	94
4.	<i>Sintesi dei complessi [Pt(acetato)Cl₂(NH₃)₂(Y)] e [Pt(acetamidato)Cl₂(NH₃)₂(Y)]</i>	95
4.1	Sintesi dei complessi asimmetrici [Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂ (X)(Y)]	97
	[Pt(acetato) ₂ Cl ₂ (NH ₃) ₂] (19).....	97
	[Pt(acetato)(butanoato)Cl ₂ (NH ₃) ₂] (20).....	100
	[Pt(acetato)Cl ₂ (esanoato)(NH ₃) ₂] (21)	104
	[Pt(acetato)Cl ₂ (NH ₃) ₂ (ottanoato)] (22)	109
	[Pt(acetato)Cl ₂ (NH ₃) ₂ (succinato)] (23)	113
	[Pt(acetilamido)(acetato)Cl ₂ (NH ₃) ₂] (24).....	118
	[Pt(acetilamido)(butanoato)Cl ₂ (NH ₃) ₂] (25)	121

	[Pt(acetilamido)Cl ₂ (esanoato)(NH ₃) ₂] (26).....	125
	[Pt(acetilamido)Cl ₂ (NH ₃) ₂ (ottanoato)] (27).....	130
	[Pt(acetilamido)Cl ₂ (NH ₃) ₂ (succinato)] (28).....	134
4.2	Bibliografia.....	139
5.	<i>Studio dei complessi [Pt(NH₃)₂Cl₂(acetamidato)(Y)] e [Pt(NH₃)₂Cl₂(acetato)(Y)]</i>	140
5.1	Stabilità in soluzione acquosa.....	140
5.2	Lipofilicità.....	142
5.3	Potenziali.....	145
5.4	Riduzioni con acido ascorbico.....	146
5.5	Attività biologica.....	153
5.6	Bibliografia:.....	158
6.	<i>Vettori per DTD: il legame covalente</i>	159
6.1	Sintesi dei complessi con leganti bifunzionali.....	162
	[Pt(acetato)Cl ₂ (acido 2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)acetico)(NH ₃) ₂] (29)	162
	[Pt(acetato)(β-Ala)Cl ₂ (NH ₃) ₂] (30).....	168
	[Pt(acetato)Cl ₂ (NH ₃) ₂ (4-pentinoico)] (31).....	173
6.2	Reazioni di accoppiamento con modelli.....	177
6.2.1	Accoppiamento acido carbossilico-ammina modello.....	178
6.2.2	Accoppiamento maleimide-furano.....	185
6.2.3	Accoppiamento β-alanina-acido carbossilico.....	189
6.2.4	Accoppiamento alchino-azide modello.....	195
6.3	Conclusioni.....	199
6.4	Bibliografia.....	200
7.	<i>Vettori per DTD: Destrano</i>	201
7.1	Sintesi dei complessi cationici.....	203
	[PtCl(NH ₃) ₂ (py)] (36).....	204
	[PtCl(NH ₃) ₂ (qui)] (37).....	207
	[PtCl(NH ₃) ₂ (phet)] (38).....	210

7.2	Formazione degli addotti DXS-farmaco.....	214
7.3	Studio della relazione carico effettivo/complesso utilizzato	217
7.4	Studio del rilascio del farmaco in soluzione.....	219
7.5	Studio dell'attività dell'addotto DXS-38.....	222
7.6	Conclusioni	224
7.7	Bibliografia	225
8.	Articoli	226

1. Introduzione

1.1 Il tumore

Il tumore, conosciuto anche come cancro o neoplasia, è una malattia generata dalla riproduzione incontrollata di alcune cellule di tessuto, dovuta alla modifica del loro patrimonio genetico, che presentano disfunzioni rispetto alla fisiologia cellulare del tessuto originale.

Il cancro è tra le prime cause di morte dai primi decenni del XX secolo ed entro dieci anni, il numero delle morti arriverà a superare i 15 milioni di casi, in particolare tra pazienti anziani e in Paesi in via di sviluppo.

Le cause che possono portare alla formazione di cellule neoplastiche sono molteplici; ogni giorno entriamo a contatto con sostanze in grado di provocare mutazioni genetiche e inoltre alcune delle anomalie si possono contrarre per via ereditaria.

La degenerazione viene trasmessa dalla cellula madre alla sua progenie, che a sua volta la trasmetterà alle discendenti, fino a portare alla formazione di cellule neoplastiche.

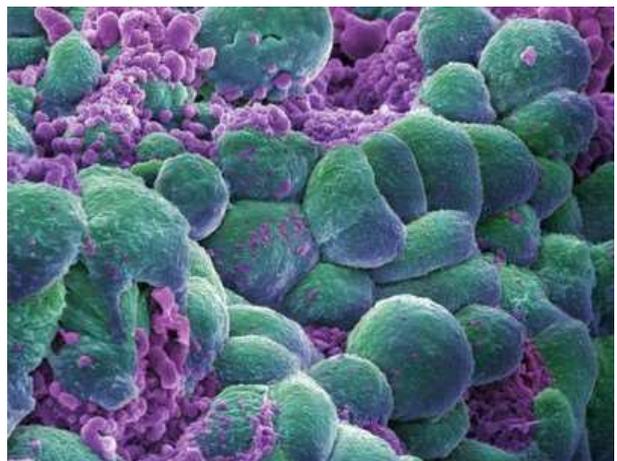


Figura 1.1: Carcinoma prostatico metastatico

Un'unica mutazione irreversibile al DNA non porta alla trasformazione da cellula normale a neoplastica ma sono necessarie più mutazioni all'interno dello stesso patrimonio genetico.

Queste mutazioni vanno a colpire geni specifici adibiti al controllo di funzioni fondamentali quali:

- 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.
- I geni che regolano l'apoptosi.

In caso di modifiche al DNA tali geni provocano la morte della cellula malata per impedirne la diffusione; tuttavia la codifica irregolare o assente di questi geni spesso determina l'insorgere di cellule cancerose e la loro moltiplicazione incontrollata.

Le cellule neoplastiche presentano alcune caratteristiche specifiche rispetto alle cellule sane, quali:

- *Anaplasia*: la normale differenziazione cellulare risulta inesistente.
- *Autonomia*: la crescita è indipendente dai meccanismi di regolazione.
- *Mancata inibizione della crescita cellulare*: le cellule normali attivano un processo d'inibizione della crescita nel momento in cui rilevano un'elevata concentrazione di cellule nel loro intorno mentre le cellule tumorali continuano a replicarsi costantemente.
- *Scarso controllo apoptotico*: le cellule tumorali riducono drasticamente la possibilità di andare incontro ad apoptosi.
- *Angiogenesi*: la crescita incontrollata porta all'aumento della quantità di nutrienti necessari. Per questo motivo si possono formare nuovi vasi sanguigni all'interno del tessuto.
- *Invasività e capacità a metastatizzare*: le cellule tumorali sono in grado staccarsi dal tessuto tumorale, trasferirsi attraverso il flusso sanguigno ad altri tessuti e dare così origine a tumori secondari (metastasi).

Il corpo neoplastico può evolvere seguendo due stadi (Fig. 1.2):

l'*iperplasia*, che consiste in un aumento di volume come risposta verso gli stimoli che provocano o richiedono un aumento della sua attività funzionale;

e la *displasia*, che comporta disfunzioni, anomalie strutturali e deformità nel tessuto colpito e la conseguente perdita delle proprie attività fisiologiche.

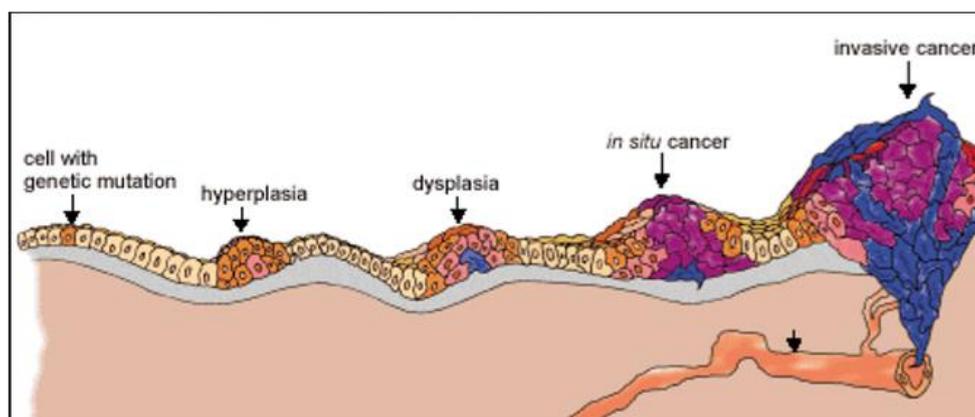


Figura 1.2: Evoluzione clonale

In base alla loro natura e caratteristiche i tumori vengono suddivisi in benigni e maligni.

Il tumore viene detto benigno finché le cellule neoplastiche restano legate ad un'unica massa ben definita e circondata da una capsula di tessuto connettivo.

Quando tali cellule sono in grado di staccarsi dal tessuto originale, penetrare in altri tessuti e formare metastasi, il tumore viene considerato come maligno. La maggior parte dei tumori maligni si originano dall'evoluzione di tumori benigni nel tempo¹.

La classificazione dei tumori viene effettuata valutando due parametri fondamentali: *gradazione* e *stadiazione*.

La *gradazione* misura l'attività proliferativa delle cellule e viene indicata attribuendo un valore da 1 a 3. Nei tumori di I grado, ben differenziati, viene mantenuta un'architettura cellulare fisiologica e le cellule hanno una bassa velocità di duplicazione mentre nei tumori di III grado, indifferenziati, le cellule si sono modificate fino al punto di aver perso completamente le loro funzioni originali; essi tendono a crescere rapidamente e ad essere più aggressivi rispetto alle neoplasie di grado inferiore.

La *stadiazione* rappresenta un indice d'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).

In base alla loro origine e caratteristiche si possono distinguere otto principali categorie di tumori maligni²:

Tessuto di origine	Tumore benigno	Tumore maligno
Tessuto connettivo, cartilagineo, osseo e muscolare	Fibroma, condroma, osteoma, leiomioma e rabdomioma	Sarcoma
Leucociti		Leucemia
Tessuto epiteliale, ghiandolare e di rivestimento	Adenoma e papilloma	Carcinoma
Tessuto nervoso		Blastoma
Melanociti	Nervo melanocitico	Melanoma
Ghiandole linfatiche, linfociti		Linfoma di "Hodgkin" e "non-Hodgkin"
Plasmacellule		Mielomi

1.2 *La terapia antitumorale*

Dopo anni di studi la medicina ha a disposizione diversi strumenti per combattere il cancro.

La **chirurgia** è l'opzione principale nella maggior parte dei tumori benigni. Talvolta, per facilitarne la riduzione, si tenta di ridurre la dimensione con una chemioterapia o una radioterapia preoperatoria.

La **radioterapia** utilizza raggi X concentrati nell'area specifica per distruggere le cellule cancerose ed evitare il danneggiamento delle zone sane limitrofe. Può essere sfruttata come operazione pre-operatoria o come vera e propria terapia su tumori sensibili alle radiazioni.

La **chemioterapia** utilizza farmaci citotossici (tossici per le cellule). In genere il loro effetto è di bloccare la divisione delle cellule senza però distinguere tra cellule sane e cellule malate. Non essendo selettive le chemioterapie hanno pesanti effetti collaterali su tutti quei tessuti a rapido ricambio, come le mucose, i capelli, il sangue e i tessuti tumorali.

La **terapia ormonale** altera l'equilibrio di determinati ormoni nell'organismo e si utilizza soprattutto con tumori ormono-sensibili.

L'**immunoterapia** consiste nell'utilizzo di vaccini capaci di riattivare il sistema immunitario contro le cellule tumorali. Seppur disponibili vaccini contro il melanoma e, in forma sperimentale, contro alcuni tumori del colon-retto in Europa nessuno di questi prodotti è stato ancora approvato.

E' frequente un uso combinato di diverse tipologie per combattere più efficacemente la malattia.

Pur restando la terapia fisica e l'intervento chirurgico, le armi migliori per la lotta contro le neoplasie maligne in fase iniziale, per il tumore in fase di proliferazione avanzata è richiesta una terapia basata sulla somministrazione di farmaci citotossici (chemioterapia).

I chemioterapici hanno come effetto terapeutico la distruzione di una popolazione cellulare: le probabilità di successo saranno tanto maggiori quanto maggiori sono le differenze biologiche tra le cellule tumorali e quelle sane. Per raggiungere questo obiettivo bisogna conoscere la dose massima tollerabile DMT (massima dose che può essere somministrata senza indurre tossicità irreversibili), e la dose minima efficace DME. L'indice terapeutico definito da questi due parametri, ovvero il rapporto DMT/DME, dà un'importante stima del *range* di dose entro il quale il farmaco può essere somministrato con minimi rischi.

La terapia antitumorale è efficace quando un farmaco riesce a ridurre il tessuto tumorale ad un livello tale per cui il sistema immunitario è in grado di agire, eliminandolo.

Gli attuali farmaci chemioterapici utilizzati mancano di selettività e, per esprimere la loro azione citotossica, necessitano di alti dosaggi, portando all'insorgenza di elevati effetti collaterali indesiderati.

Questi effetti vanno ad intaccare principalmente tutti i tessuti ad alto indice proliferativo quali: midollo osseo (leucopenia, piastrinopenia, anemia, immunosoppressione, infezioni), mucosa gastrointestinale (stomatite, enterite, diarrea), cute ed annessi cutanei (alopecia), gonadi (amenorrea).

A seconda del meccanismo d'azione, questi farmaci possono essere suddivisi in due categorie principali:

1. Agenti alchilanti: interagiscono direttamente con il DNA, attraverso una reazione di alchilazione tra la forma attivata del farmaco e le basi azotate del DNA, formando un legame covalente.

Gli alchilanti bifunzionali sono in grado di formare legami *cross-link* intra ed interfilamento, provocando la rottura del segmento nucleotidico o il blocco nella sua trascrizione.

A seconda delle caratteristiche strutturali possono essere suddivisi a loro volta in cinque classi:

- Mostarde azotate
- Nitrosuree
- Alchilsolfonati
- Aziridine
- Triazeni

2. Antimetaboliti: sono tutte quelle sostanze la cui struttura chimica è simile ad altri metaboliti presenti nell'organismo. La sostituzione dei metaboliti normali può portare al blocco del sistema enzimatico di cui il metabolita funge da substrato o alla formazione di un prodotto inattivo.

Come per gli agenti alchilanti, secondo le caratteristiche strutturali anche gli antimetaboliti possono essere suddivisi in tre classi principali:

- Antagonisti dell'acido folico
- Analoghi delle purine
- Analoghi delle pirimidine

La somministrazione di farmaci citotossici ha lo scopo principale di impedire la divisione cellulare; in particolare possono agire in modo mirato su una fase oppure agire indistintamente sulle varie fasi del ciclo cellulare.

Il ciclo cellulare di una tipica cellula eucariotica in coltura ha una durata di circa 24 ore e si articola in quattro fasi principali: mitosi (M), *gap* 1 (G₁), sintesi (S) e *gap* 2 (G₂).

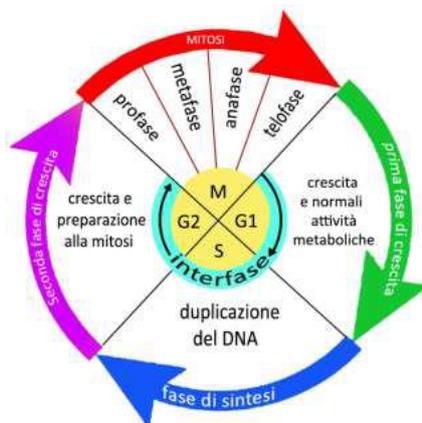


Figura 1.3: Le fasi del ciclo cellulare.

Fase G ₀	Stato di riposo, in cui le cellule hanno cessato di dividersi (in modo temporaneo o irreversibile) (non presente in figura)
Fase G ₁	Stato che segue alla mitosi e in cui si assiste alla sintesi delle proteine e dell'RNA, necessari per duplicare i cromosomi durante la fase S
Fase S	Avviene la duplicazione dei cromosomi, quindi la sintesi del DNA
Fase G ₂	Stato che precede la divisione cellulare e in cui si ha la crescita della cellula e nuovamente la sintesi delle proteine necessarie alla mitosi
Fase M	Fase in cui si rompe l'involucro nucleare, si forma il fuso mitotico e avviene la duplicazione dei cromosomi. In seguito si ha un processo di mitosi che porterà alla formazione di due cellule figlie fornite di corredo cromosomico completo.

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 esterne³.

In base alla loro attività citotossica ed al ciclo cellulare, i farmaci antitumorali possono essere suddivisi in tre categorie:

- agenti ciclo-ascpecifici, tossici sia per le cellule che si dividono che per quelle quiescenti.
- agenti ciclo-specifici e fase-ascpecifici, che distruggono le cellule che si dividono, a prescindere dalla fase del ciclo cellulare.
- agenti ciclo-specifici e fase-specifici, che distruggono le cellule che si dividono, in fasi particolari del ciclo cellulare.

La crescita tumorale viene ben rappresentata attraverso la curva di Gompertz, dove possono essere individuate due fasi principali.

Una prima fase dove le cellule crescono in modo esponenziale ed una seconda di rallentamento tendente ad un *plateau*.

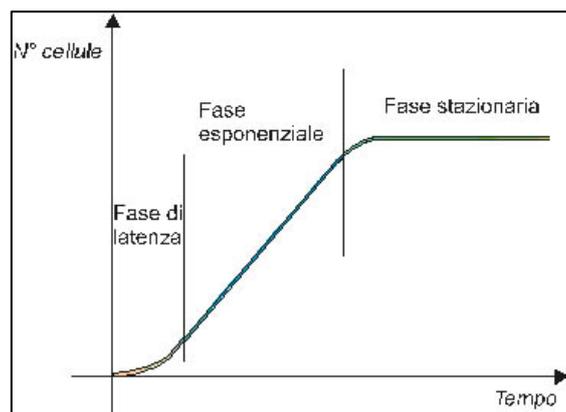


Figura 1.4: Curva di Gompertz

Nei tessuti tumorali si possono riconoscere tre settori cellulari differenti in base alla capacità proliferativa: il compartimento A costituito da cellule proliferanti in fase G_1 , il compartimento B costituito da cellule quiescenti in fase G_0 ed il compartimento C contenente cellule in necrosi.

Il più sensibile ai farmaci citotossici, tra questi tre gruppi di cellule, è il compartimento A, mentre il compartimento B è l'ostacolo maggiore alla rimozione completa del tumore mediante chemioterapia.

Durante il processo iniziale di accrescimento del tessuto tumorale la quasi totalità delle cellule appartiene al compartimento A: questo è il momento migliore per sfruttare in modo ottimale i farmaci antitumorali. Tuttavia, solo in una fase avanzata, quando il potere di accrescimento del tessuto è ormai ridotto, è possibile diagnosticare la presenza del tumore.

Un fattore molto importante che può giocare a sfavore della terapia antitumorale è dovuto all'insorgere, da parte delle cellule neoplastiche, di resistenza al trattamento farmacologico.

Diverse sono le cause che possono portare alla formazione di resistenza verso determinati farmaci: 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, ecc...

1.3 Complessi di Pt^{II} come farmaci antitumorali

Il platino fa parte dei metalli di transizione della III serie, ha numero atomico 78 e configurazione elettronica [Xe] 4f¹⁴ 5d⁹ 6s¹.

I possibili stati di ossidazione sono 0, II, IV, V e VI (gli ultimi due solo in composti associati con ossigeno e fluoro) mentre in soluzione acquosa o ambiente biologico si possono trovare solo come II e IV.

Nello stato di ossidazione II (d⁸) forma complessi con geometria planare-quadrata ed essendo il Pt^{II} un acido *soft* coordina preferibilmente basi *soft* (con atomi donatori quali S, P, As, ecc.) anche se sono presenti parecchi complessi con leganti N-donatori.

In letteratura sono presenti innumerevoli complessi neutri con stechiometria [PtXYAB] dove X e Y sono anioni quali alogenuri, carbossilati, idruri, alchili, arili (detti *leaving groups*) e A e B sono leganti neutri quali NH₃, ammine, eterocicli azotati o fosfine (detti *carrier groups*)¹⁰ (Figura 1.5).

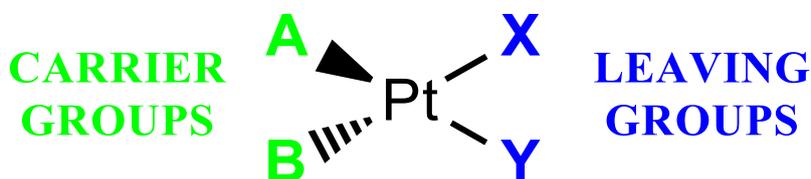


Figura 1.5: Struttura dei complessi di Pt^{II}

Attraverso la modulazione dei leganti è possibile variare le proprietà chimico-fisiche del complesso quali lipofilicità, solubilità, velocità di idrolisi (*leaving groups*), ingombro sterico, ecc. e di conseguenza la possibile attività biologica del farmaco.

Per mostrare citotossicità il complesso deve essere neutro, per permettere l'attraversamento della membrana cellulare.

1.3.1 Il cisplatino: struttura e proprietà

Sebbene i farmaci contenenti complessi metallici abbiano sempre avuto un impiego alquanto limitato data l'elevata tossicità, negli ultimi anni si è visto che molti complessi contenenti metalli pesanti quali Au, Pd, Ru, Pt, ecc. possono svolgere un importante ruolo farmacologico⁴.

L'attività citotossica dei primi composti a base di platino fu scoperta da Rosenberg e Van Camp⁵, tuttavia lo studio sistematico dell'attività biologica di questi complessi iniziò dopo il successo ottenuto dai complessi di Pt(II) con leganti amminici.

Tuttora, i farmaci a base di platino sono tra i maggiormente utilizzati per un'ampia serie di tumori solidi umani, quali carcinomi del testicolo e dell'ovaio, della vescica, della testa e del collo, del polmone, l'osteosarcoma e i linfomi maligni.

Il cisplatino (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]), il capostipite dei farmaci a base di Pt, venne sintetizzato per la prima volta da Michele Peyrone nel 1844 ma solo 50 anni dopo Alfred Werner assegnò a questo composto la geometria *cis*, distinguendolo dall'isomero *trans* (fig. 1.6). Nel 1966 la sua struttura venne confermata tramite diffrazione a raggi X.



Figura 1.6: cisplatino (sx) e transplatino (dx).

Il complesso presenta due leganti amminici detti *carrier groups* (gruppi inerti, determinano le proprietà chimico-fisiche del complesso) e due ioni cloruro detti *leaving groups* (gruppi uscenti durante le reazioni di solvolisi, determinano la velocità di idrolisi).

Barnett Rosenberg, fisico dell'Università del Michigan, in modo del tutto casuale nel 1965, nel corso di alcuni saggi in vitro realizzati per analizzare gli effetti di un campo elettromagnetico sulla divisione cellulare, sottopose una popolazione di batteri *Escherichia Coli* in una soluzione contenente cloruro di ammonio ad un campo generato da due elettrodi di platino. Si

notò che sotto l'influenza della corrente tali batteri subivano una crescita fino a raggiungere una lunghezza circa 300 volte superiore a quella normale⁶.

Studi successivi dimostrarono che la crescita dei batteri era legata alle piccole quantità di platino disciolte nella soluzione (sotto forma di $[\text{PtCl}_6]^{2-}$) provenienti dagli elettrodi ed alla presenza di ossigeno e luce nella camera elettrolitica che portarono alla formazione del complesso $[\text{PtCl}_4(\text{NH}_3)_2]$ ⁷.



Dopo la conferma della formazione di isomeri, furono testate le corrispondenti forme *cis* e *trans* del complesso $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ e si vide che solo il primo era un potente inibitore della divisione cellulare mentre il secondo dava esito negativo.

Ulteriori studi vennero effettuati su complessi di platino con leganti amminici differenti e questi dimostrarono che solo le specie neutre di geometria *cis* tendevano ad inibire la divisione cellulare, mentre le specie *trans* erano biologicamente inattive.

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

Vennero così testati differenti complessi a base di Pt su tumori differenti ed i risultati ottenuti dal cisplatino furono promettenti al punto che nel 1978 venne approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) come farmaco antitumorale per la cura dei tumori alle ovaie e ai testicoli. Tutt'oggi il cisplatino è uno dei farmaci più comunemente usati e di maggior successo nel trattamento di diverse neoplasie⁸.

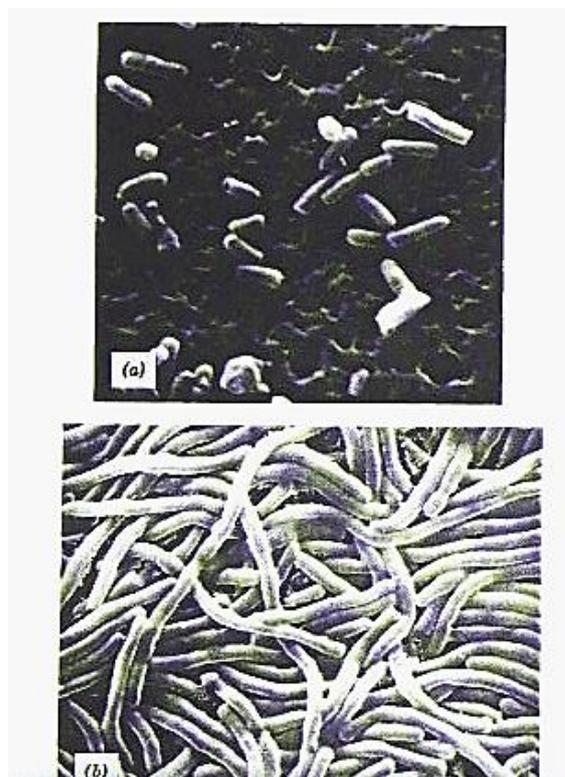


Figura 1.7: E. coli cresciuti in condizioni normali (a) ed in ambiente contenente $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (b)

1.3.2 Meccanismo d'azione del cisplatino

Il cisplatino presenta un meccanismo d'azione simile a quello degli agenti alchilanti⁹, legandosi attraverso addotti covalenti ai filamenti di DNA.

Viene somministrato per via endovenosa e viene trasportato ai vari tessuti attraverso il circolo sanguigno. L'elevata concentrazione di ioni cloruro (circa 100 mM) nel sangue stabilizza il complesso prevenendo reazioni di solvolisi e favorisce la penetrazione intracellulare mediante diffusione passiva.

Una porzione del farmaco viene escreta direttamente attraverso i reni (senza esplicare nessuna azione) ed una parte entra nelle cellule mediante diffusione passiva, dove può esercitare la sua funzione farmacologica.

All'interno della cellula le condizioni (pH 7.4, temperatura 37°C, bassa concentrazione di ioni cloruro) consentono una rapida solvolisi del complesso, con la sostituzione in più *steps* dei leganti cloruro con molecole di H₂O, portando alla formazione della forma attiva cis-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺¹⁰.

L'eventuale presenza di basi può portare alla deprotonazione degli acquacomplessi con formazione di idrossocomplessi inattivi (Fig. 1.8).

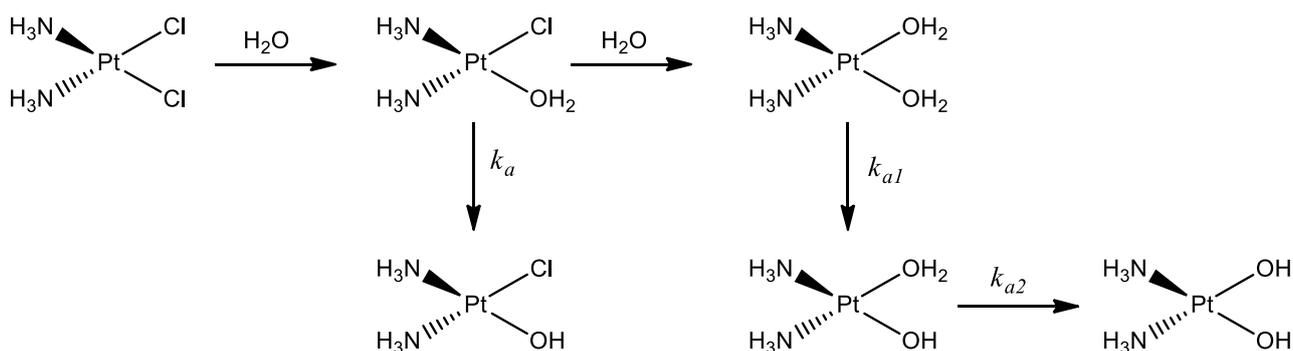


Figura 1.8: Reazione di idrolisi del cisplatino

La forma “idrolizzata” è una specie elettrofila bifunzionale in grado di legarsi ai siti nucleofili presenti sui filamenti di DNA mediante la formazione di *crosslinks intra-* ed *inter-strand* (fig. 1.9).

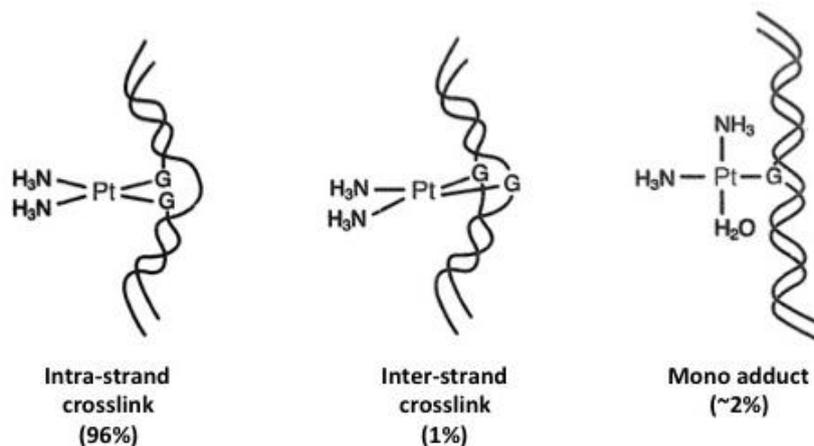


Figura 1.9: addotti DNA-Cisplatino

Essendo il Pt^{II} un acido *soft*, si presume che il legame con le eliche del DNA avvenga preferibilmente mediante atomi gli di azoto delle basi adenina e guanina piuttosto che con gruppi fosfato (non è escluso però un coinvolgimento con la formazione di un intermedio). La carica negativa dei gruppi fosfato può comunque favorire l'attrazione delle forme attive (cationiche) del cisplatino.

Vari studi hanno dimostrato che il cisplatino si lega preferenzialmente attraverso l'azoto in posizione 7 della guanina, essendo esposto nel solco più ampio della doppia elica e di conseguenza più accessibile a composti esterni.

Questo legame porta al ripiegamento dell'elica di DNA deformando in modo marcato la struttura tridimensionale.

È proprio questa deformazione che porta al blocco della replicazione e trascrizione del DNA e di conseguenza alla morte della cellulare, per via apoptotica.

L'effetto citotossico del cisplatino è quindi legato alla formazione di diaddotti cisplatino-DNA ed alla quantità totale di platino legatosi al filamento.

1.3.3 Effetti collaterali del cisplatino

Un effetto negativo legato all'utilizzo del cisplatino come farmaco antitumorale risiede nella elevata tossicità e nella scarsa selettività verso i tessuti tumorali rispetto a quelli sani, che portano alla comparsa di diffusi effetti collaterali.

Oltre ad effetti comuni agli altri farmaci antitumorali quali: vomito, nausea, diminuzione dei globuli rossi e dei globuli bianchi il cisplatino provoca effetti collaterali specifici quali:

la ***nefrotossicità***, è uno degli effetti collaterali più diffusi e comporta seri danni ai reni non completamente reversibili, dalla semplice lesione tubulare alla necrosi del tessuto, accompagnata da ipomagnesiemia;

l'***ototossicità***, si manifesta tramite riduzione della percezione dei suoni ad alte frequenze, interessa soprattutto i bambini ed i suoi effetti sono legati alla quantità totale di farmaco somministrata;

la ***neurotossicità***, manifesta una neuropatia periferica di tipo sensitivo: nelle fasi iniziali porta alla perdita/riduzione di riflessi e sensibilità tattile fine, fino alla nascita di atassia e limitate capacità di movimento. Questo effetto è dose-cumulativo, accresce quindi all'aumentare delle dosi assunte e può limitarne l'applicazione. Negli ultimi anni è stato visto che per ridurre questo effetto è importante reidratare il paziente con soluzioni saline ipertoniche di NaCl durante il trattamento.

1.3.4 Derivati del cisplatino

Dati gli elevati effetti collaterali irreversibili legati alla somministrazione del cisplatino come farmaco, l'interesse si è spostato verso la sintesi di nuovi complessi a base di Pt^{II} con indice terapeutico più elevato.

Negli anni, da questo composto sono stati sintetizzati diversi complessi con struttura simile in modo da trovare il composto ideale che mantenesse le caratteristiche positive del cisplatino e ne riducesse gli effetti negativi.

Cleare e Hoeschele, attraverso studi sulla carica dei complessi e la modulazione dei leganti uscenti, hanno formulato delle regole SAR¹¹ (*Structure-Activity Relationship*), che permettono di stabilire una vera e propria strategia per la preparazione di complessi di Pt^{II} omologhi del cisplatino:

1. Il complesso deve essere neutro in modo da permettere il passaggio attraverso sostanze apolari, come i fosfolipidi della membrana cellulare.
2. Il Pt deve avere stato di ossidazione +2.
3. Il complesso deve possedere due *leaving groups* per modulare la velocità di idrolisi e due *carrier groups* in modo da modulare l'ingombro sterico.
4. Il complesso deve avere configurazione *cis*.

Tali farmaci vengono detti di “seconda generazione” e devono possedere determinate proprietà:

- ✓ maggior selettività verso le cellule tumorali rispetto alle sane.
- ✓ elevata efficacia su più tipologie di tumore, tra cui i tumori resistenti al cisplatino.
- ✓ discreta solubilità, in modo da permettere altre forme di somministrazione (somministrazione orale).

Variando sistematicamente i leganti *carrier* e *leaving*, sono stati sintetizzati diversi complessi negli ultimi anni ma soltanto alcuni hanno mostrato mantenere o migliorare le caratteristiche del precursore cisplatino, tra cui il carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, lobaplatino ed eptaplatino (fig. 1.10).

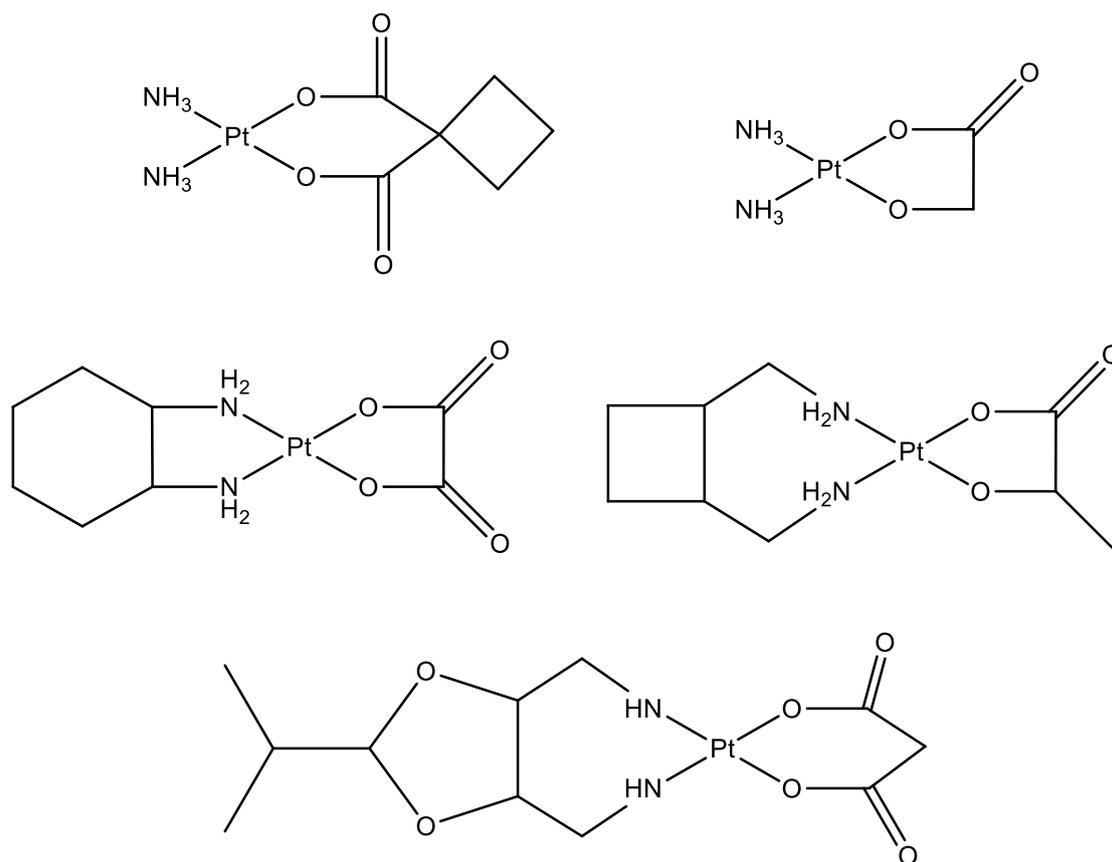


Figura 1.10: carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, lobaplatino ed eptaplatino

Il **carboplatino**, *cis*-[diammina(1,1-ciclobutandicarbossilato)platino(II)], come il cisplatino, ha un uso clinico generalizzato verso la maggior parte dei tumori. Somministrato per via endovenosa, presenta un'azione simile al cisplatino ma con tossicità ridotta, anche se un fattore limitante è legato alla formazione di mielodepressione e la trombocitopenia. È stato approvato dalla FDA nel 1990 ed è commercializzato con il nome di “paraplatino”.

L'**oxaliplatino**, *cis*-[(1*R*,2*R*-diamminocicloesano)ossalatoplatino(II)], sebbene il suo uso sia limitato dalle varie neuropatie causate dalla sua somministrazione, è stato ufficialmente approvato come agente antitumorale dalla FDA.

Gli altri tre complessi, **nedaplatino**, *cis*-[diamminaglicolatoplatino(II)], **lobaplatino**, *cis*-[(1,2-diamminometilciclobutano)lattatoplatino(II)], e **eptaplatino**, *cis*-[malonato((4,6-diamminometil)-2-isopropil-1,3-diossolano))platino(II)] sono tuttora in fase di sperimentazione mentre sono stati approvati in Giappone, Cina e Sud Corea come farmaci antitumorali nonostante causino effetti tossici quali mielotossicità e trombocitopenia.

1.4 Farmaci a base di Pt^{IV}

A seguito dello studio sui farmaci a base di Pt^{II}, l'interesse si è spostato su un'altra tipologia di complessi, i composti a base di Pt^{IV}.

I complessi di Pt^{IV} (configurazione d⁶) possiedono geometria ottaedrica, in cui sono presenti in posizione assiale due leganti aggiuntivi rispetto al complesso planare quadrato di Pt^{II}.

Questi due nuovi leganti, così come i precedenti, possono essere modulati in modo da variare le caratteristiche chimico-fisiche del complesso (lipofilicità, potenziale e cinetica di riduzione, solubilità...).

Grazie alle proprietà di questi complessi di Pt^{IV} è possibile superare molti problemi legati all'assunzione dei farmaci a base di Pt^{II}, in quanto essi sono più inerti cineticamente rispetto ai corrispondenti composti di Pt^{II}, oltre a presentare in generale una maggior solubilità.

In questi anni tre complessi di Pt^{IV} sono passati alla fase preclinica: Iproplatino, Satraplatino e Tetraplatino.

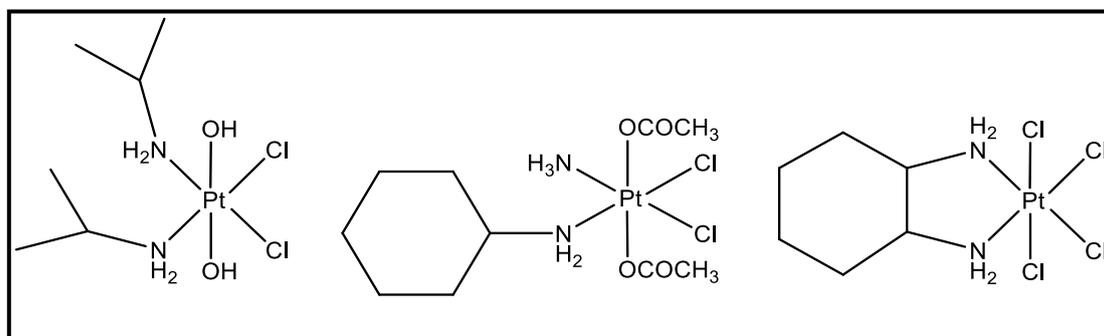


Figura 1.11: Iproplatino, Satraplatino e Tetraplatino

- 1) l'**iproplatino**, *cis,trans,cis*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)₂] (ipa= isopropilammina), di particolare interesse per la sua elevata solubilità^{12,13,14};
- 2) il **tetraplatino**, [Pt(DACH)Cl₄] (DACH= 1*R*,2*R*-diamminocicloesano), abbandonato alla fase I di sperimentazione a causa di una elevata neurotossicità indotta¹⁵;
- 3) il **satraplatino**, *cis,trans,cis*-[Pt(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)(OCOCH₃)₂Cl₂], in fase III di sperimentazione¹⁶.

L'elevata inerzia chimica, che permette di abbassare la tossicità sistematica e aumentando la probabilità che il farmaco arrivi al *target* cellulare, e la buona solubilità di questi farmaci li rendono adattabili all'assunzione orale.

Rimanendo nel circolo sanguigno nello stato ossidato, si riduce la perdita di farmaco attivo a causa di reazioni secondarie, e di conseguenza diminuiscono gli effetti collaterali.

<i>Composti</i>	<i>Status attuale</i>
<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: *Composti di platino entrati nei trials clinici dal 1971 ad oggi.*

1.4.1 Meccanismo di azione dei complessi di Pt^{IV}

I complessi di Pt^{IV} sono considerati dei profarmaci, che necessitano quindi di un'attivazione per svolgere la loro efficacia antitumorale.

È generalmente accettata l'ipotesi per cui la riduzione bieletronica a complesso di Pt^{II}, accompagnata dalla perdita dei leganti assiali, sia alla base dell'attività antitumorale dei complessi di Pt^{IV}. Sono infatti i metaboliti di Pt^{II} ad essere le specie attive.

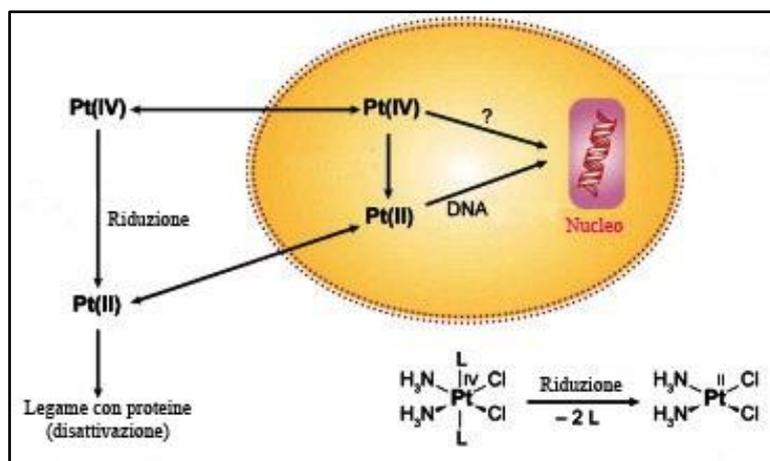


Figura 1.12: Meccanismo d'azione dei profarmaci a base di Pt^{IV}

La riduzione è favorita nell'ambiente tumorale ipossico e riducente (selettività). Il profarmaco di Pt^{IV} può essere ridotto sia nell'ambiente extracellulare ed entrare nella cellula attraverso la membrana come metabolita di Pt^{II}, oppure può essere ridotto dopo essere entrato nella cellula come complesso di Pt^{IV} (fig. 1.12).

Il legame diretto dei complessi di Pt^{IV} al DNA è stato osservato in vitro in ambiente privo di sostanze riducenti, ma queste reazioni sono trascurabili, in quanto i tempi di semivita sono di gran lunga superiori a quelli di riduzione.

Data l'importanza della riduzione, un parametro che influenza l'attività citotossica e da considerare nella progettazione di complessi di Pt^{IV} è il loro potenziale di riduzione, che deve essere compatibile con gli agenti ossidanti presenti nella cellula quali glutazione ed acido ascorbico.

L'acido ascorbico si trova in maggior quantità nel citoplasma (1 mM) mentre è presente soltanto a basse concentrazioni nel plasma sanguigno (50-150 μM). Il glutatione, invece, si trova in quantità modeste sia nel sangue (900 μM) sia all'interno delle cellule (2 mM).

Oltre al potenziale di riduzione, è anche importante studiare la cinetica di riduzione dei complessi di Pt^{IV} , che può essere valutata facendo reagire i profarmaci con agenti riducenti o, ancora meglio, con estratti cellulari¹⁷.

Un altro fattore molto importante per l'attività di questi composti è la loro lipofilità, che è correlata alla capacità di attraversamento delle membrane cellulari.

I vari parametri che condizionano l'attività di un farmaco possono essere modulati attraverso la scelta dei leganti.

Come nei complessi di Pt^{II} le ammine determinano l'attività citotossica dei metaboliti, mentre i *leaving groups* incidono sulla velocità d'idrolisi. I leganti assiali possono essere usati per variare le proprietà redox (potenziale e cinetica di riduzione a Pt^{II} o "attivazione") e lipofilità (correlata all'*uptake* cellulare).

Per via sintetica è possibile ottenere complessi con leganti assiali analoghi o differenti, in modo da variare le caratteristiche del complesso ed i possibili impieghi.

Inoltre, per migliorare la selettività dei complessi a base di platino, negli ultimi anni l'interesse si è spostato verso l'impiego di leganti assiali in grado di legarsi a vettori per farmaci, in modo da trasportare il complesso selettivamente all'interno il tessuto tumorale (metodi di *Drug Targeting and Delivery*, DTD).

I metodi di DTD sono metodologie atte a veicolare e indirizzare selettivamente i farmaci verso specifici bersagli per avere maggior concentrazione locale di farmaco e minori effetti collaterali. Il DTD si divide in "passivo" ed "attivo". Il primo sfrutta la vascolarizzazione dei tessuti neoplastici incompleta e disomogenea, che rende possibile il passaggio transmembrana di macromolecole (> 60 kDa) che normalmente non sarebbero in grado di uscire dal flusso sanguigno; inoltre l'inefficace drenaggio linfatico fa sì che tali macromolecole si accumulino nel tessuto tumorale. Questa particolarità può essere sfruttata legando le molecole di farmaco a macromolecole di massa molecolare per accumulare il sistema *carrier*/farmaco nell'ambiente peritumorale. Il DTD attivo invece sfrutta il meccanismo di riconoscimento molecola-recettore: le molecole di farmaco vengono legate a molecole bioattive quali ad esempio amminoacidi o polipeptidi, acido folico o ormoni; in questo modo si spera di aumentare l'*uptake* del farmaco esclusivamente in quelle cellule che presentano sulla superficie della membrana quel determinato recettore specifico per la molecola legata al farmaco.

1.4.2 Sintesi dei complessi di Pt^{IV}

Nella maggior parte dei casi, i complessi di Pt^{IV} vengono ottenuti per reazione di ossidazione dei corrispondenti complessi di Pt^{II} con un agente ossidante (tra cui il più utilizzato risulta essere il perossido di idrogeno) (fig. 1.13).

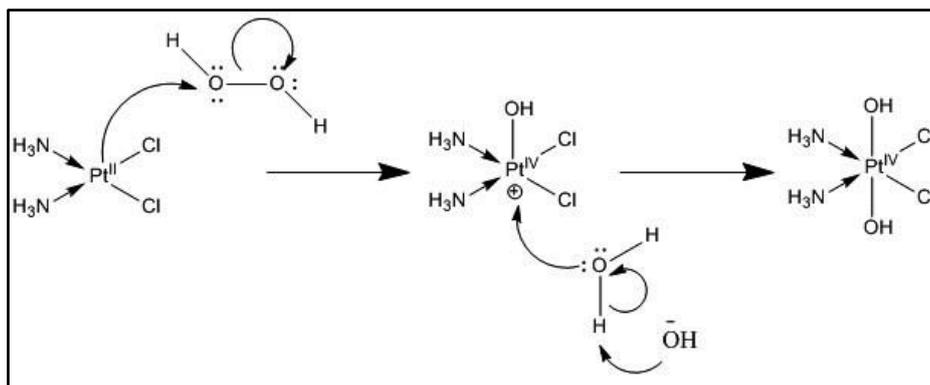


Figura 1.13: Meccanismo di ossidazione di Pt^{II} con H₂O₂ in acqua

Questa reazione prevede un'addizione ossidativa in cui il platino passa dallo stato di ossidazione +2 a +4 (perdendo due elettroni) coordinando due leganti in posizione assiale e passando dalla geometria planare quadrata ad ottaedrica.

Come si vede in fig. 1.13, partendo dal cisplatino disciolto in un solvente coordinante, il prodotto finale presenta in posizione assiale un gruppo ossidrilico derivante dall'acqua ossigenata ed un gruppo derivante dal solvente. Nel caso della reazione tra cisplatino e perossido d'idrogeno in acqua si forma il composto *cis,cis,trans*-diamminadidrossoplatino(IV), conosciuto come Oxoplatino.

Variando il solvente coordinante utilizzato, è possibile sintetizzare una serie di complessi che hanno come leganti assiali una molecola di proprietà modulabili ed un gruppo OH (fig. 1.14), reattivo per ulteriori sostituzioni con molecole quali anidridi, acidi carbossilici attivati o cloruri acilici.

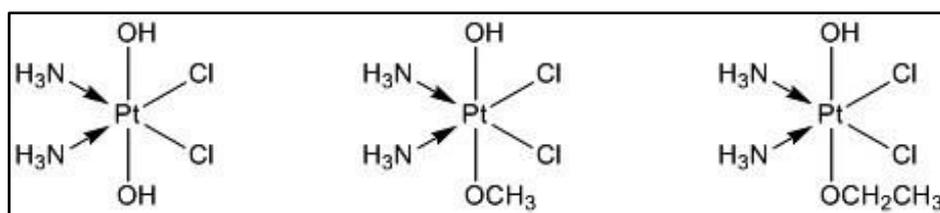


Figura 1.14: Esempi di prodotti ottenibili con la modulazione del solvente utilizzato

1.5 Obiettivo della tesi

Il lavoro di tesi si è incentrato sulla progettazione e lo studio, dal punto di vista chimico e biologico, di nuovi composti a base di platino.

La prima parte del lavoro si è basata sulla progettazione e sintesi di complessi a base di Pt^{II} con eterocicli come *carrier groups*. In particolare, si è eseguito il confronto tra metodi di sintesi tradizionali e mediante microonde in modo da verificare il possibile utilizzo delle microonde come via alternativa per ridurre i tempi di reazione e migliorare rese e purezze dei prodotti ottenuti.

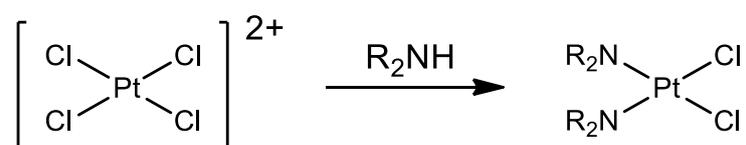


Figura 1.15: Schema di sintesi di complessi di Pt^{II}

In una seconda fase, mediante ossidazione del cisplatino sono stati ottenuti nuovi complessi di Pt^{IV} asimmetrici (con leganti assiali differenti), contenenti un gruppo funzionale disponibile per una successiva sostituzione.

Attraverso la modulazione del legante assiale, sono state create delle serie di composti con caratteristiche differenti e ne sono state studiate proprietà quali stabilità, cinetica e potenziali di riduzione ed attività biologica.

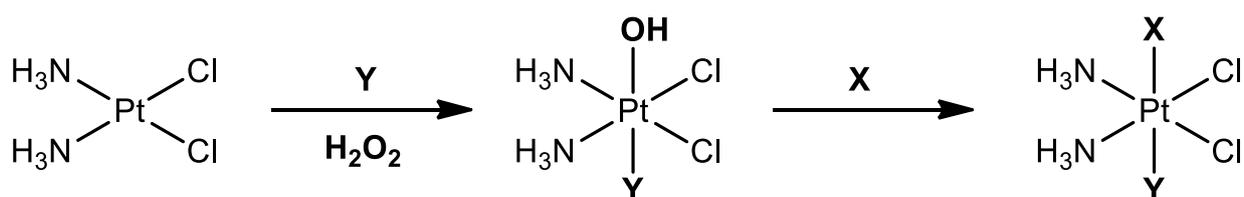


Figura 1.16: Schema di sintesi di complessi di Pt^{IV} asimmetrici

Per migliorare la selettività dei complessi di platino, è stata anche esplorata la sintesi di nuovi complessi di Pt^{IV}, utilizzabili per di *Drug Targeting and Delivery*, sia mediante legame diretto (formazione di legami covalenti) che per interazione secondaria (interazione elettrostatica o inclusione in cavità).

Per questo scopo sono state sfruttate macromolecole ad attività biologica utile per trasportare il farmaco tra cui: liposomi (inclusione all'interno della cavità), destrano funzionalizzato con gruppi

solfato (interazione elettrostatica), albumina (legame covalente ai gruppi laterali della catena proteica) ed acidi umici (legame covalente ai gruppi carbossilici).

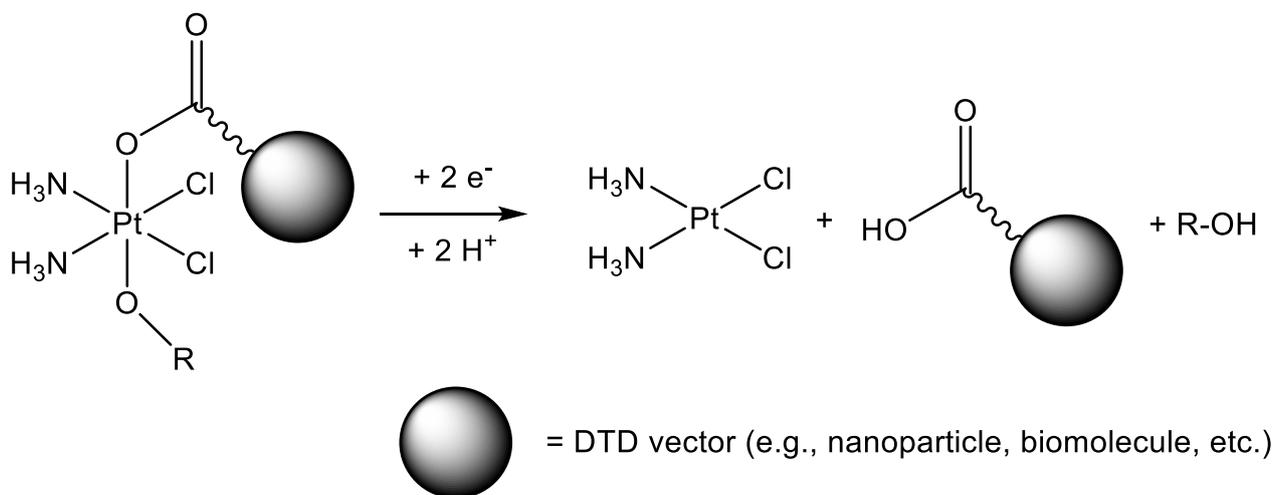


Figura 1.17: complessi di Pt^{IV} legati a vettori macromolecolari

1.6 Bibliografia

1. Lambertini, *Capire il cancro*, 1° ed. Milano, Alpha Test s.r.l. (2004).
2. R.B.J. King, *Cancer biology*, Pearson Education, Harlow UK (2000).
3. Stefano-Taddei, *Percorsi di biochimica*, Zanichelli.
4. M.J. Cleare, *Coord. Chem. Rev.*, 1974, 12, 349.
5. B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature*, 1969, 222, 385.
6. B. Rosenberg, B. Lippert, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, 1999, p.3.
7. B. Rosenberg, L. Van Camp, E.B. Grimley, A.J. Thomson, *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 1347.
8. P. Pil, S.J. Lippard, *Encyclopedia of cancer*, 1997, p.232.
9. D. Lebwohl, R. Canetta, *European Journal of cancer*, 1998, 34, 1522.
10. 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.
11. M.J. Cleare P.C. Hydes, *Metal Ions in Biological Systems*, Marcel Dekker (Eds.), New York, 1979,11, p. 1.
12. P.D. Braddock, T.A. Connors, M. Jones, A.R. Khokhar, D.H. Melzack, M: Tobe. *Chem.Biol Interact.*, 1975, 11, 145.
13. V.H.C Bramwell, D. Crowther, S. O'Malley, R. Swindell, R. Johnson, E. Cooper, E. Thatcher. *Cancer Treat.Rep.*, 1985, 69, 409.
14. M. Gordon, S. Hollander. *J. Med.*, 1993, 24, 209.
15. M. Christian, Abstracts, *7th International Symposium on Platinum and other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemiotherapy.*, 1995, S128.
16. 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.
17. E. Wexselblatt, D. Gibson, *What do you know about the reduction of Pt(IV) pro-drugs*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 2012, 220-229.

2. Sintesi di complessi di Pt^{II} contenenti eterocicli

Una piccola parte del lavoro di dottorato si è incentrata sulla sintesi di complessi di Pt^{II} di formula generale [PtA₂Cl₂] dove A sono eterocicli (piridina, picolina, ecc.). Questo lavoro è servito sia per sviluppare un diverso metodo per migliorare i complessi analoghi del cisplatino (modificare i leganti coordinati a Pt(II) invece di preparare complessi di Pt(IV)), sia per sviluppare un metodo di sintesi alternativo.

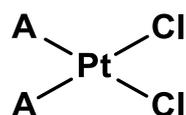


Figura 2.1: Struttura generale dei complessi di Pt^{II} (A = piridina, picolina e derivati chelanti)

La sintesi di questi complessi, infatti, è stata effettuata sfruttando l'utilizzo delle microonde, un metodo molto diffuso nel campo della chimica organica ma poco diffuso per la sintesi di complessi di platino.

2.1 Le microonde

Le sintesi assistite da microonde stanno guadagnando sempre più importanza nel campo della chimica organica ma tuttavia risultano ancora poco utilizzate nella chimica di coordinazione.

A differenza del riscaldamento tradizionale, che richiede tempi lunghi e risulta spesso inefficiente e disomogeneo, mediante l'utilizzo delle microonde si possono eseguire le stesse reazioni in pochi minuti. Queste tipologie di reazione sono in rapida espansione grazie ai diversi effetti positivi che si possono ottenere utilizzando le microonde. La sintesi con microonde può essere applicata efficacemente alla maggior parte delle reazioni, rendendole più rapide, migliorando le rese e producendo specie chimiche più pulite.

Le microonde sono in grado di trasferire energia direttamente alla specie reattive ("riscaldamento molecolare") e per questo possono promuovere trasformazioni chimiche che mediante il calore convenzionale non è possibile ottenere.

2.1.1 Natura delle onde elettromagnetiche

Le microonde (Figura 2.2) sono una forma di energia elettromagnetica caratterizzate dalle frequenze più basse dello spettro elettromagnetico, cioè 300-300.000 MHz. Applicando queste frequenze alle molecole, vengono interessati solamente i moti di rotazione molecolare, e non la struttura della molecola¹.

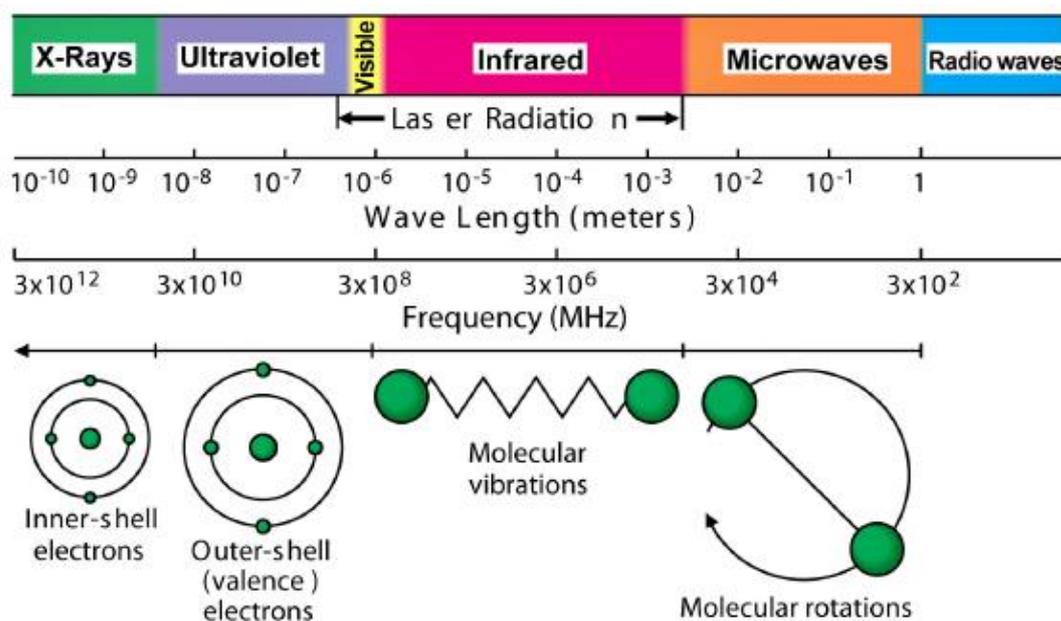


Figura 2.2: Spettro elettromagnetico

La principale frequenza utilizzata per le reazioni chimiche risulta essere 2450 MHz, poiché possiede la profondità di penetrazione giusta per interagire con i campioni di laboratorio in scala ridotta, e sono presenti diverse fonti in grado di generare le microonde con questa frequenza .

La microonda è costituita da un campo elettrico e un campo magnetico (Figura 2.3) con componenti perpendicolari tra loro e rispetto all'asse di propagazione. Nelle reazioni chimiche solo il campo elettrico trasferisce energia alle molecole mentre il campo magnetico normalmente non porta a nessuna interazione.

Le microonde si muovono alla velocità della luce (300.000 km/s) e l'energia dei fotoni è molto bassa (0,037 kcal/mol) rispetto all'energia tipica necessaria per scindere i legami molecolari (80-120

kcal/mol). Per questo motivo le microonde non intaccano la struttura della molecola e l'effetto di assorbimento di microonde è puramente cinetico.

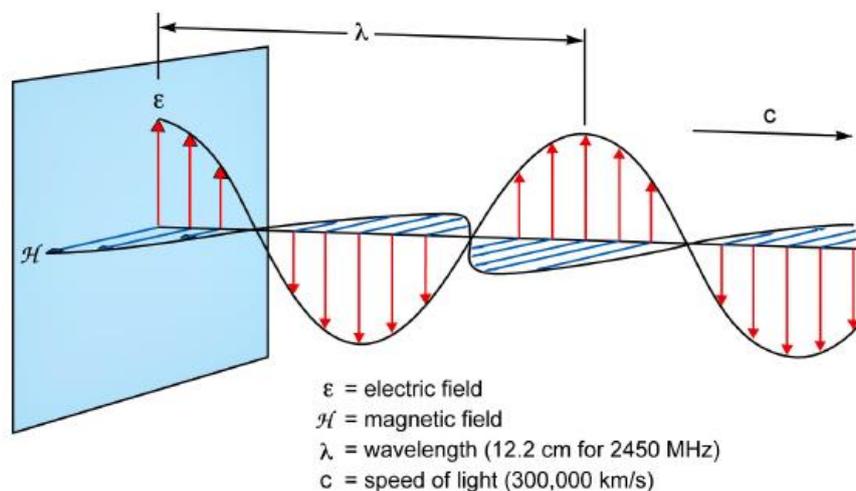


Figura 2.3: Onda elettromagnetica

2.1.2 Principio del riscaldamento

Tradizionalmente, la sintesi chimica prevede un riscaldamento conduttivo, mediante una fonte di calore esterna, in cui il calore viene irradiato nella sostanza, passando prima attraverso le pareti del recipiente e poi arrivando al solvente ed ai reagenti (Figura 2.4). Questo è un metodo lento, inefficiente e disomogeneo per trasferire l'energia al sistema, in quanto dipende dalla conducibilità termica dei diversi materiali che devono essere penetrati. Questo porta ad avere una temperatura maggiore del recipiente rispetto alla soluzione contenuta in esso. Possono infatti passare ore prima di raggiungere l'equilibrio termico tra contenitore e soluzione interna.

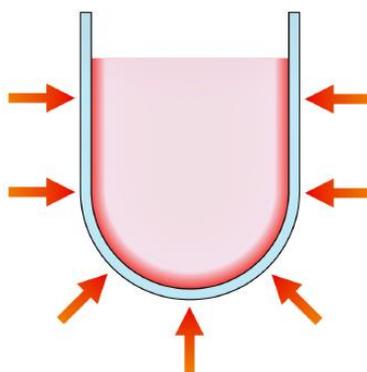


Figura 2.4: Distribuzione del calore con riscaldamento tradizionale

Il riscaldamento a microonde, invece, va a colpire direttamente le molecole che sono presenti nella miscela di reazione, portando ad un rapido aumento della temperatura. Poiché il processo non dipende dalla conducibilità termica dei materiali, il risultato è un surriscaldamento localizzato istantaneo di tutto ciò che reagirà mediante rotazione dipolare o conduzione ionica (i due meccanismi fondamentali per trasferire energia dalle microonde alle molecole). Questo processo può essere descritto come "*instant on-instant off*".

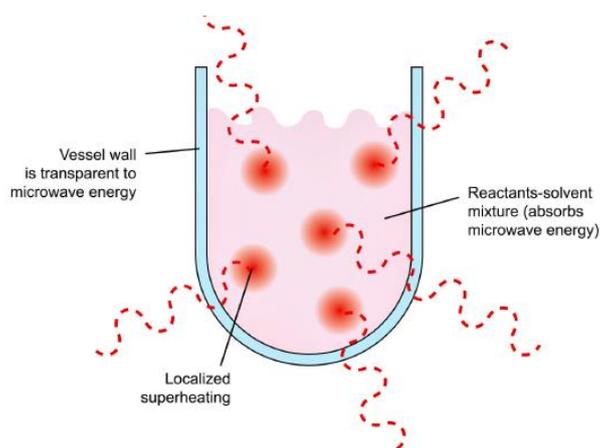


Figura 2.5: Distribuzione del calore con riscaldamento a microonde

La *rotazione dipolare* è una interazione in cui le molecole polari cercano di allinearsi con il campo elettrico in rapida evoluzione. L'efficacia di questo meccanismo è legato alla polarità delle molecole in esame e dalla loro capacità di allinearsi con il campo elettrico. Ci sono parecchi fattori che determinano l'efficienza di questo meccanismo, tuttavia, qualsiasi specie polare (solvente o substrato) verrà influenzata da questo fenomeno.

Il secondo modo per trasferire l'energia è attraverso la *conduzione ionica*, che necessita la presenza di ioni liberi o specie ioniche all'interno dell'ambiente di reazione. Il campo elettrico genera un movimento ionico in cui le molecole cercano di orientarsi nel campo in rapida evoluzione. Ciò causa il surriscaldamento istantaneo precedentemente descritto. La conduzione ionica viene influenzata anche dalla temperatura: all'aumentare della temperatura, il trasferimento di energia risulta più efficiente.

2.1.3 La scelta del solvente

La maggior parte delle reazioni avvengono in soluzione, e per questo, la scelta del solvente può risultare determinante nell'ottenere il prodotto desiderato. Una delle caratteristiche più importanti di un solvente è la sua polarità. Con l'utilizzo delle microonde, questo parametro risulta fondamentale: maggiore è la polarità della soluzione, maggiore è la sua capacità di interagire con le microonde. Come visto prima, questa interazione porta ad un rapido aumento della temperatura e della velocità di reazione.

Molti fattori influenzano la polarità e contribuiscono alle caratteristiche di assorbimento di un singolo solvente:

- La *costante dielettrica* (ϵ'): anche nota come permittività relativa, misura la sua capacità di immagazzinare cariche elettriche.
- Il *momento di dipolo*: è il prodotto della distanza tra le cariche nella molecola di solvente moltiplicato per la grandezza di quella carica. Molecole con grandi momenti di dipolo hanno anche grandi costanti dielettriche, dato che la polarizzazione dipende dalla rotazione dipolare.
- La *perdita dipolare*: è la quantità di energia introdotta nel sistema che viene dissipata per conversione in calore.
- La *tangente delta* ($\tan \delta$): è sia il fattore di dissipazione del campione che l'efficienza nella trasformazione della microonda in energia termica.
- Il *tempo di rilassamento dielettrico*: è il tempo necessario perché il 63% delle molecole raggiungano il loro stato "fondamentale" casualmente disordinato, partendo dallo stato ordinato durante l'utilizzo delle microonde, quando queste vengono rimosse. Gruppi funzionali, temperatura, frequenza e volume influenzano il tempo di rilassamento di un solvente.

I tre principali parametri dielettrici (tangente delta, costante dielettrica e perdita dielettrica) sono tutti legati alla capacità di un solvente di assorbire l'energia a microonde. Essendo la frequenza fissa a 2450 MHz, l'unico fattore che può influenzare i tre parametri è la temperatura: con l'aumento della temperatura si ha una diminuzione del suo tempo di rilassamento e dei parametri dielettrici. Ci sono alcune eccezioni, ma questa è generalmente la tendenza seguita dai più comuni solventi.

Nelle sintesi con microonde i punti di ebollizione sono un fattore trascurabile data la possibilità di raggiungere temperature superiori al punto di ebollizione grazie al rapido riscaldamento localizzato.

Il parametro più indicativo di quanto rapidamente un solvente raggiungerà la temperatura desiderata è rappresentato dalla perdita dielettrica ϵ'' (terza colonna tabella 2.1). In generale, maggiore è il valore, più efficiente il solvente convertirà l'energia delle microonde in energia termica, e quindi, più velocemente la temperatura aumenterà.

Tabella 2.1: Parametri dielettrici dei principali solventi utilizzati

Solvent (bp °C)	Dielectric Constant (ϵ')	Solvent	Tan δ	Solvent	Dielectric Loss (ϵ'')
Water (100)	80.4	Ethylene Glycol	1.350	Ethylene Glycol	49.950
Formic Acid (100)	58.5	Ethanol	.941	Formic Acid	42.237
DMSO (189)	45.0	DMSO	.825	DMSO	37.125
DMF (153)	37.7	2-Propanol	.799	Ethanol	22.866
Acetonitrile (82)	37.5	1-Propanol	.757	Methanol	21.483
Ethylene Glycol (197)	37.0	Formic Acid	.722	Nitrobenzene	20.497
Nitromethane (101)	36.0	Methanol	.659	1-Propanol	15.216
Nitrobenzene (202)	34.8	Nitrobenzene	.589	2-Propanol	14.622
Methanol (65)	32.6	1-Butanol	.571	Water	9.889
NMP (215)	32.2	Isobutanol	.522	1-Butanol	9.764
Ethanol (78)	24.3	2-Butanol	.447	NMP	8.855
Acetone (56)	20.7	2-Methoxyethanol	.410	Isobutanol	8.248
1-Propanol (97)	20.1	o-Dichlorobenzene	.280	2-Butanol	7.063
MEK (80)	18.5	NMP	.275	2-Methoxyethanol	6.929
2-Propanol (82)	18.3	Acetic Acid	.174	DMF	6.070
1-Butanol (118)	17.1	DMF	.161	o-Dichlorobenzene	2.772
2-Methoxyethanol (124)	16.9	1,2-Dichloroethane	.127	Acetonitrile	2.325
2-Butanol (100)	15.8	Water	.123	Nitromethane	2.304
Isobutanol (108)	15.8	Chlorobenzene	.101	MEK	1.462
1,2-Dichloroethane (83)	10.4	Chloroform	.091	1,2-Dichloroethane	1.321
o-Dichlorobenzene (180)	9.9	MEK	.079	Acetone	1.118
Dichloromethane (40)	9.1	Nitromethane	.064	Acetic Acid	1.079
THF (66)	7.4	Acetonitrile	.062	Chloroform	0.437
Acetic Acid (113)	6.2	Ethyl Acetate	.059	Dichloromethane	0.382
Ethyl Acetate (77)	6.0	Acetone	.054	Ethyl Acetate	0.354
Chloroform (61)	4.8	THF	.047	THF	0.348
Chlorobenzene (132)	2.6	Dichloromethane	.042	Chlorobenzene	0.263
o-Xylene (144)	2.6	Toluene	.040	Toluene	0.096
Toluene (111)	2.4	Hexane	.020	o-Xylene	0.047
Hexane (69)	1.9	o-Xylene	.018	Hexane	0.038

I solventi riportati in tabella 2.2 possono essere classificati in tre gruppi differenti: solventi ad alto, medio e basso assorbimento.

Esaminando i valori di perdita dielettrica ϵ'' , i solventi ad alto assorbimento sono quelli che hanno le perdite dielettriche superiori 1400, a medio assorbimento in genere hanno valori di perdita dielettrica tra 1.00 e 13.99, e a basso assorbimento hanno perdite dielettriche inferiori di 1.00.

I solventi ad *elevato assorbimento*, come alcoli a catena corta, dimetilsolfossido (DMSO) e nitrobenzene hanno grandi perdite dielettriche e per questo si riscaldano molto rapidamente se sottoposti a microonde.

Solventi organici a *medio assorbimento* includono dimetilformammide (DMF), acetonitrile, butanoli, chetoni, ed acqua. Questi si riscaldano in maniera molto efficiente, ma richiedono più tempo per raggiungere la temperatura desiderata.

Infine i solventi a *basso assorbimento* risultano essere cloroformio, diclorometano, etilacetato, eteri ed idrocarburi. Questi possono essere riscaldati a temperature ben al di sopra loro punti di ebollizione ma richiedono molto più tempo.

Tabella 2.2: *Classificazione dei solventi in base alle proprietà di accoppiamento con le microonde*

Absorbance Level	Solvents
High	DMSO; EtOH; MeOH; Propanols; Nitrobenzene; Formic Acid; Ethylene Glycol
Medium	Water; DMF; NMP; Butanols; Acetonitrile; HMPA; Methyl Ethyl Ketone, Acetone, and other ketones; Nitromethane; o-Dichlorobenzene; 1,2-Dichloroethane; 2-Methoxyethanol; Acetic Acid; Trifluoroacetic Acid
Low	Chloroform; Dichloromethane; Carbon Tetrachloride; 1,4-Dioxane, THF, Glyme, and other ethers; Ethyl Acetate; Pyridine; Triethylamine; Toluene; Benzene; Chlorobenzene; Xylenes; Pentane, Hexane, and other hydrocarbons

Oltre all'efficienza di assorbimento di un solvente, bisogna considerare anche le pressioni che si generano nel contenitore, a determinate temperature, che non devono superare la pressione massima consentita dallo strumento.

L'utilizzo delle microonde quindi, oltre a permettere un riscaldamento omogeneo del campione, porta ad una riduzione dei sottoprodotti di reazione, e permette di lavorare a temperature elevate (anche oltre il punto di ebollizione del solvente) riducendo drasticamente i tempi di reazione.

2.2 Sintesi dei complessi di Pt^{II} con eterocicli

La sintesi prevede la sostituzione di due leganti cloruro sul complesso K₂[PtCl₄] con eterocicli (fig 2.6).

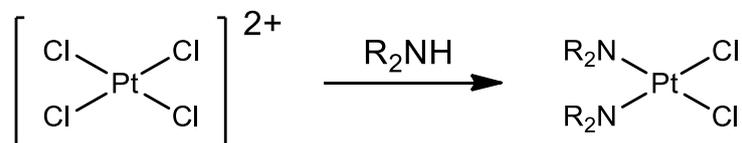


Figura 2.6: Schema di sintesi dei complessi [Pt(NR₂)₂(Cl)₂]

Sfruttando l'applicazione delle microonde si è tentato di sintetizzare i complessi di Pt^{II} di formula [Pt(A)₂(Cl)₂] dove A sono eterocicli (fig. 2.7):

Eterocicli monodentati

- [PtCl₂(py)₂] (1) py = piridina
- [PtCl₂(4-pic)₂] (2) 4-pic = 4-picolina
- [PtCl₂(3-pic)₂] (3) 3-pic = 3-picolina
- [PtCl₂(2-pic)₂] (4) 2-pic = 2-picolina

Eterocicli bidentati

- [PtCl₂(bipy)] (5) bipy = 2-2'-bipiridina
- [PtCl₂(L₁)] (6) L₁ = 4,4'-bis(2-morfolinoetossi)-2,2'-bipiridina
- [PtCl₂(L₂)] (7) L₂ = 4,4'-bis(2-(piperidin-1-il)etossi)-2,2'-bipiridina
- [PtCl₂(L₃)] (8) L₃ = 4,4'-bis(2-(pirrolidin-1-il)etossi)-2,2'-bipiridina

La scelta dei leganti L₁, L₂ e L₃ (bipiridine sostituite) è legata alle buone proprietà biologiche riscontrate su una serie di complessi di Cu^{II} contenenti terpiridine o bipiridine². In particolare il legante 2,2-bipiridina sostituito con ammine cicliche ha portato ad ottimi risultati. Tutti questi complessi di Cu^{II} hanno mostrato un'elevata attività antiproliferativa sulle linee tumorali A2780 (carcinoma ovarico) e A2780R (l'omologa cisplatino resistente), mostrandosi da tre a cinque volte più citotossici del cisplatino. Questi complessi portano anche ad un'impressionante attività di scissione del DNA plasmidico, innescando rotture del DNA a doppio filamento attraverso un percorso ossidativo. In particolare, le ammine cicliche nei leganti piridinici sembrano aumentare

l'affinità di legame del complesso al DNA attraverso la formazione di un'interazione elettrostatica con i gruppi fosfato dello "scheletro" del DNA.

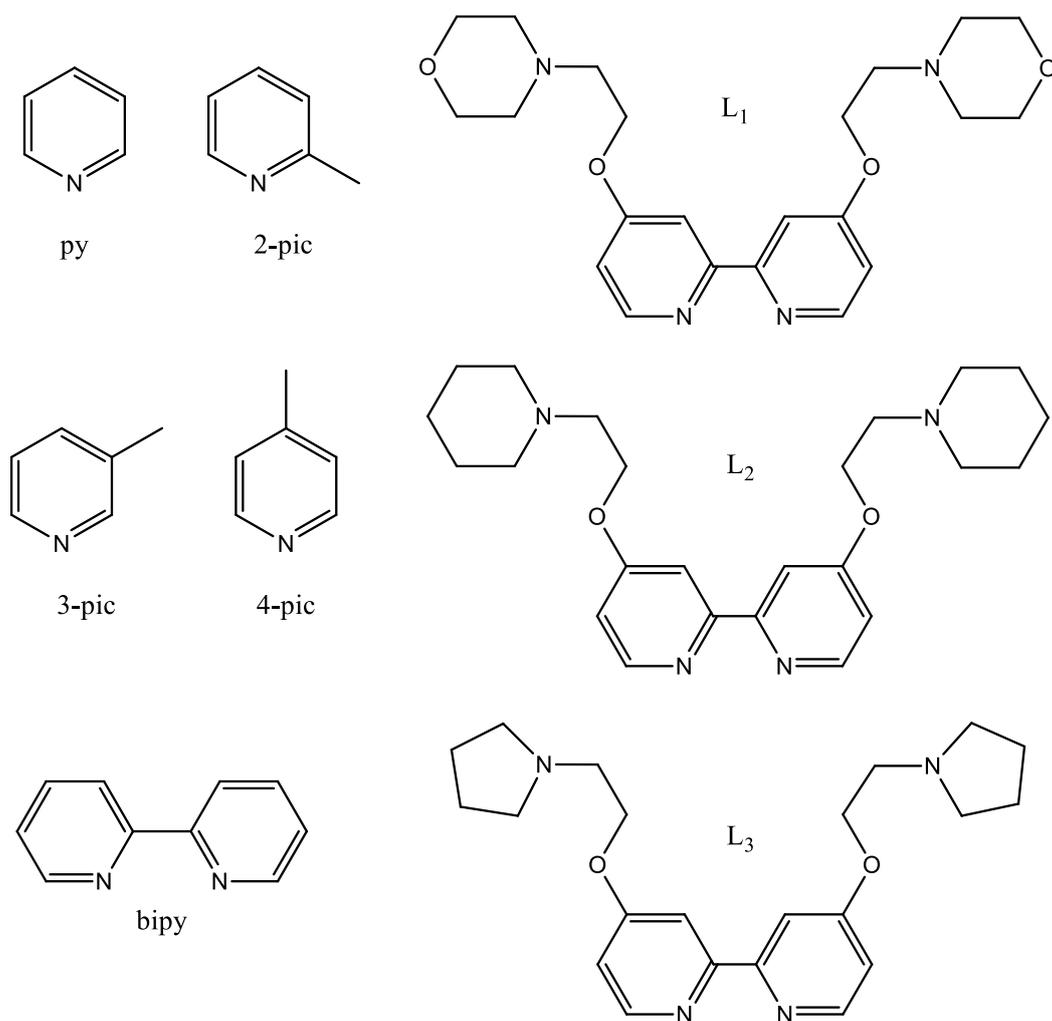


Figura 2.7: Leganti eterociclici utilizzati nel lavoro

2.2.1 Sintesi via microonde con leganti monodentati

SINTESI DEI COMPLESSI 1-4:

A 60 mg di K_2PtCl_4 (0.144 mmol) vengono aggiunti 2 equivalenti di legante (rispettivamente 23.3 μ l di piridina, 28.0 μ l di 4-picolina, 28.0 μ l di 3-picolina, 28.4 μ l di 2-picolina) in 3 ml di acqua e 1 ml di etanolo. La reazione viene condotta mediante microonde per 15 minuti a 60°C in vial da 10 ml tappato (con potenza impostata dallo strumento per raggiungere e mantenere la temperatura di reazione).

A fine reazione il prodotto insolubile viene separato dalla soluzione e lavato più volte con acqua, etanolo e dietilere.

Le sintesi dei complessi con leganti monodentati **1-4** ha portato a ottime rese e purezze ad eccezione del complesso contenente 2-picolina (**4**).

Rese: 30 mg di **1** (49%), 31 mg di **3** (48%) e 32 mg di **2**(52%).

L'elevato ingombro sterico del legante in posizione vicinale nella 2-picolina non ha permesso la formazione del complesso desiderato ma, come dimostrato dall'analisi RP-HPLC-ESI-MS, ha portato alla formazione di più specie di platino solubili tra cui, sali dimetallici come sale di Magnus, complessi mono- o tri-amminici, ecc.

CARATTERIZZAZIONE DEI COMPLESSI 1-4:

Tutte le caratterizzazioni NMR e RP-HPLC-ESI-MS in questo lavoro sono state effettuate con i seguenti strumenti:

Le analisi di cromatografia liquida accoppiata con spettrometria di massa (RP-HPLC-ESI-MS) 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. Per la cromatografia è stata utilizzata come fase stazionaria una colonna Phenomenex Gemini® 5 μ m C18, 250 \times 3.00 mm ID ed una fase mobile costituita da una soluzione acquosa di acido formico (15 μ M) e metanolo puro (in % differenti in base al complesso analizzato), con un flusso di 0,500 mL/min, con 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 25°C.

Gli spettri di massa ESI sono stati ottenuti fissando le temperature della sorgente e di desolvatazione, rispettivamente, a 150°C e 250°C. Il voltaggio impiegato per il cono ed il capillare è stato fissato, rispettivamente, a 30 V ed a 2.70 kV.

Le misure NMR sono state effettuate alla temperatura di 300K 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 .

[PtCl₂(py)₂] (1)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC per confermare l'avvenuta reazione e la purezza del composto.

RP-HPLC-MS

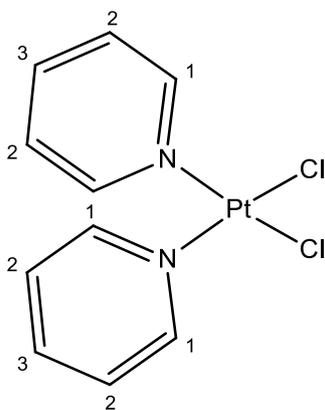
Essendo poco solubile nei solventi utilizzabili per l'analisi ESI-MS e RP-HPLC, è stata caratterizzata la specie solvolizzata ottenuta mantenendo il campione in DMSO per 4h.

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e dal 50% di metanolo e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma ha mostrato un unico picco attribuibile a complessi di platino ed il corrispondente spettro di massa ha mostrato il picco relativo allo ione [M-Cl⁺+DMSO]⁺ con valore di m/z = 467.3.

NMR

Gli spettri del complesso **1** sono stati registrati in CDCl₃ a 300K.



- Spettro ^1H NMR

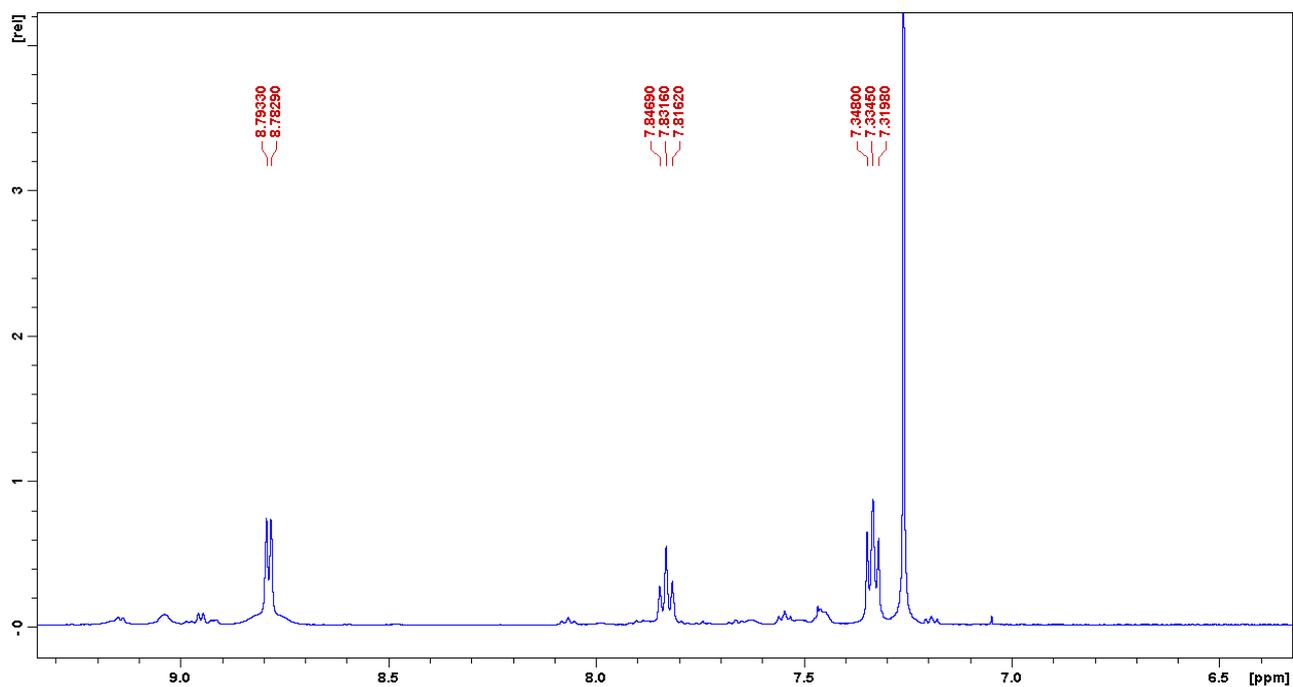


Figura 2.8: Spettro ^1H del complesso **1**

Tabella 2.3: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **1**

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>	<i>Molteplicità</i>	<i>J (Hz)</i>	<i>Integrazione</i>
7.33	2	t	7.5	4
7.83	3	t	7.5	2
8.79	1	d	5	4

- Spettro ^{13}C NMR

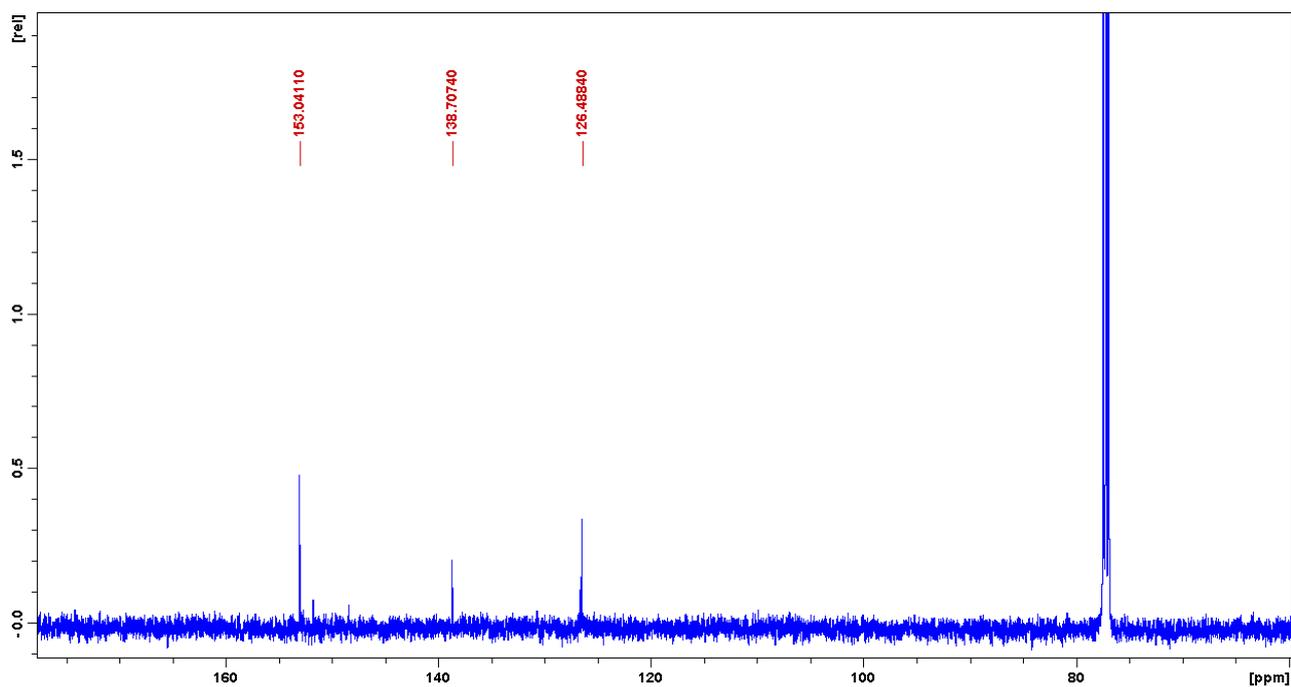


Figura 2.9: Spettro ^{13}C del complesso 1

Tabella 2.4: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 1

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>
126.5	3
138.7	2
153.0	1

- Spettro ^{195}Pt NMR

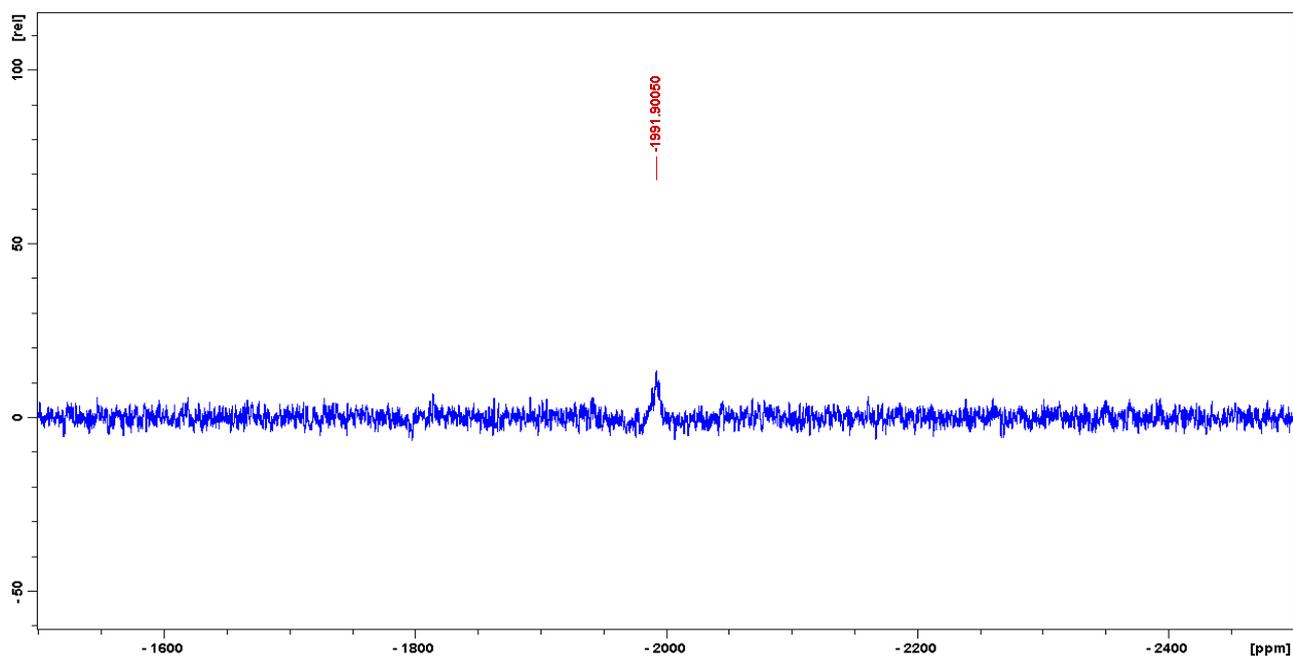


Figura 2.10: Spettro ^{195}Pt del complesso 1

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un picco a -1992 ppm, che cade in una zona di *chemical shift* caratteristica per i complessi di Pt^{II} con intorno chimico PtN_2Cl_2 .

[Pt(4-picolina)₂Cl₂] (2)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC per confermare l'avvenuta reazione e la purezza del composto.

RP-HPLC-MS

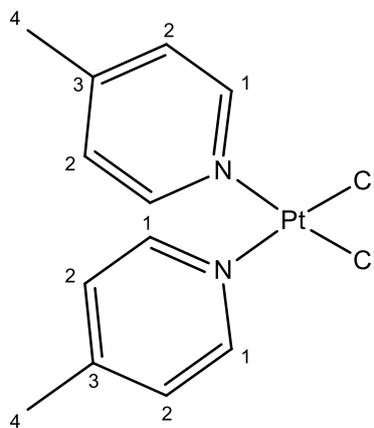
Essendo poco solubile nei solventi "convenzionali", è stata caratterizzata mediante ESI-MS e RP-HPLC la specie solvolizzata ottenuta mantenendo il campione in DMSO per 4h.

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e dal 50% di metanolo e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma ha mostrato un unico picco attribuibile a complessi di platino ed il corrispondente spettro di massa ha mostrato il picco relativo allo ione $[M-Cl^+DMSO]^+$ con valore di $m/z = 495.3$.

NMR

Gli spettri del complesso **2** sono stati registrati in CDCl₃ a 300K.



- Spettro ^1H NMR

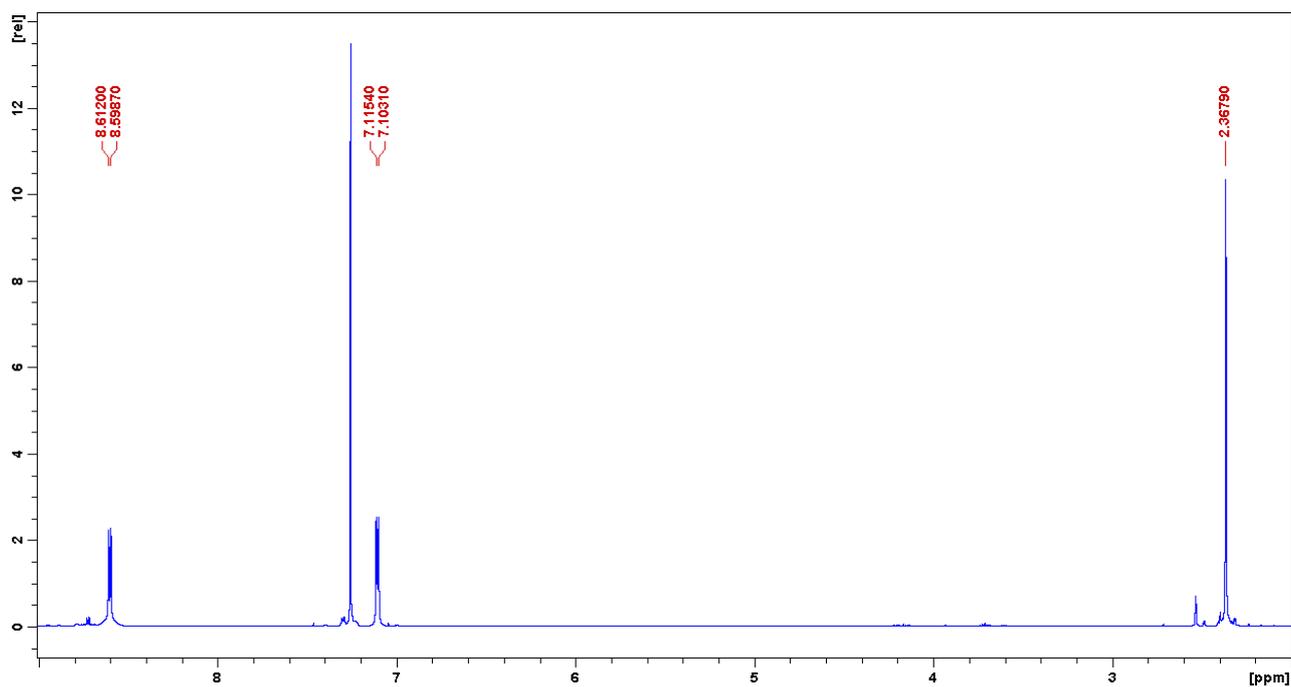


Figura 2.11: Spettro ^1H del complesso 2

Tabella 2.5: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 2

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>	<i>Molteplicità</i>	<i>J (Hz)</i>	<i>Integrazione</i>
2.37	4	s		6
7.11	2	d	6.1	4
8.60	1	d	6.6	4

• Spettro ^{13}C NMR

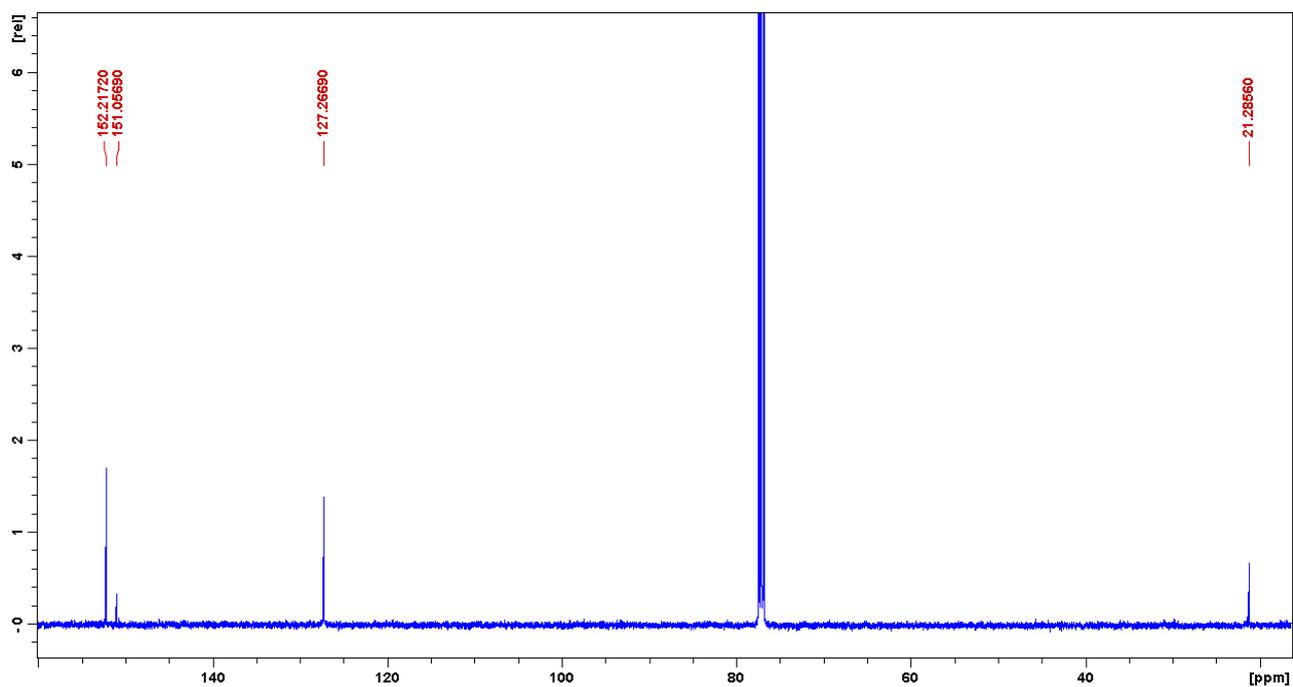


Figura 2.12: Spettro ^{13}C del complesso 2

Tabella 2.6: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 2

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
21.3	4
127.3	2
151.1	3
152.2	1

- Spettro ^{195}Pt NMR

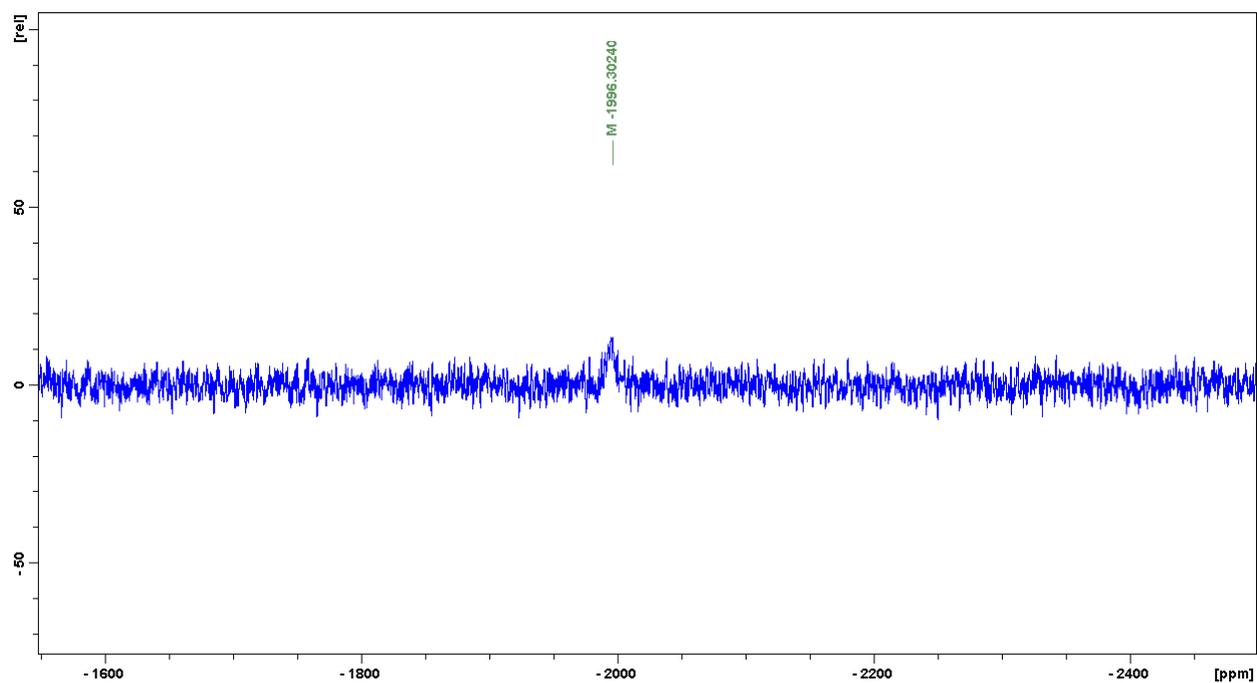


Figura 2.13: Spettro ^{195}Pt del complesso 2

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a -1996 ppm, cioè in una zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{II} con intorno chimico PtN_2Cl_2 .

[Pt(3-picolina)₂Cl₂] (3)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC per confermare l'avvenuta reazione e la purezza del composto.

RP-HPLC-MS

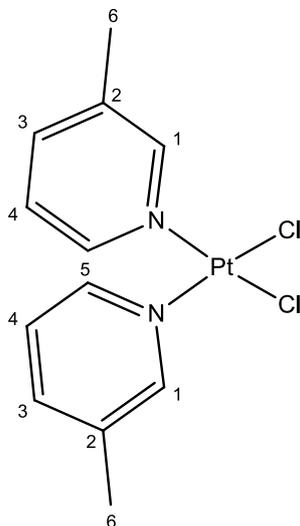
Essendo poco solubile nei solventi "convenzionali", è stata caratterizzata mediante ESI-MS e RP-HPLC la specie solvolizzata ottenuta mantenendo il campione in DMSO per 4 h.

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e dal 50% di metanolo e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma ha mostrato un unico picco attribuibile a complessi di platino ed il corrispondente spettro di massa ha mostrato il picco relativo allo ione $[M-Cl+DMSO]^+$ con valore di $m/z = 495.3$.

NMR

Gli spettri del complesso **3** sono stati registrati in CDCl₃ a 300K.



- Spettro ¹H NMR

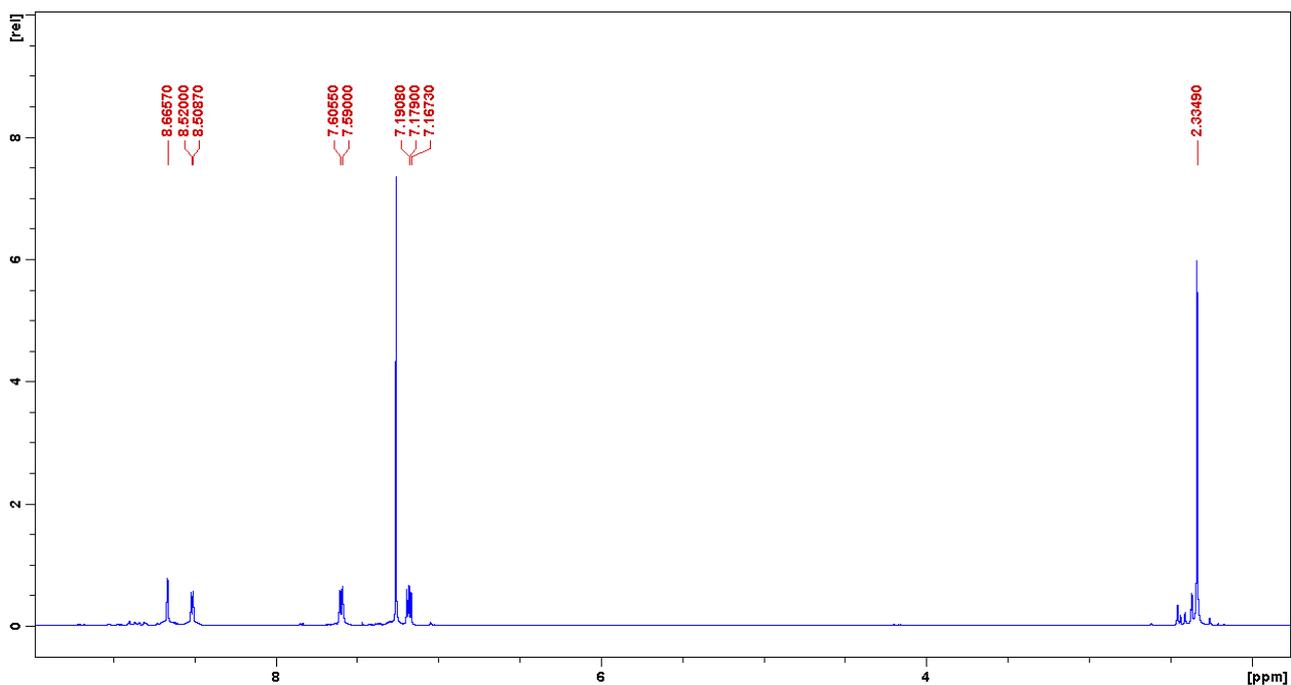


Figura 2.14: Spettro ^1H del complesso 3

Tabella 2.7: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 3

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
2.33	6	s		6
7.18	4	t	5.8	2
7.60	3	d	7.7	2
8.51	5	d	6.0	2
8.67	1	s		2

- Spettro ^{13}C NMR

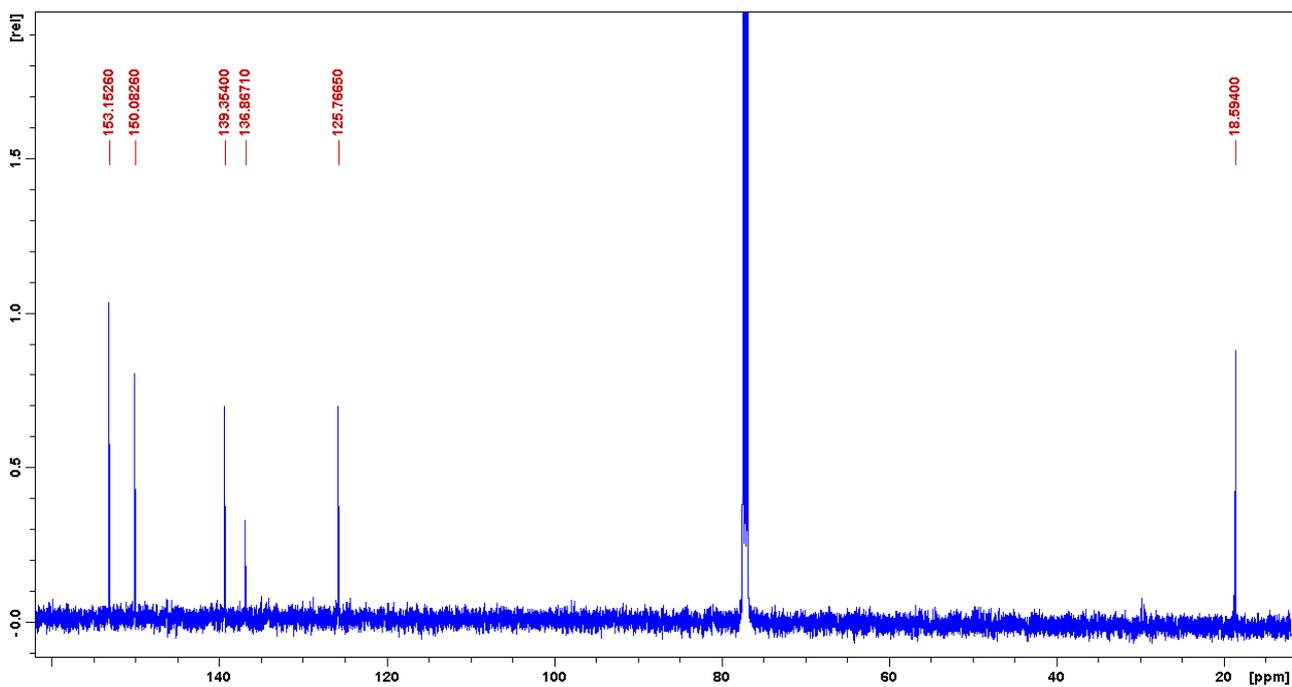


Figura 2.15: Spettro ^{13}C del complesso 3

Tabella 2.8: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 3

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
18.6	6
125.8	4
136.9	2

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
139.4	3
150.1	5
153.1	1

- Spettro ^{195}Pt NMR

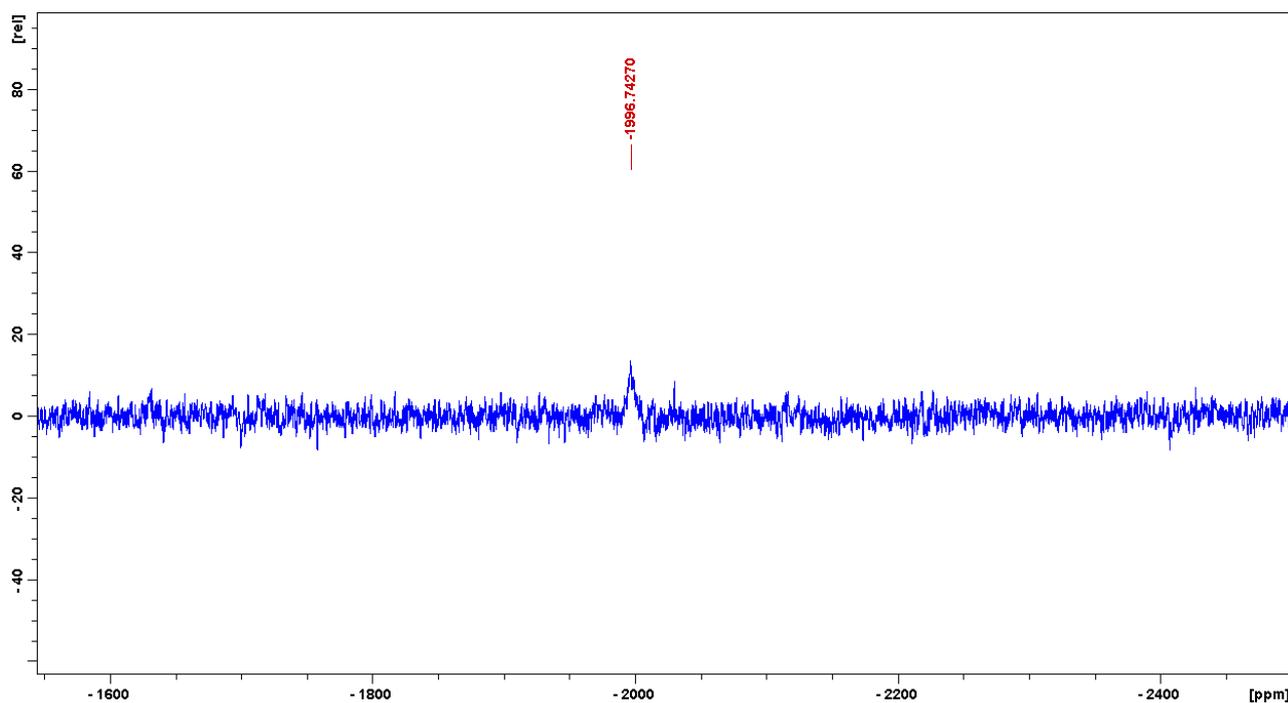


Figura 2.16: Spettro ^{195}Pt del complesso **3**

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un picco a -1997 ppm, che cade nella zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{II} con intorno chimico PtN_2Cl_2 .

2.2.2 Sintesi via microonde con leganti bidentati

SINTESI DEI COMPLESSI 5-8:

A 30 mg di K_2PtCl_4 (0.144 mmol) viene aggiunto un equivalente di legante (11.2 mg di 2-2'-bipiridina, 29.8 mg di L_1 , 29.5 mg di L_2 e 27.5 mg di L_3) in 3 ml di acqua e 1 ml di etanolo. La reazione viene condotta mediante microonde per 15 minuti a $60^\circ C$, in *vial* da 10 ml mediante la variazione della potenza durante l'esperimento in modo da mantenere fissa la temperatura.

A fine reazione il prodotto insolubile viene separato dalla soluzione e lavato più volte con acqua, etanolo e dietilere.

Resa: 24 mg di **5** (71%)

Nelle sintesi dei complessi con legante bidentato **5-8** solo la reazione con la 2-2'-bipiridina ha portato al prodotto desiderato, mentre con i leganti più ingombrati (L_1 , L_2 e L_3) le condizioni di reazione hanno portato alla degradazione dei reagenti e la formazione di sottoprodotti.

[Pt(2,2'-bipy)Cl₂] (5)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC per confermare l'avvenuta reazione e la purezza del composto.

RP-HPLC-MS

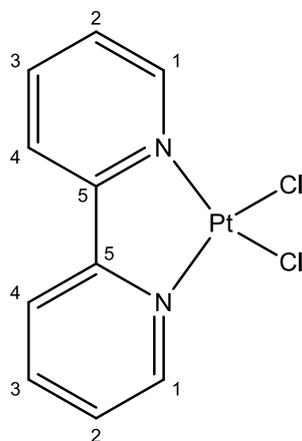
Essendo poco solubile nei solventi "convenzionali", è stata caratterizzata mediante ESI-MS e RP-HPLC la specie solvolizzata ottenuta mantenendo il campione in DMSO per 4h.

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e dal 50% di metanolo e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma ha mostrato un unico picco attribuibile a complessi di platino ed il corrispondente spettro di massa ha mostrato il picco relativo allo ione $[M-Cl+DMSO]^+$ con valore di $m/z = 464.3$.

NMR

Gli spettri del complesso **5** sono stati registrati in d_7 -DMF a 300K.



- Spettro ^1H NMR

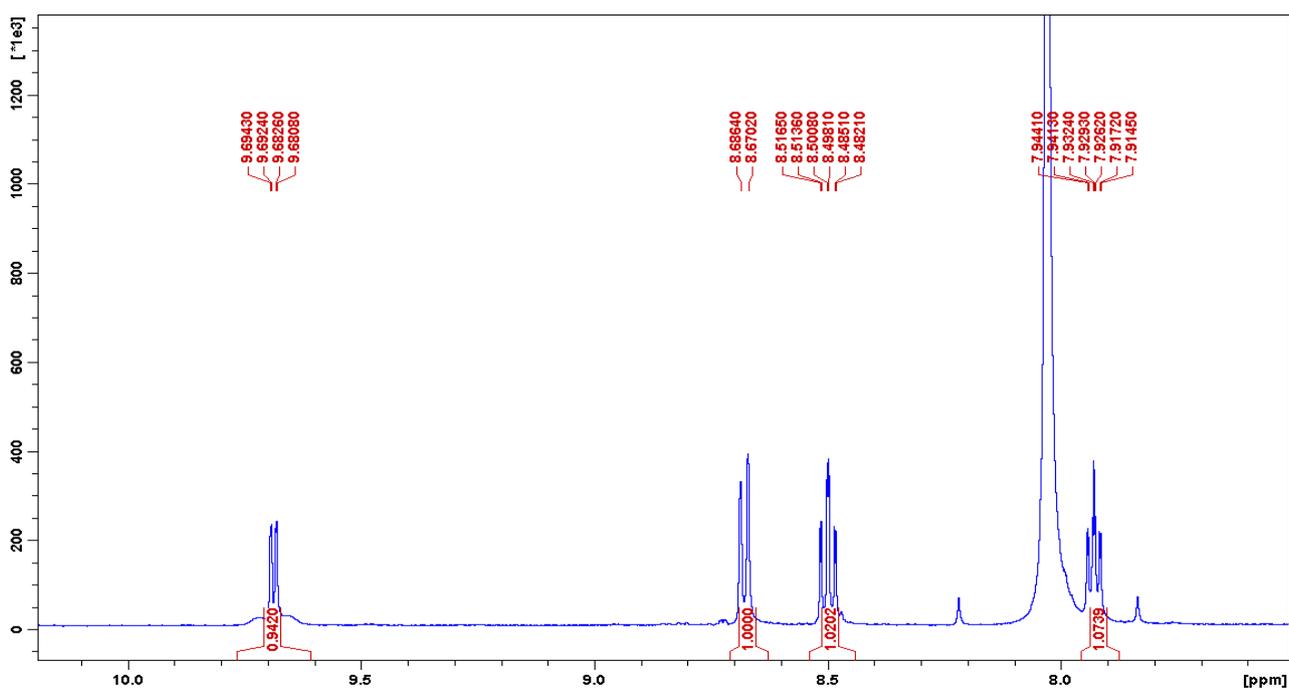


Figura 2.17: Spettro ^1H del complesso **5**

Tabella 2.9: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **5**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
7.93	2	t	6	2
8.50	3	t	8	2
8.68	1	d	8	2
9.69	4	d	6	2

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^1H sono stati confermati registrando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).

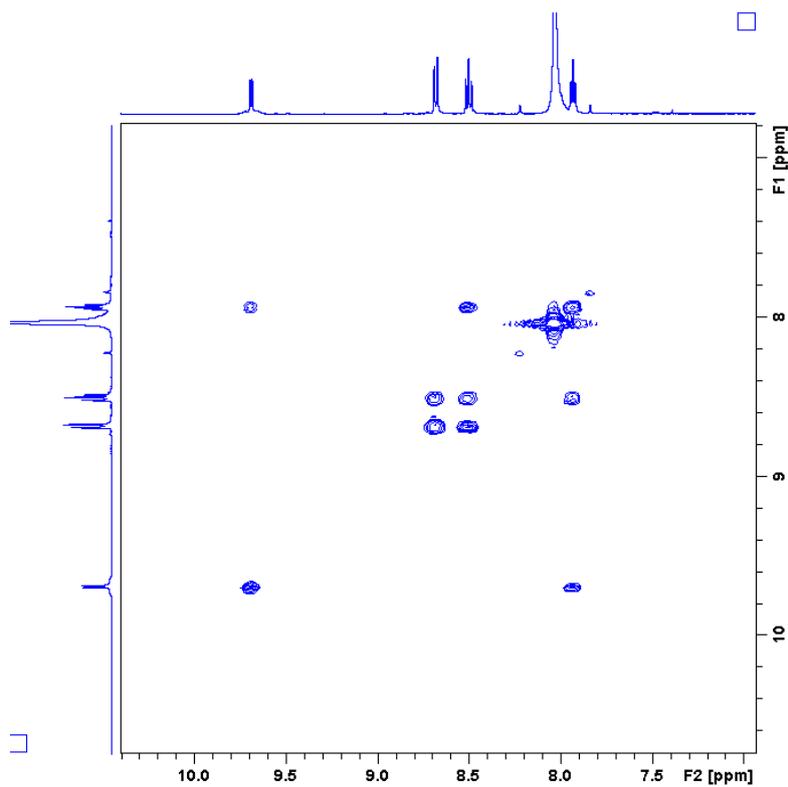


Figura 2.18: Spettro ^1H COSY del complesso 5

- Spettro ^{13}C NMR

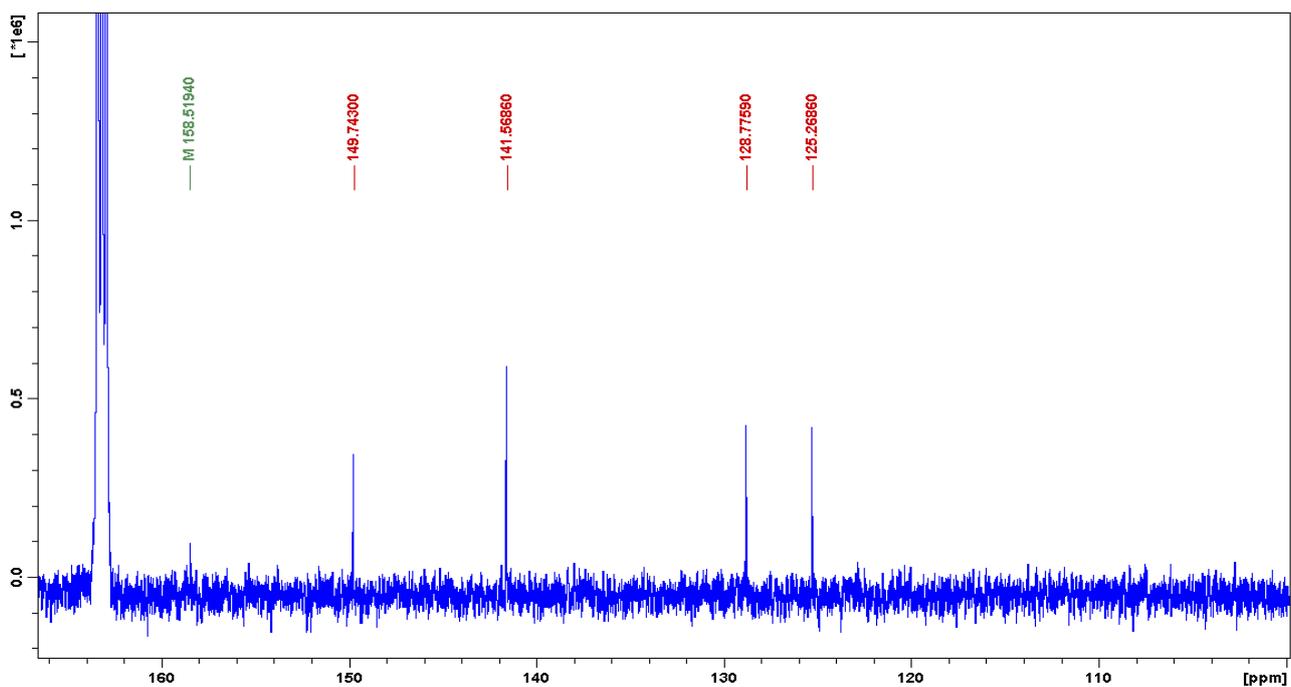


Figura 2.19: Spettro ^{13}C del complesso 5

Tabella 2.10: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 5

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
125.3	2
128.8	4
141.6	3
149.7	1
158.5	5

- Spettro ^{195}Pt NMR

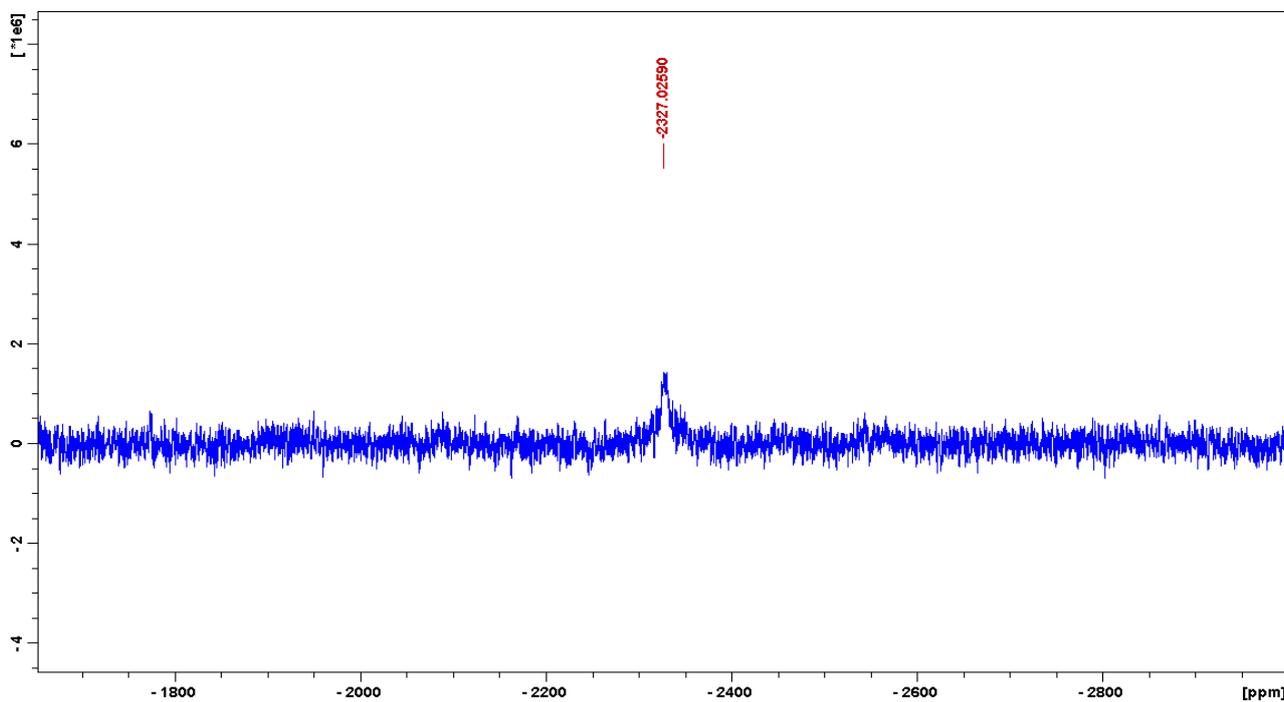


Figura 2.20: Spettro ^{195}Pt del complesso 5

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un picco nella zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{II} con intorno chimico PtN_2Cl_2 , a -2327 ppm.

2.2.3 Sintesi con riscaldamento tradizionale con leganti bidentati

In sostituzione alle sintesi con microonde, le reazioni per i complessi **6-8** sono state effettuate per via tradizionale partendo dal complesso organometallico $[\text{PtCl}_2(\text{COD})]_3$ (**9**) (COD = 1,5-cicloottadiene), per sostituzione dell'anello aromatico con eterocicli (fig. 2.21).

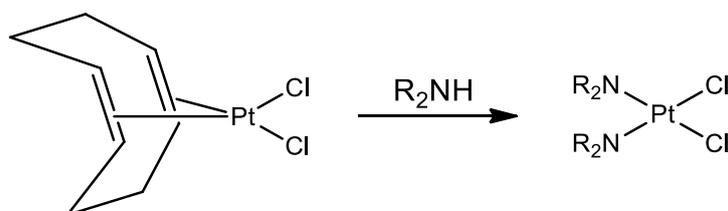


Figura 2.21: Reazione di sostituzione del COD con ammine secondarie

SINTESI DEL COMPLESSO $[\text{PtCl}_2(\text{COD})]$:

La sintesi del complesso **9** prevede la sostituzione di due leganti cloruro del complesso $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ con una molecola di 1,5-cicloottadiene (COD): 1 g di $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ (2.40 mmoli) e 1 ml di COD (8.00 mmol) vengono sciolti in 16 ml di acqua e 24 ml di acido acetico glaciale. La soluzione, mantenuta a 90°C per 30 min, passa ad una colorazione gialla ed il prodotto precipita parzialmente. Il volume viene ridotto a 10 ml ed il precipitato viene separato per centrifugazione. Il solido viene lavato con 20 ml di acqua, 20 ml di etanolo ed etere, a dare un prodotto bianco cristallino.

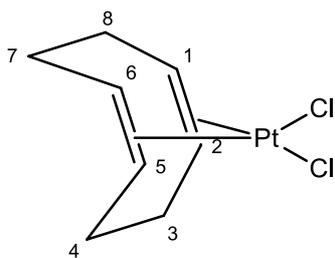
Resa: 0.90 g (95%)

$[\text{Pt}(\text{COD})\text{Cl}_2]$ (9**)**

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR in modo da confermare l'avvenuta reazione ed il grado di purezza del composto.

NMR

Gli spettri del complesso **9** sono stati registrati in CDCl_3 a 300K.



• Spettro ^1H NMR

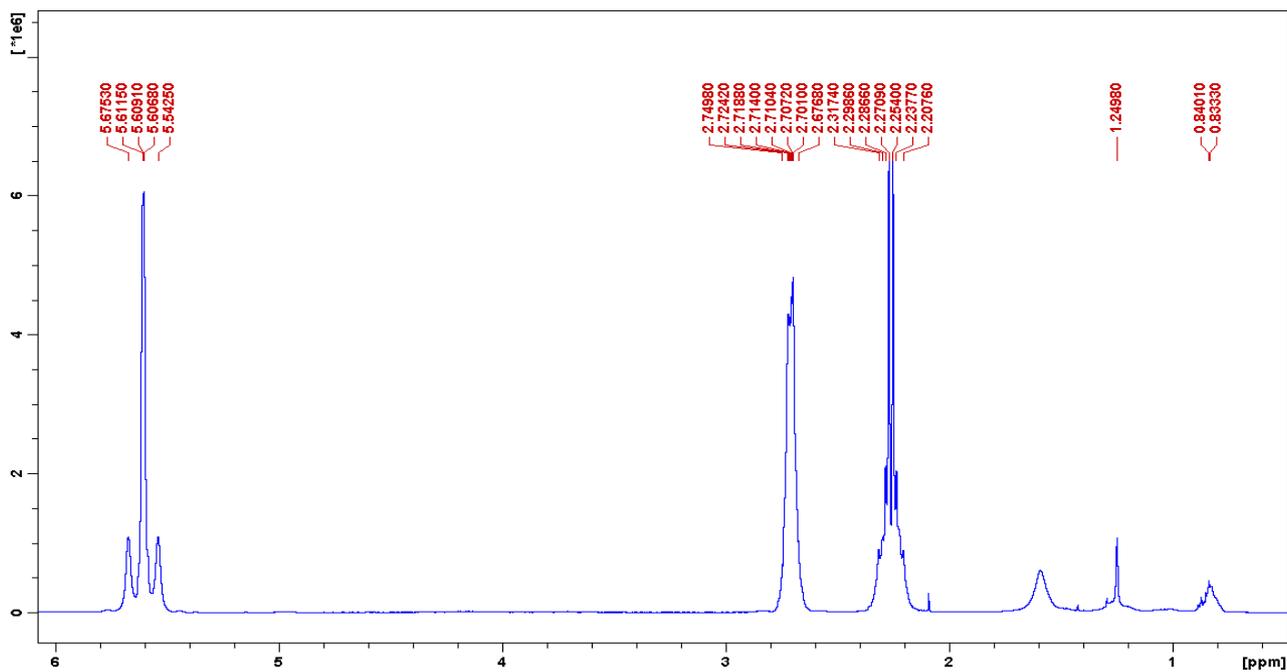


Figura 2.22: Spettro ^1H del complesso **9**

Tabella 2.11: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **9**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	Integrazione
2.27	3-4-7-8	m	4
2.71		m	4
5.61	1-2-5-6	m	4

- Spettro ^{13}C NMR

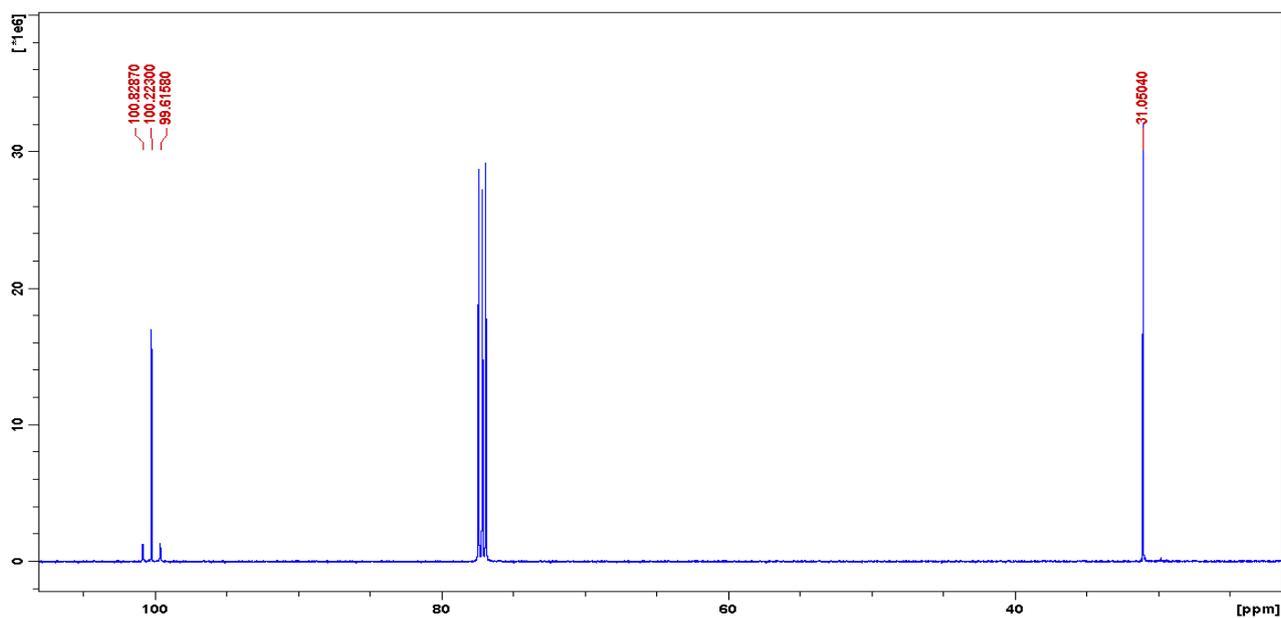


Figura 3.23: Spettro ^{13}C del complesso 9

Tabella 3.12: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 9

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
31.0	3-4-7-8
100.2	1-2-5-6

- Spettro ^{195}Pt NMR

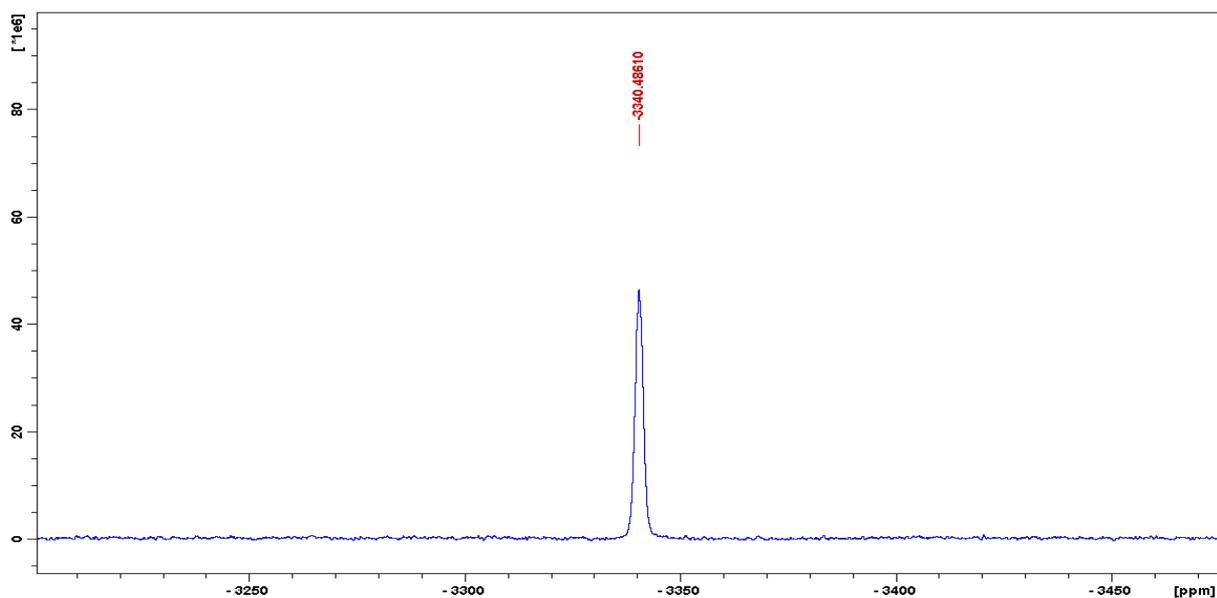


Figura 2.24: Spettro ^{195}Pt del complesso 9

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a -3340 ppm.

SINTESI DEI COMPLESSI 6-8 CON METODO TRADIZIONALE:

Lo *step* successivo prevede la sostituzione del COD con il legante eterociclico in esame: 50 mg di $[\text{PtCl}_2(\text{COD})]$ (0.134 mmol) ed un equivalente di legante (55.4 mg di L_1 , 54.9 mg di L_2 e 51.1 mg di L_3) vengono sospesi in 3 ml di CH_3CN . La reazione viene mantenuta a riflusso per 24h. Il precipitato viene separato per centrifugazione e lavato con acetonitrile a dare un prodotto giallo cristallino.

Resa: 87 mg (96%) per **6**

La sintesi per il complesso **6** ha portato ad elevata resa e purezza mentre per i complessi **7** e **8** la reazione ha portato alla formazione di più specie di platino. La probabile formazione di queste specie può essere attribuita a diversa coordinazione del legante al centro metallico; questa possibilità è offerta dalla presenza nel legante di più atomi potenzialmente coordinanti.

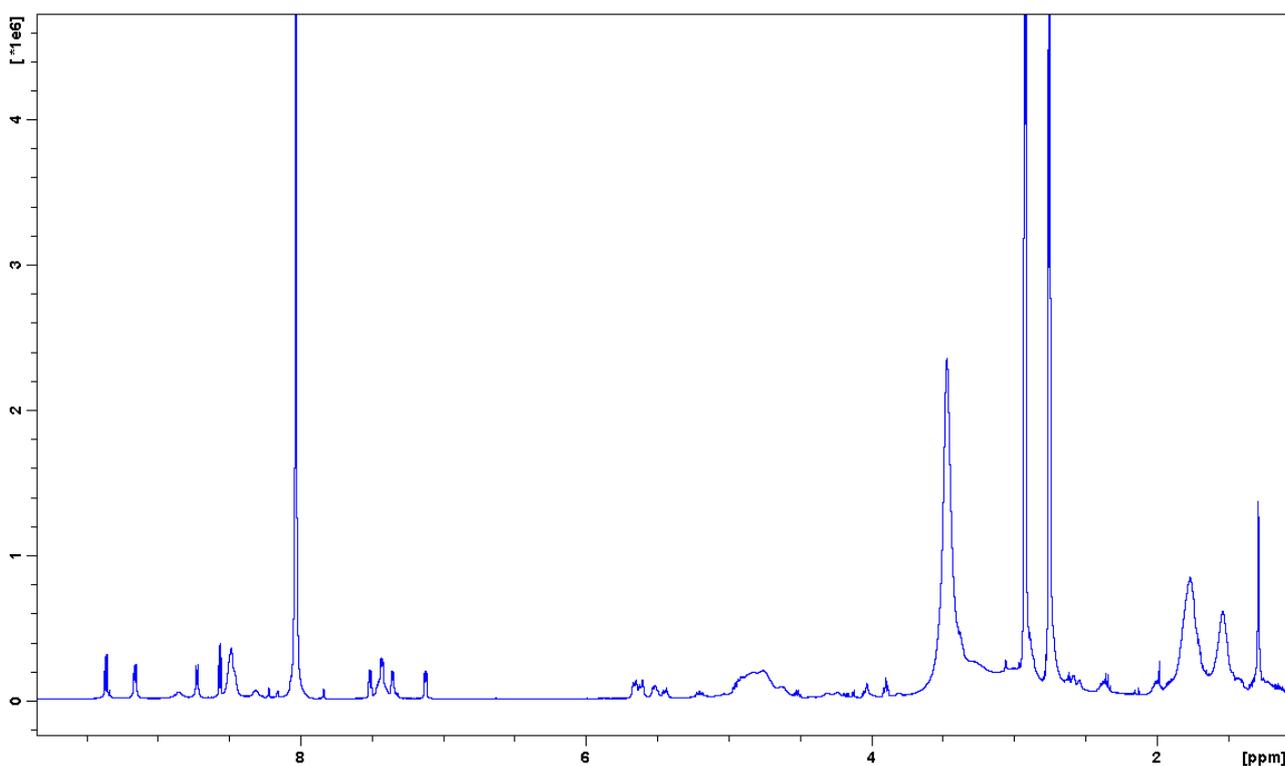


Figura 2.25: Spettro ^{195}Pt del complesso **7**

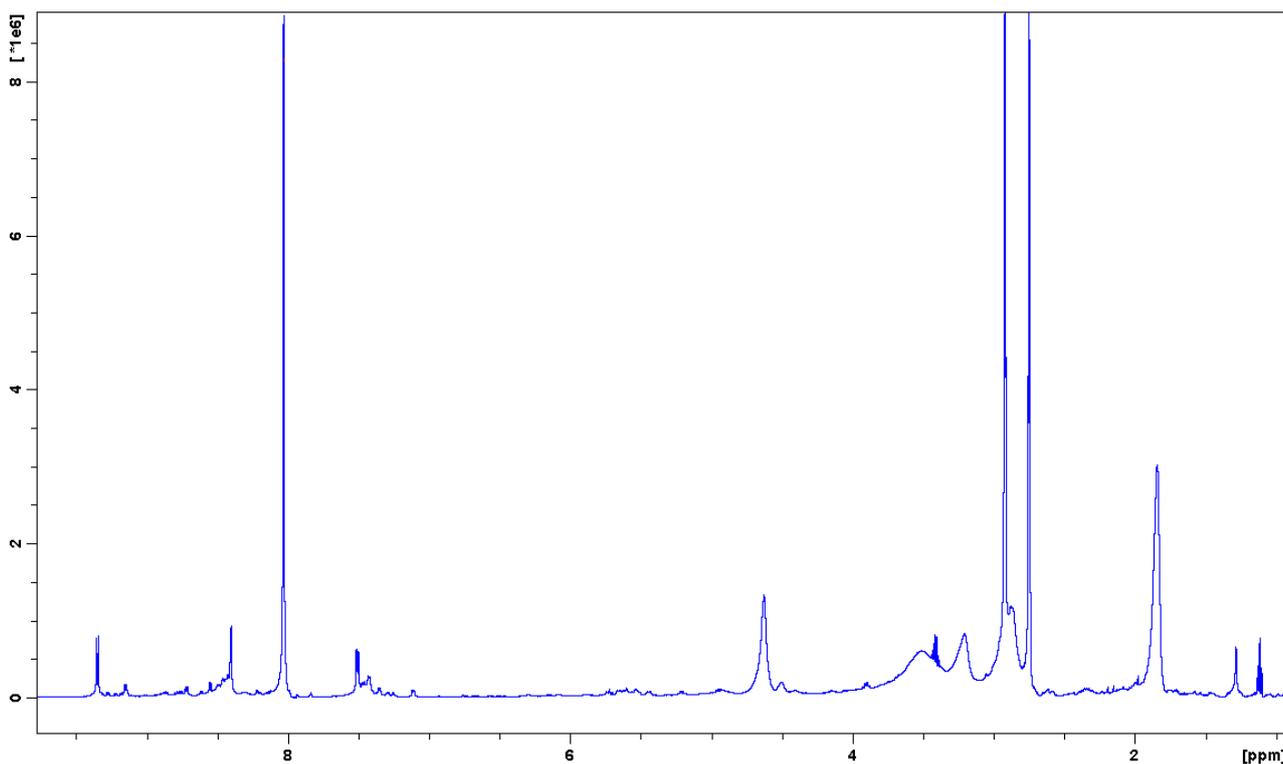


Figura 2.26: Spettro ^{195}Pt del complesso **8**

Infatti, come si può vedere dagli spettri protonici dei complessi **7** (fig. 2.25) e **8** (fig. 2.26) i segnali, nessuno dei quali riconducibili al legante libero, risultano moltiplicati. Questo effetto può essere causato da una differente coordinazione del legante al centro metallico, con la conseguente variazione del *chemical shift* degli atomi strettamente adiacenti. Tuttavia, non è stata possibile una separazione di questi prodotti a causa delle loro proprietà simili, né è stato possibile identificare con certezza la natura dei sottoprodotti.

CARATTERIZZAZIONE DEI COMPLESSI 6-8:

[Pt(Lpor1)Cl₂] (6)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

HPLC-MS

Il complesso essendo poco solubile in MeOH e acqua è stato precedentemente sospeso in DMSO per 30 min, in modo da favorire la dissoluzione. La soluzione è stato diluita con acqua ed analizzata utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e dal 50% di MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma ha mostrato un unico picco a 3.6 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa (fig. 2.27).

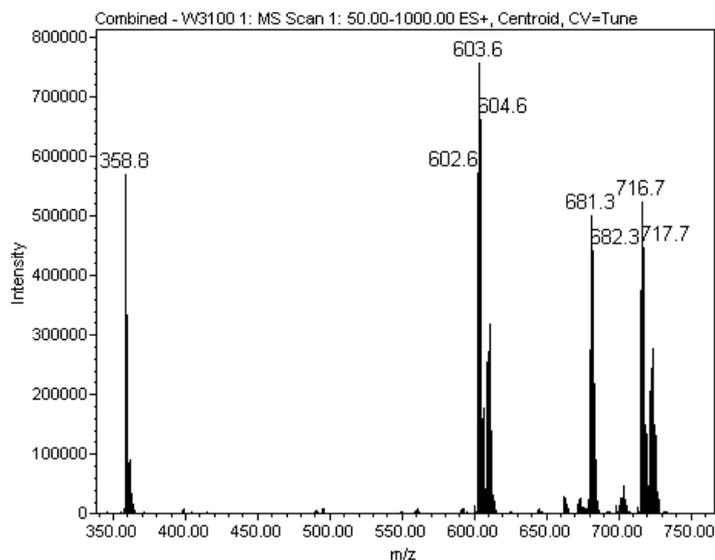
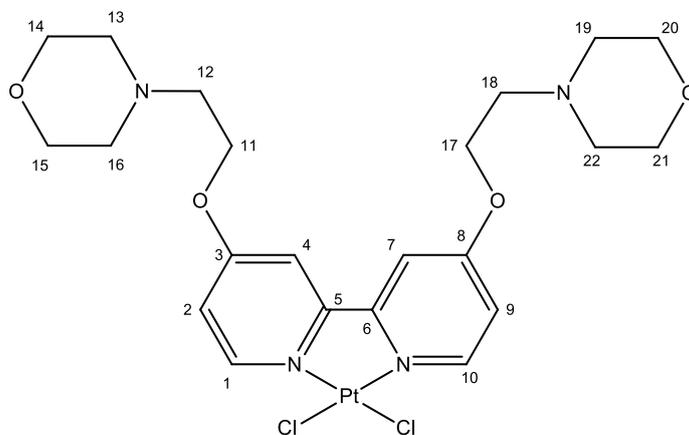


Figura 2.27: Spettro di massa del complesso **6**

Dallo spettro ESI-MS è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[M+H]^+$ con valore di $m/z = 681.3$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt.

NMR

Gli spettri del complesso **6** sono stati registrati in d_6 -DMF a 300K.



- Spettro ^1H NMR

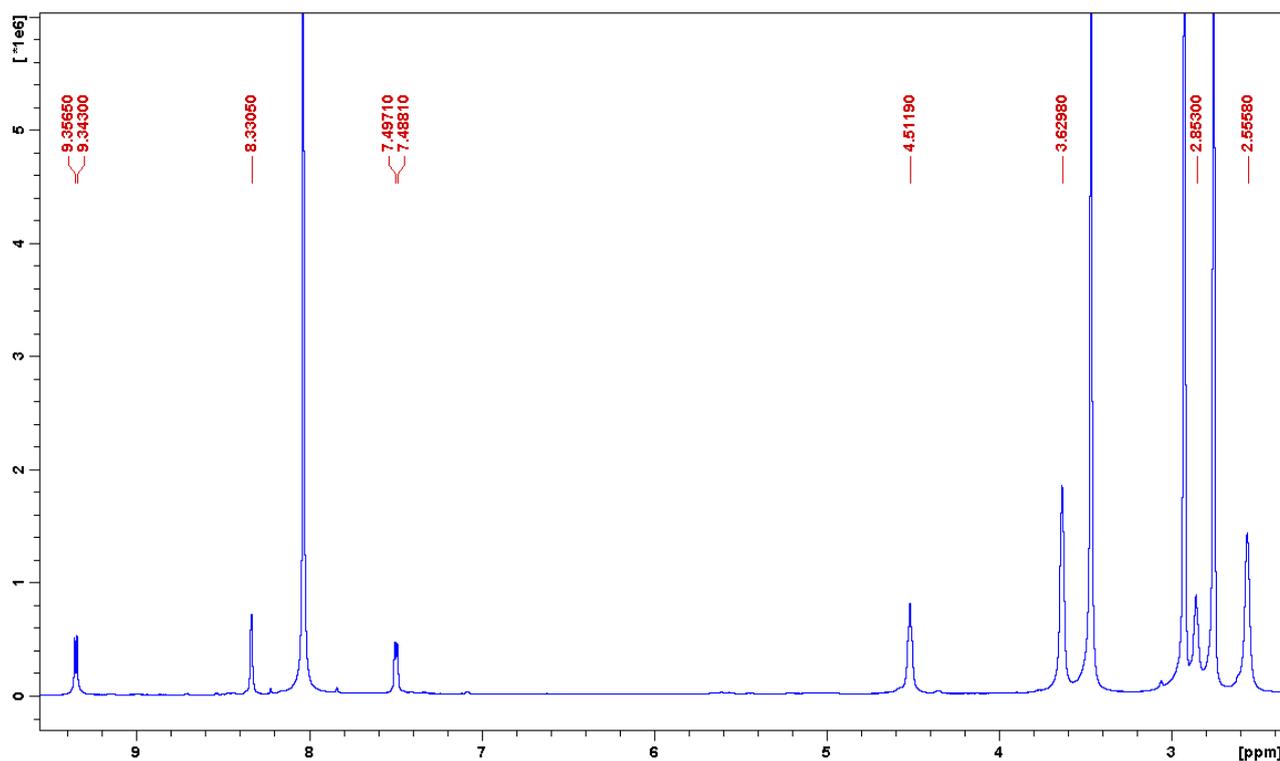


Figura 2.28: Spettro ^1H del complesso **6**

Tabella 2.13: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **6**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
2.56	13-16-19-22	m		8
2.85	12-18	m		4
3.63	14-15-20-21	m		8
4.51	11-17	m		4
7.49	2-9	d	4.5	2
8.33	4-7	s		2
9.35	1-10	d	6.7	2

- Spettro ^{13}C NMR

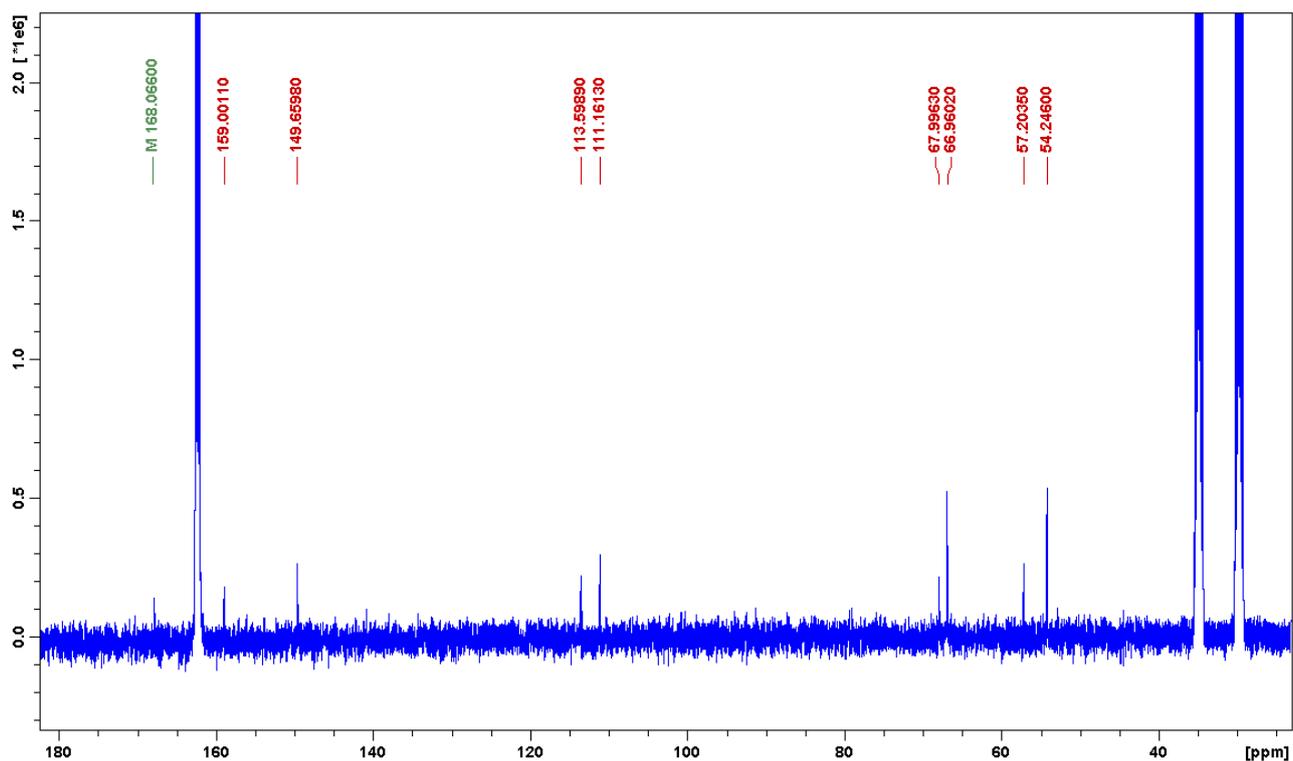


Figura 2.29: Spettro ^{13}C del complesso 6

Tabella 2.14: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 6

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>
54.2	13-16-19-22
57.2	12-18
67.0	14-15-20-21
68.0	11-17
111.1	2-9
113.6	4-7
149.7	1-10
159.0	5-6
168.0	3-8

- Spettro ^{195}Pt NMR

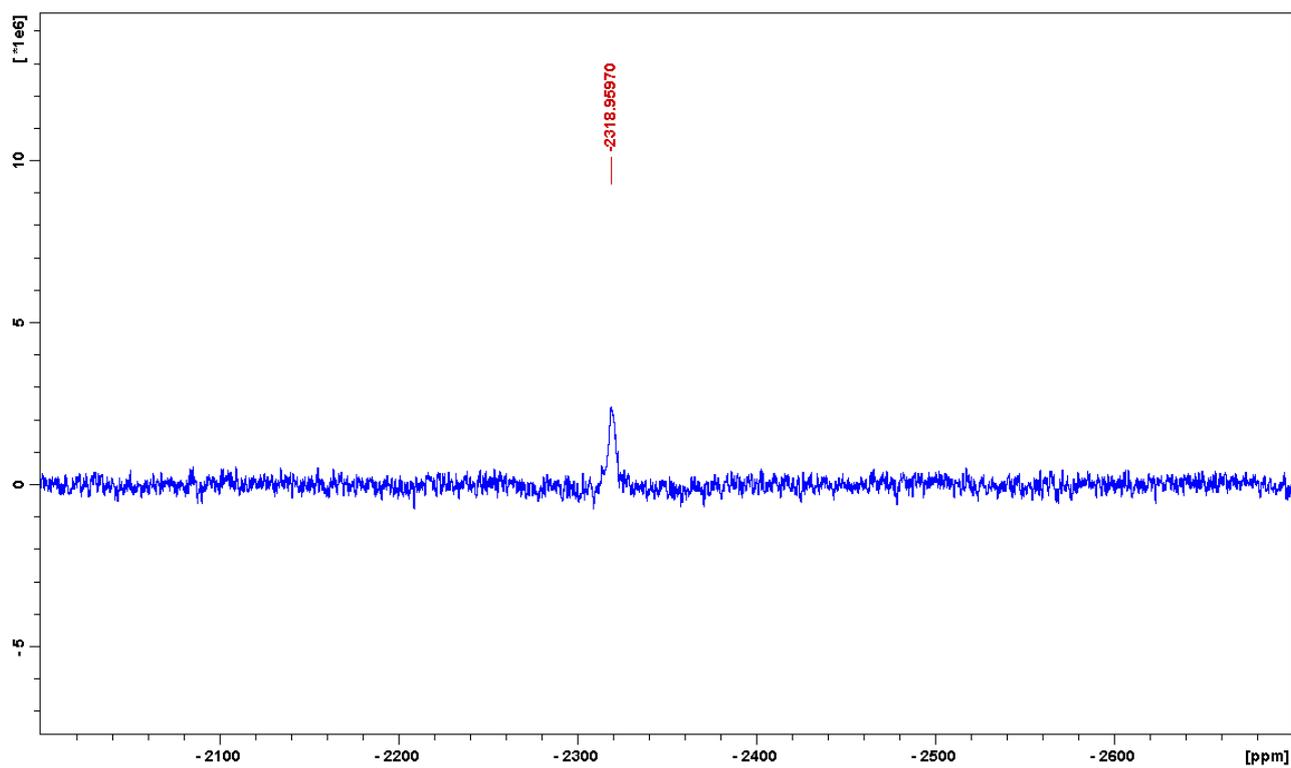


Figura 2.30: Spettro ^{195}Pt del complesso **6**

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a -2319 ppm, che cade nella zona di *chemical shift* caratteristica per i complessi di Pt^{II} con intorno chimico PtN_2Cl_2 .

2.3 Conclusioni

La sintesi mediante l'utilizzo delle microonde ha portato ad ottime rese e purezze per i composti **1**, **2**, **3**, **5** e **7**.

Nel caso del complesso **4**, invece, il gruppo metilico legato all'anello in posizione 2 non permette la coordinazione di un ulteriore legante in posizione vicinale, a causa dell'ingombro sterico.

Per i complessi **6-8** l'utilizzo delle microonde, nelle condizioni impiegate per i leganti monodentati, ha portato alla degradazione dei reagenti utilizzati.

Tuttavia, con un metodo di sintesi tradizionale è stato possibile sintetizzare e caratterizzare il complesso **6**, partendo dal complesso $[\text{PtCl}_2(\text{COD})]$ per sostituzione della molecola di COD con il legante in esame. Tuttavia, la procedura non ha portato alla sintesi dei complessi **7** e **8** con buona resa e purezza a causa della formazione di sottoprodotti non separabili.

L'impiego delle microonde può essere applicato alla sintesi di alcuni tipi di complessi con ottime purezze e rese, in tempi ridotti e possono essere applicate a diverse tipologie di leganti a ridotto ingombro sterico, sia monodentati che bidentati⁴.

2.4 Bibliografia

1. E.D. Neas, M.J. Collins, *Introduction to microwave sample theory and practice*, American Chemical Society, 1988, 2, 7-32
2. S. Gama, I. Rodrigues, F. Marques, E. Palma, *New ternary bipyridine–terpyridine copper(II) complexes as self-activating chemical nucleases*, RSC Adv. 4 (2014) 61363.
3. J.X. McDermott, J.F. White, G.M. Whitesides, *Thermal decomposition of bis(phosphine) platinum(II) metallocycles*, J. Am. Chem. Soc., 1976, 98 (21), pp 6521–6528
4. E. Gabano, S. Gama, F. Mendes, F. Fregonese, A. Paulo, M. Ravera, *Application of microwave-assisted heating to the synthesis of Pt(II) complexes*, Inorganica Chimica Acta, 437, pp 16–19

3. Pt^{IV} asimmetrici $[Pt(NH_3)_2Cl_2(OH)(Y)]$

La seconda parte del lavoro di tesi si è incentrata sulla sintesi di nuovi complessi di Pt^{IV} asimmetrici a base di cisplatino, di formula generale $[Pt(NH_3)_2Cl_2(X)(Y)]$, dove X e Y sono leganti assiali (fig. 3.1) scelti in modo da variare le caratteristiche chimico-fisiche del complesso quali lipofilicità, potenziale di riduzione, inerzia cinetica, ecc.

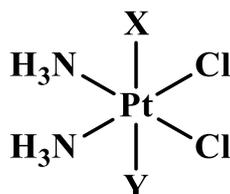


Figura 3.1: Struttura generale dei complessi di Pt^{IV}

La sintesi dei complessi asimmetrici $[Pt(NH_3)_2Cl_2(X)(Y)]$ avviene in più *steps* consecutivi. La sintesi prevede inizialmente l'ossidazione del cisplatino con conseguente formazione di un intermedio contenente un legante Y (generalmente proveniente dal solvente) ed un gruppo idrossido in posizione assiale, $[Pt(NH_3)_2Cl_2(OH)(Y)]$, in grado di essere sostituito nello *step* successivo (fig 3.2).

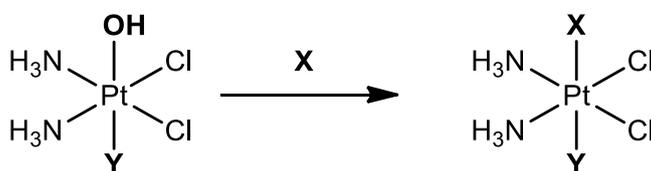


Figura 3.2: Reazione di sostituzione del legante assiale

L'ossidazione di un complesso di Pt^{II} a Pt^{IV} (ad es. con H_2O_2) porta alla coordinazione di due leganti in posizione assiale, passando da una geometria planare quadrata ad una ottaedrica (i leganti originali del complesso di Pt^{II} mantengono una posizione equatoriale).

Nel caso in cui la reazione venga effettuata in un solvente coordinante (acqua, alcoli, acidi carbossilici) il complesso finale presenterà un gruppo OH derivante dall'ossidante, mentre il secondo legante assiale sarà derivante dal solvente in cui viene effettuata la reazione (fig 3.3).

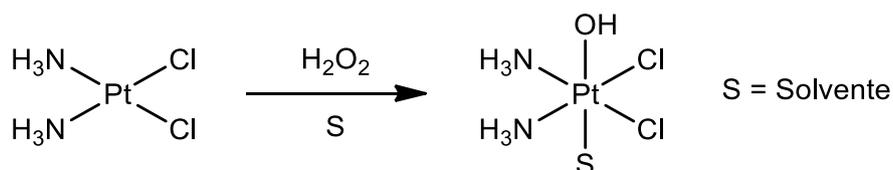


Figura 3.3: Reazione generale di ossidazione dei complessi di Pt^{II} a Pt^{IV}

Un metodo alternativo per la formazione di complessi di formula $[Pt(NH_3)_2Cl_2(OH)(Y)]$ si basa sulla sostituzione selettiva di un legante assiale (OH) sul complesso simmetrico $[Pt(NH_3)_2Cl_2(OH)_2]$. La sostituzione di un gruppo OH con un carbossilato può essere effettuata mediante l'utilizzo dei rispetti acidi attivati (ad es. con DCC), anidridi o cloruri acilici (fig 3.4).

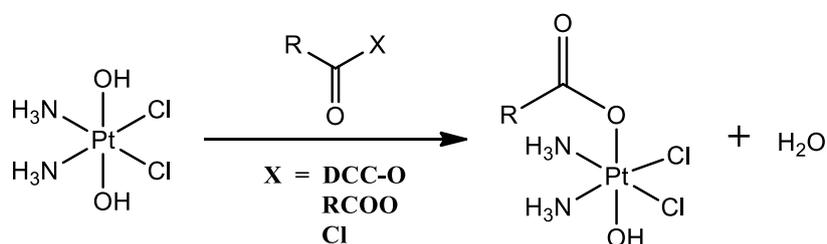


Figura 3.4: Reazione di sostituzione del legante assiale

La sostituzione non è totalmente selettiva e può portare alla formazione di più specie quali, mono- e di-carbossilati o portare a sostituzioni dei leganti equatoriali. Per evitare la formazione della specie disostituita, la reazione può essere svolta utilizzando una quantità stechiometrica di anidride in modo da spingere la reazione verso la formazione della specie monosostituita.

In questo lavoro sono stati preparati vari tipi di complessi di Pt^{IV} di formula $[Pt(NH_3)_2Cl_2(OH)(Y)]$, che potessero essere il punto di partenza per un'ulteriore funzionalizzazione. Le varie tipologie di complessi usati e le diverse condizioni di reazione sono riassunti nella figura 3.5.

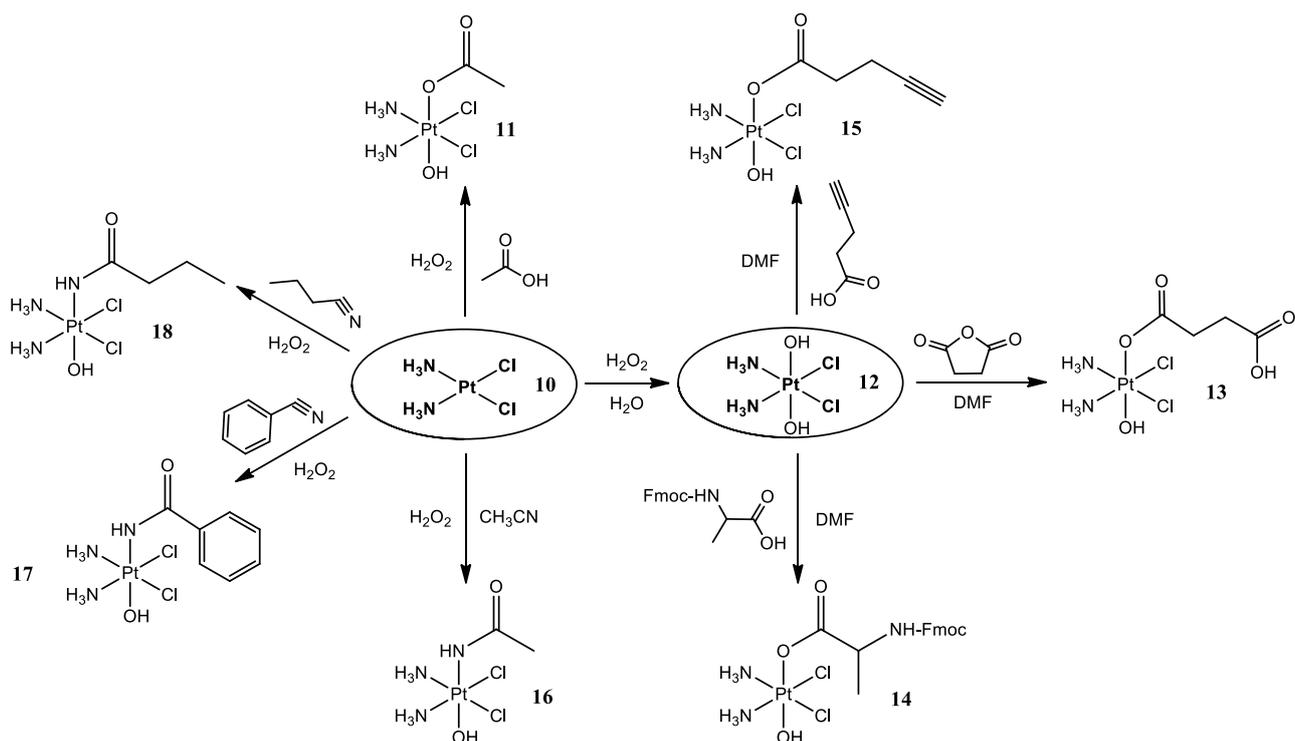
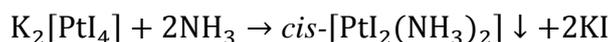
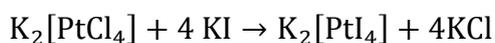


Figura 3.5: Schema di sintesi dei complessi 11-18

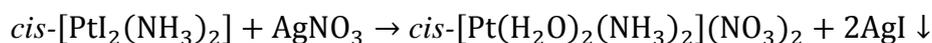
3.1 Sintesi del cisplatino

La sintesi dei complessi di Pt^{IV}, oggetto di questo studio, si basa sull'ossidazione del rispettivo composto di Pt^{II}: nel caso specifico cisplatino. Per sintetizzare il cisplatino in questo lavoro viene seguito il metodo descritto nel 1970 da Dhara¹, basato sulla reazione di K₂[PtCl₄] con KI e ammoniaca. Il primo *step* di reazione prevede la formazione dell'intermedio *cis*-[Pt(X)₂I₂], dove X può essere una molecola di ammina o (X)₂ può essere una diammina chelante.



Il primo passaggio della sintesi prevede la formazione di K₂[PtI₄] a partire da K₂[PtCl₄] e KI. La reazione è favorita dalla maggiore affinità del centro metallico Pt^{II} verso lo ione I rispetto a Cl⁻. Il secondo passaggio prevede la sostituzione degli ioni ioduro con il legante amminico grazie alla maggior affinità verso gli atomi donatori dell'ammina (azoto) rispetto agli ioni ioduro. L'effetto *trans*-orientante dello ioduro coordinato assicura la configurazione *cis* al complesso.

L'intermedio *cis*-[Pt(NH₃)₂I₂] in soluzione acquosa in presenza di AgNO₃ (o Ag₂SO₄) porta alla formazione del diacquacomplesso, *cis*-[Pt(X)₂(H₂O)₂]²⁻. Questa reazione prevede la precipitazione di AgI, altamente insolubile in acqua (K_{ps} = 8.3x10⁻¹⁷ M²), che sposta l'equilibrio a favore della formazione del prodotto.



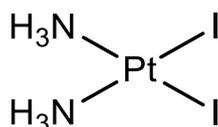
In presenza di KCl, il diacquacomplesso porta alla formazione del complesso finale *cis*-[Pt(X)₂Cl₂], attraverso la sostituzione delle molecole di acqua con gli ioni cloruro, mantenendo la configurazione *cis*.



cis-[Pt(NH₃)(Cl)₂] (10)

Come accennato nel paragrafo precedente, per la sintesi del complesso [Pt(NH₃)₂Cl₂] (10, cisplatino) si è fatto riferimento al metodo di Dhara come descritto di seguito.

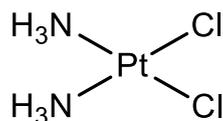
- Sintesi dell'intermedio *cis*-[Pt(NH₃)₂I₂]:



Ad una soluzione di K₂[PtCl₄] (0.5 gr, 1.20 mmoli) in 6 ml di acqua viene aggiunto un eccesso di KI (1.2 gr, 7.20 mmoli) e si lascia reagire la miscela al buio sotto agitazione per 40 min a temperatura ambiente. Sia K₂[PtCl₄] che K₂[PtI₄] sono solubili in acqua: il primo impartisce alla soluzione iniziale un colore rosso brillante, che viene sostituito da un colore marrone scuro dovuto al secondo complesso. Alla miscela viene poi aggiunta goccia a goccia una soluzione di ammoniaca 30% (0,251 µl), e la reazione viene condotta al buio sotto agitazione per 30 minuti durante i quali avviene la precipitazione di un composto giallo scuro. La soluzione viene rimossa per centrifugazione ed il precipitato raccolto e lavato con acqua fredda (2x5 ml), metanolo (2x5ml) ed etere (2x5ml).

Resa: 90-95%

- Sintesi del complesso *cis*-[Pt(NH₃)Cl₂]:



Una soluzione acquosa (6 ml) contenente *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] (0.45 gr, 0.93 mmol) viene scaldata a 50°C e a questa viene aggiunto AgNO₃ (0.31 gr, 1.9 mmoli) e lasciata sotto agitazione al buio per 24 h. La miscela viene filtrata per rimuovere i residui dei reagenti, quindi al filtrato, contenente il prodotto *cis*-[Pt(NH₃)(H₂O)₂]²⁺, solubile in acqua, viene aggiunto un eccesso di KCl (1.5 gr, 1.9 mmoli). La reazione viene condotta al buio a T ambiente sotto agitazione per 24 h. Il risultante precipitato giallo viene isolato per centrifugazione e lavato con acqua fredda (2x5 ml), metanolo (2x5ml) ed etere (2x5ml).

Resa: 80-85%

RP-HPLC-MS

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica ESI-MS e RP-HPLC per confermare la purezza del composto.

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e dal 30% di MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 5.3 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa (fig 3.6).

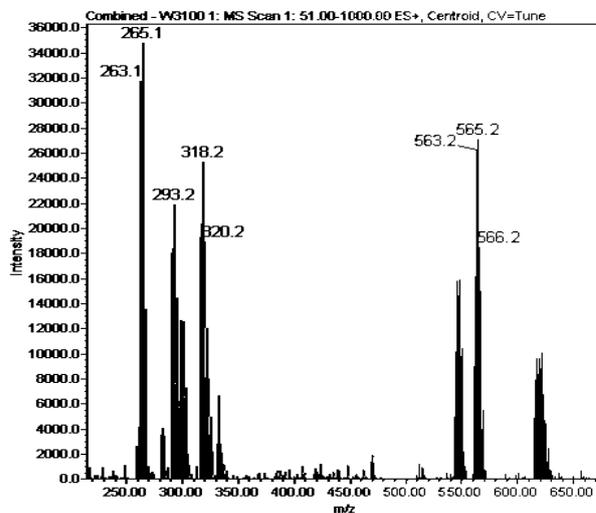


Figura 3.6: Spettro di massa del complesso 10

3.2 Sintesi dei complessi di Pt^{IV}

A partire dal complesso di Pt^{II} si è tentato, attraverso la variazione delle condizioni di reazione, di sintetizzare i diversi complessi di Pt^{IV} asimmetrici con un solo legante assiale disponibile per una successiva funzionalizzazione (un gruppo ossidrilico).

Queste reazioni possono essere suddivise in tre categorie a seconda delle condizioni impiegate:

- Ossidazione in solvente coordinante: coordinazione del solvente come secondo legante assiale.
- Sostituzione “stechiometrica” di un legante assiale nel complesso *cis-cis-trans*-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂] (**12**).
- Nuova tipologia di complessi con legante assiale N-donatore.

3.2.1 Ossidazione in solvente coordinante

La **prima tipologia** di reazione sfrutta l'ossidazione del Pt^{II} con H₂O₂ in un solvente coordinante: l'acido acetico (fig. 3.7). Nel prodotto ottenuto si risconterà un legante assiale OH proveniente dall'ossidante, mentre il solvente coordinante andrà a legarsi nel sito coordinativo vacante, cioè in posizione *trans* rispetto al primo.

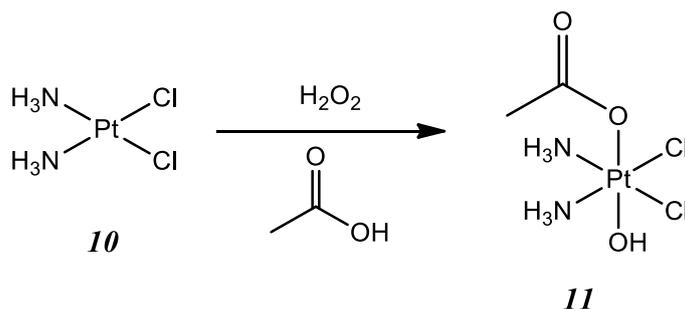


Figura 3.7: Reazione di ossidazione in acido acetico

[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)(acetato)] (11)

Procedura: Ad una sospensione di cisplatino (**10**, 100 mg, 0.33 mmol) in 40 ml di acido acetico glaciale si aggiunge goccia a goccia 1 ml di H₂O₂ al 35% w/w. La miscela viene fatta reagire per 3h al buio sotto agitazione a temperatura ambiente. L'avvenuta reazione viene confermata dalla dissoluzione del completa del cisplatino. Il solvente viene rimosso mediante evaporatore rotante, il precipitato triturato con etere etilico e lavato più volte (3x20ml) fino ad ottenere un solido cristallino giallo.

Resa: 119 mg (96%)

RP-HPLC-MS

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC per confermare l'avvenuta reazione e la purezza del composto.

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e dal 30% di metanolo e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 5.3 minuti relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa (fig. 3.8).

Dallo spettro ESI-MS è possibile osservare il picco relativo allo ione [M-OH]⁺ con valore di m/z = 359.0, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. È inoltre presente il picco pseudo molecolare [M+H]⁺ a m/z = 376.2.

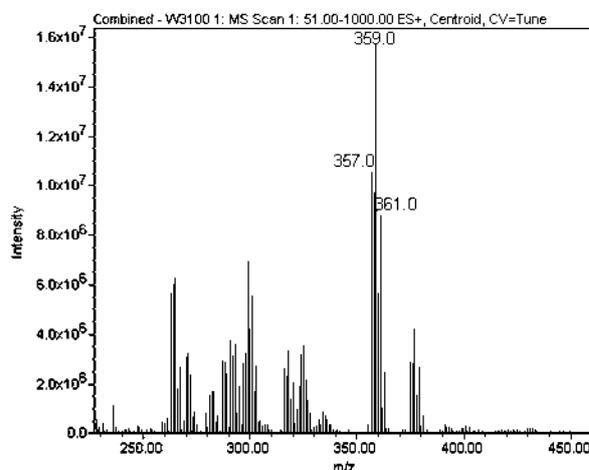
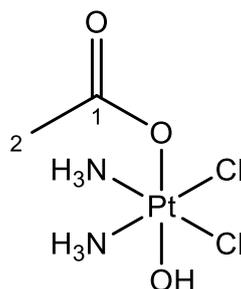


Figura 3.8: Spettro di massa del complesso 11

NMR

Gli spettri del complesso **11** sono stati registrati in d₆-DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

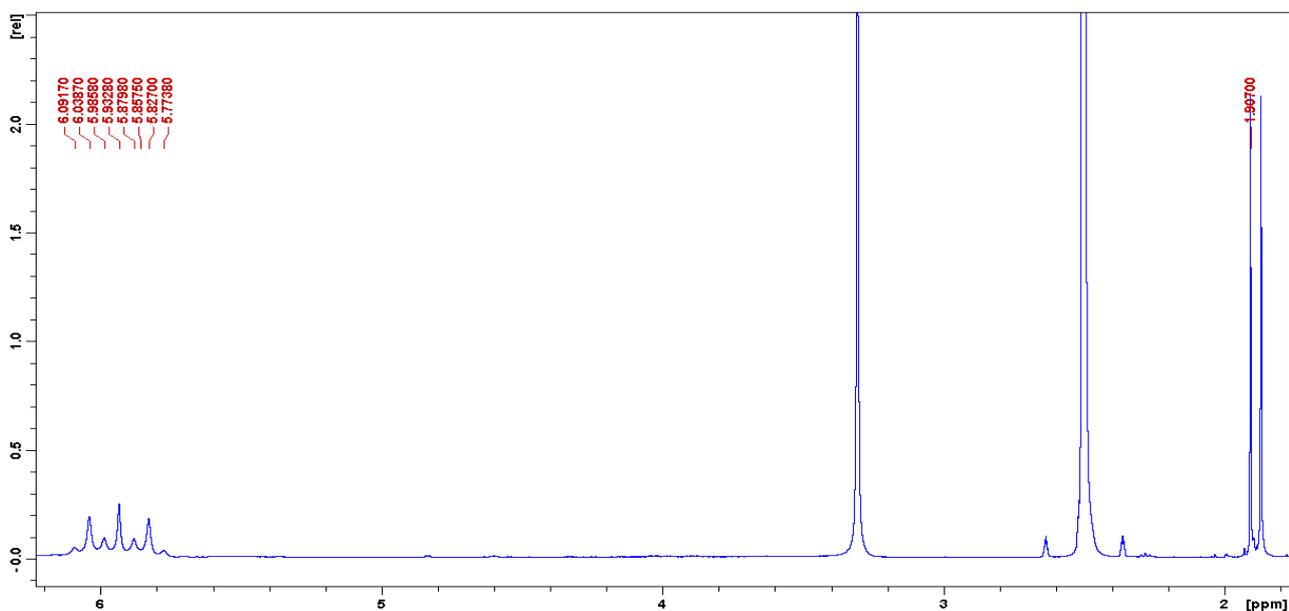


Figura 3.9: Spettro ^1H del complesso **11**

Lo spettro presenta tracce di acido acetico residuo (1.87 ppm).

Tabella 3.1: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **11**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
1.91	2	s		3
5.93	NH_3	m		6

- Spettro ^{13}C NMR

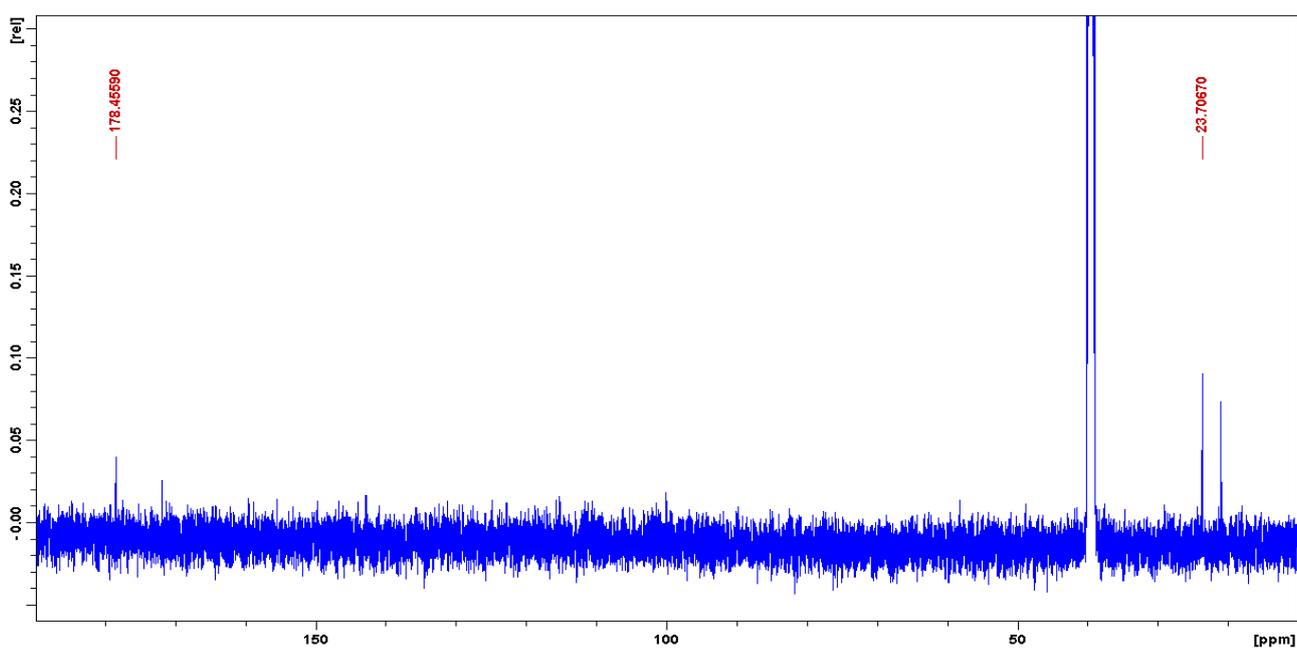


Figura 3.10: Spettro ^{13}C del complesso **11**

Lo spettro presenta tracce di acido acetico residuo (171.9 e 20.9 ppm).

Tabella 3.2: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **II**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
23.7	2
178.5	1

- Spettro ^{195}Pt NMR

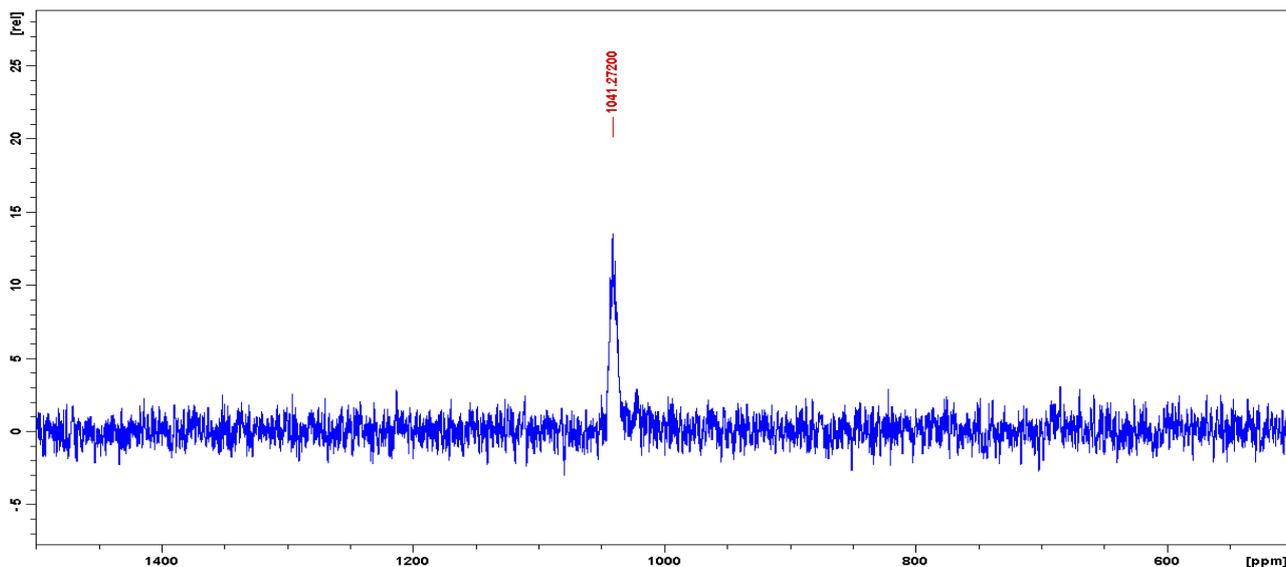


Figura 3.11: Spettro ^{195}Pt del complesso **II**

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 1041 ppm, che cade nella zona di *chemical shift* caratteristica per i complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

3.2.2 Sostituzione “stechiometrica” su $[Pt(NH_3)_2Cl_2(OH)_2]$

La seconda tipologia si basa sulla sostituzione di un legante OH sul complesso **12** $[Pt(NH_3)_2Cl_2(OH)_2]$, formato per ossidazione del cisplatino con H_2O_2 in acqua, con il legante di interesse mediante l'utilizzo della rispettiva anidride, acido attivato o cloruro acilico (fig 3.12).

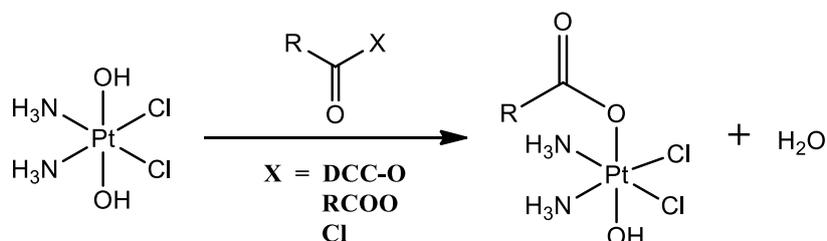


Figura 3.12: Reazione di sostituzione “stechiometrica”

Per questa tipologia di complessi sono stati scelti leganti bifunzionali, in modo da sfruttare una funzionalità per la coordinazione al platino e l'altra per poter legare altre molecole utili, ad esempio, per strategie di *drug targeting and delivery* quali macromolecole o molecole ad attività biologica, contenenti gruppi funzionali complementari.

Tre differenti leganti sono stati scelti per questo scopo: acido succinico, β -alanina e acido pentinoico (fig. 3.13).

- Il primo legante, *acido succinico*, sfrutta la coordinazione al centro metallico mediante un gruppo carbossilato, mentre il secondo gruppo carbossilico può essere sfruttato per una successiva reazione di accoppiamento, con gruppi amminici o alcoli. La sostituzione viene effettuata in solvente non competitivo (DMF) in presenza di anidride succinica in quantità stechiometrica rispetto al complesso di Pt^{IV} .
- Il secondo legante, β -alanina, sfrutta la coordinazione del gruppo carbossilato al centro metallico, mentre il gruppo amminico può essere sfruttato in reazioni di accoppiamento con gruppi carbossilici o alcoli. La reazione prevede la sostituzione di un legante OH del complesso **12** con la β -alanina in solvente non coordinante (DMF), mediante l'utilizzo, in rapporto stechiometrico 1:1, dell'amminoacido attivato sul gruppo carbossilico con DCC e protetto sul gruppo amminico (Fmoc), in modo da evitare la formazione di catene amminoacidiche.
- Il terzo legante, *acido 4-pentinoico*, sfrutta la coordinazione del gruppo carbossilato al platino, mentre il triplo legame può essere sfruttato per la successiva reazione con azidi (*click chemistry*)². Come per la β -alanina la reazione prevede la sostituzione di un gruppo OH del complesso **12** con il legante in esame, sotto forma di acido attivato con DCC.

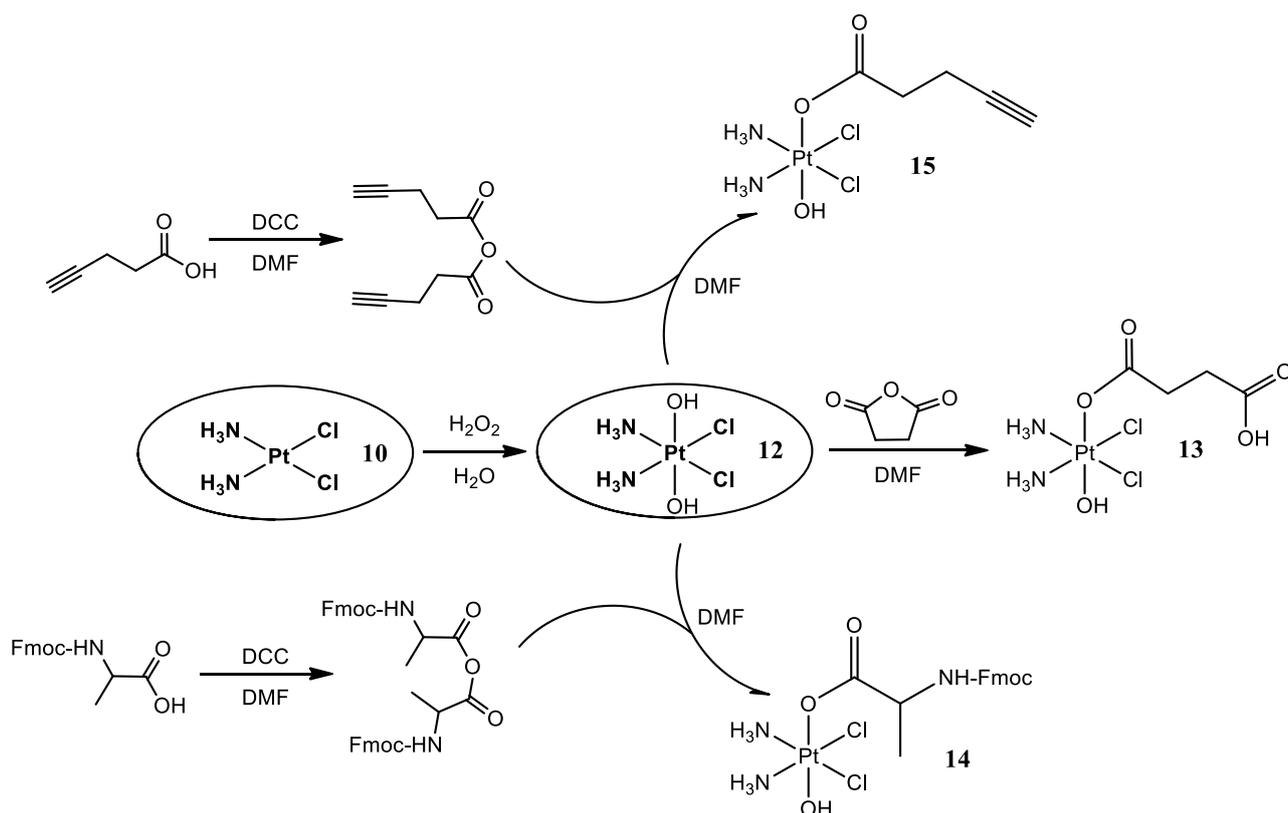


Figura 3.13: Sintesi dei complessi 13-15

[Pt(NH₃)₂(Cl)₂(OH)₂] (12)

La sintesi del complesso [Pt(NH₃)₂(Cl)₂(OH)₂] si incentra sull'ossidazione del rispettivo complesso di Pt^{II} (cisplatino) con acqua ossigenata in soluzione acquosa, mediante l'utilizzo di microonde in modo da ridurre drasticamente i tempi di reazione.

Procedura: In un vial per microonde da 10 ml vengono sospesi 83.3 mg di cisplatino (10) in 4 ml di H₂O e 0.6 ml di H₂O₂ al 35% w/w. La reazione viene condotta per 20 minuti a 70°C. La soluzione limpida viene raffreddata e l'eventuale precipitato (cisplatino non reagito) viene rimosso mediante filtrazione ed il solvente rimosso mediante evaporatore rotante. Il precipitato viene lavato con etanolo ed etere dietilico (2x5ml) ed asciugato sotto flusso d'azoto per dare un solido cristallino giallo.

Resa: 88 mg (95%)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica ¹⁹⁵Pt-NMR, ESI-MS e RP-HPLC per confermare l'avvenuta reazione e la purezza del composto.

RP-HPLC-MS

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e dal 30% di MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 4.2 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa (fig. 3.14), da cui è possibile osservare un picco principale relativo allo ione pseudo molecolare $[M-2OH-H^+]^+$ con valore di $m/z = 299.2$ e *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. Sono inoltre presenti i picchi relativi alle specie $[M-OH]^+$ e $[M+H]^+$ rispettivamente a m/z 317.3 e 335.2.

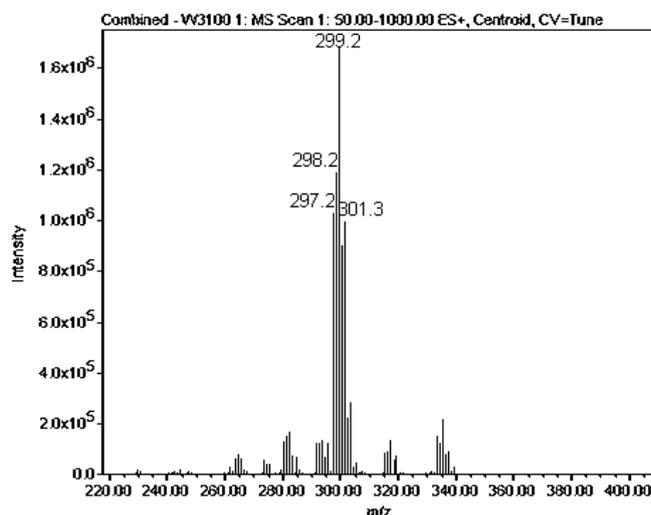


Figura 3.14: Spettro di massa del complesso 12

NMR

Per confermare la presenza del prodotto è stato registrato lo spettro ^{195}Pt -NMR in D_2O in è presente un unico picco a 831 ppm, valore caratteristico del complesso in esame.

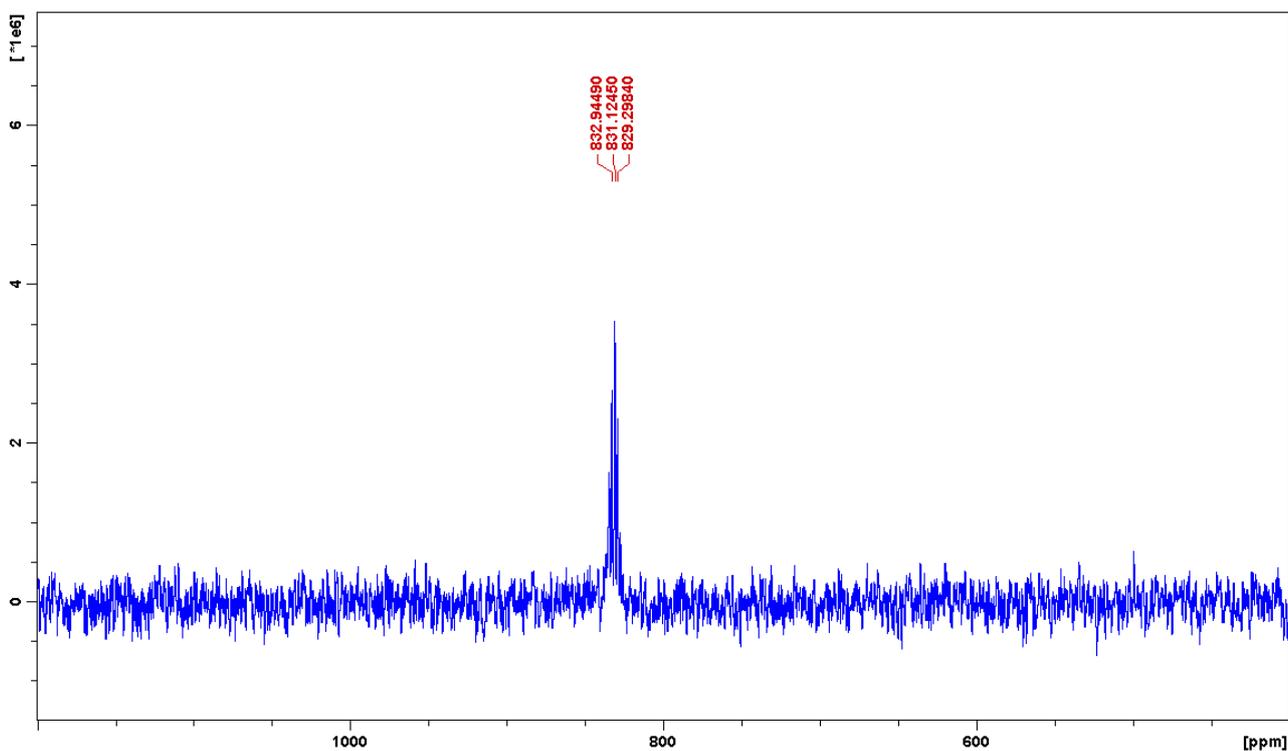


Figura 3.15: Spettro ^{195}Pt del complesso 12

A partire dal complesso **12**, per reazione con la rispettiva anidride, si è cercato di ottenere i complessi asimmetrici $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{Cl})_2(\text{OH})(\text{Y})]$.

Per la reazione con β -alanina ed acido pentinoico è stato necessario preformare l'anidride dall'acido carbossilico.

SINTESI DELL'ANIDRIDE:

La sintesi della rispettiva anidride, a partire dall'acido, mediante l'utilizzo di DCC (N,N'-dicicloesilcarbodiimide) è nota in letteratura ed applicabile a diverse tipologie di acidi carbossilici³. Tuttavia studi recenti hanno dimostrato come la reazione tra DCC e l'acido carbossilico non porta alla formazione quantitativa di anidride ma alla formazione di una miscela anidride ed un addotto acido-DCC (fig. 3.16), in quantità variabile in base alle condizioni di reazione.

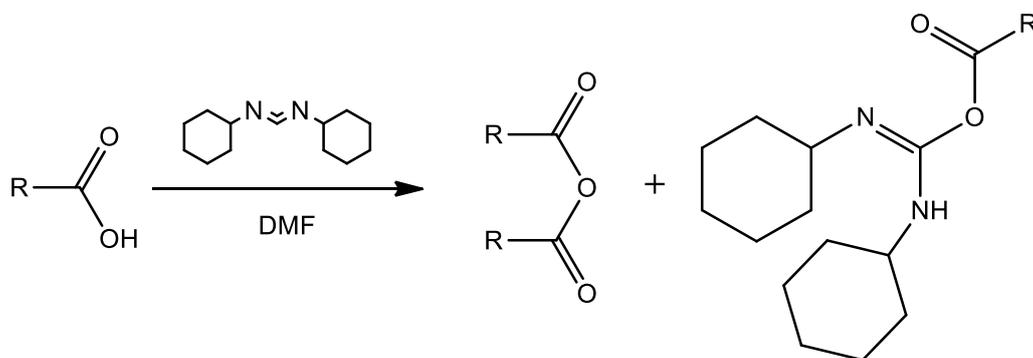


Figura 3.16: Schema di sintesi di anidridi da acidi carbossilici

Procedura: 30 equivalenti di DCC (185 mg) e 1 equivalente di acido (37.4 mg di β -ala-FMOC o 11.5 di acido 4-pentinoico) vengono disciolti in 1 ml di DMF e la soluzione mantenuta per 15 min in bagno ad ultrasuoni a temperatura ambiente. La formazione di un precipitato bianco (dicicloesilurea, DCU) conferma l'avvenuta reazione. Il precipitato viene rimosso mediante centrifugazione e la soluzione viene usata tal quale per lo *step* successivo.

Nonostante l'elevato eccesso di DCC rispetto all'acido che favorisce la formazione della specie acido-DCC, l'utilizzo del solvente DMF porta alla precipitazione della DCU formata durante la reazione di formazione dell'anidride. Questo sposta quindi l'equilibrio verso la formazione dell'anidride, rispetto all'acido attivato da DCC.

SINTESI DEI COMPLESSI 13-15:

La reazione prevede l'utilizzo della rispettiva anidride in quantità stechiometrica rispetto al complesso di platino **12**, in modo da forzare la formazione dell'addotto monosostituito, in un solvente non coordinante.

Procedura: 50 mg di $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{Cl})_2(\text{OH})_2]$ (**12**, 0.15 mmol) e 1 equivalente di anidride vengono sospesi in 3 ml di DMF e la reazione condotta per 24 h a temperatura ambiente sotto agitazione. Il precipitato (non reagito) viene scartato mediante centrifugazione, il solvente rimosso all'evaporatore rotante ed il solido viene lavato con etere dietilico (2x2ml).

Le reazioni tuttavia hanno portato alla formazione dei complessi desiderati con bassa resa e scarsissima purezza (<5%).

Gli scarsi risultati ottenuti attraverso questa tipologia di reazione sono legati a diverse problematiche, quali:

- Scarsa solubilità del complesso di partenza e buona solubilità del prodotto: questi due fattori giocano a sfavore della formazione del complesso desiderato. Essendo il complesso **12** poco solubile, la velocità di reazione è influenzata dalla velocità con cui viene consumato e dalla conseguente solubilizzazione del complesso non reagito. A sua volta il prodotto, solubile, può dar luogo ad una seconda sostituzione formando il complesso disostituito. Questi due fattori portano quindi alla formazione di più complessi di platino; il complesso **12** residuo $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{Cl})_2(\text{OH})_2]$, il complesso desiderato $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{Cl})_2(\text{OH})(\text{Y})]$ ed il complesso disostituito $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{Cl})_2(\text{Y})_2]$. Non è stato possibile favorire la formazione di un'unica specie o metterne a punto un'efficace procedura di purificazione.
- Per evitare la doppia sostituzione la reazione andrebbe condotta a temperature basse, tuttavia, per aumentare la solubilità del complesso ed attivare la reazione, essa andrebbe effettuata a temperature più elevate. Non è possibile quindi variare in maniera considerevole la temperatura impiegata nel metodo.
- Nel caso della reazione di formazione del complesso **13**, oltre alle tre specie descritte sopra, si ha la formazione di una specie supplementare dovuta alla sostituzione di una terza molecola di acido succinico in posizione equatoriale, al posto di un legante cloruro.
- Data la struttura simile dei complessi presenti nei prodotti e la scarsa quantità di prodotto desiderato, ne risulta difficoltoso e scarsamente redditizio un processo di separazione.

Tutti questi fattori non hanno permesso di ottenere il prodotto desiderato in buone rese e purezze.

3.2.3 Ossidazione con acido perossiacetimidico

La terza tipologia di reazioni si basa sulla sintesi di una nuova classe di composti di Pt^{IV}. La reazione prevede l'ossidazione della rispettiva base di Pt^{II} mediante l'utilizzo di un ossidante formato *in situ*: l'acido perossiacetimidico (PAIA).

Questo intermedio ossidante si forma dalla reazione di addizione dell'acqua ossigenata all'acetonitrile. L'acetonitrile infatti viene spesso usato nelle sintesi organiche in quantità catalitiche per aumentare il potere ossidante dell'acqua ossigenata⁵.

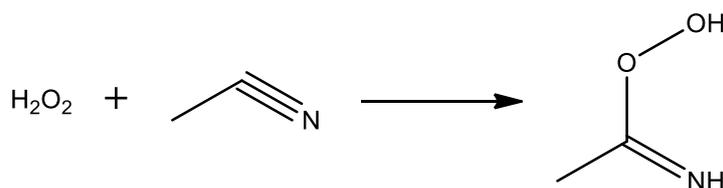


Figura 3.17: Reazione di formazione dell'acido perossiacetimidico

A differenza delle sintesi organiche, in cui l'acetonitrile catalizza la reazione attraverso la formazione dell'intermedio perossiacetimidico tornando nella forma iniziale dopo l'ossidazione, in presenza del complesso di platino l'intermedio rimane coordinato al centro metallico dopo l'ossidazione a Pt^{IV}, sotto forma di ione acetamidato (fig. 3.18).

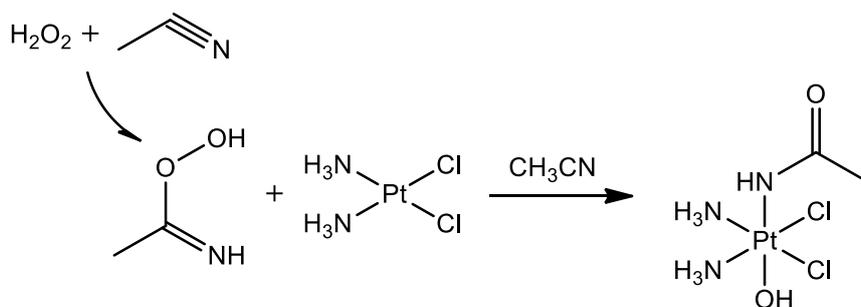


Figura 3.18: Reazione di ossidazione del cisplatino mediante acido perossiacetimidico

La particolarità di questi complessi è data dalla coordinazione dell'acetamidato tramite l'atomo di azoto, piuttosto che attraverso l'atomo di ossigeno, durante la fase di ossidazione. Infatti, nella maggior parte dei complessi di Pt^{IV} presenti in letteratura i leganti assiali sono coordinati attraverso un atomo di ossigeno (ad es. carbossilati, alcoli, aminoacidi...) e, in generale, i leganti coordinanti tramite un atomo di azoto sono già coordinati al centro metallico quando si trova allo stato di ossidazione +2. La particolare coordinazione è stata confermata attraverso la struttura a raggi X del complesso **16** (fig. 3.19).

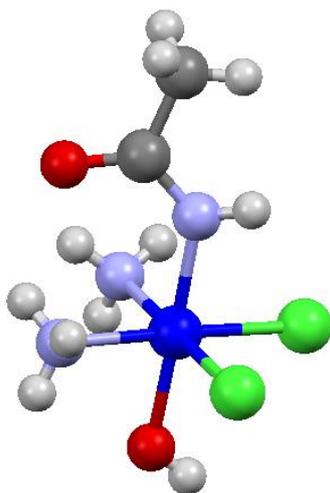


Figura 3.19: Struttura a raggi X del complesso **16**

Dalla struttura a raggi X è stato quindi possibile dimostrare la particolare coordinazione del gruppo acetimidato mediante l'atomo di azoto nella forma RNH^- , confermando così la neutralità del complesso. La stessa procedura di reazione è stata applicata utilizzando nitrili di diversa struttura, in modo da verificarne l'applicabilità con reagenti differenti (fig 3.20).

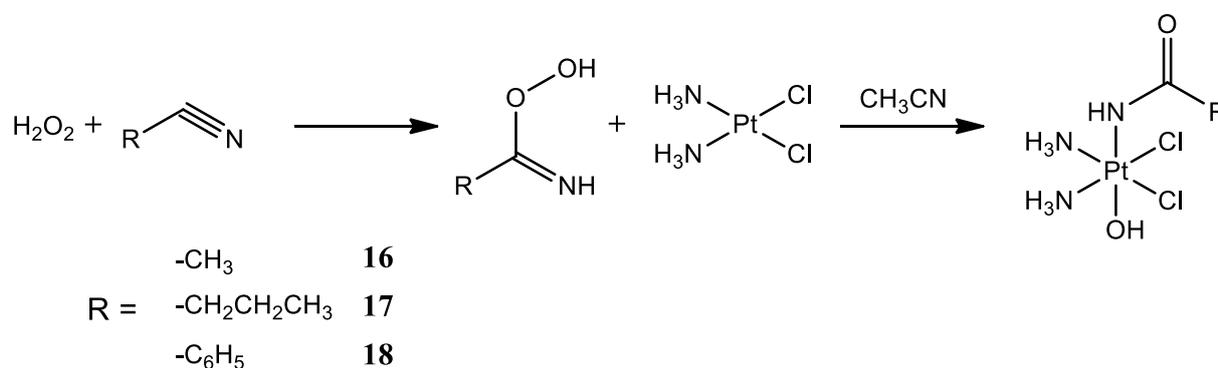


Figura 3.20: Sintesi dei complessi **16-18**

SINTESI COMPLESSI 16-18:

La sintesi di questi complessi prevede la formazione dell'ossidante acido perossiacetimidico per reazione tra H_2O_2 in acetonitrile. In seguito questo viene fatto reagire con il complesso di Pt^{II} in presenza di MeOH, in modo da permettere la solubilizzazione del complesso finale nella miscela metanolo:acetonitrile in rapporto 1:2 per favorirne la formazione.

Procedura: 1 ml di H_2O_2 al 50% w/w in acqua (17.6 mmol) viene lasciato reagire per 30 minuti con 10 ml di acetonitrile (192 mmol, 11 eqv) a temperatura ambiente. Alla soluzione vengono poi aggiunti 0.02 eqv di cisplatino (100 mg, 0.33 mmol) e, dopo 5 minuti, sotto agitazione, vengono

aggiunti 5 ml di metanolo. La miscela di reazione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 h. L'eventuale precipitato viene scartato mediante centrifugazione, il solvente rimosso all'evaporatore rotante ed il solido triturato con 10 ml di etere dietilico. Il solido viene lavato con tre aliquote da 5 ml di etere ed asciugato sotto corrente di azoto per ottenere un solido cristallino giallo.

Nella reazione con butirronitrile (**18**) e benzonitrile (**17**) il metanolo viene aggiunto insieme all'acqua ossigenata, dato che questi nitrili non sono miscibili con H₂O₂. È necessario quindi aggiungere il metanolo per miscelare le soluzioni e permettere la formazione della specie ossidante.

Resa: 106 mg (85%) per **16**, circa 5 mg per **17** e **18**

Nelle reazioni di formazione del complesso **17** e **18** il principale prodotto della reazione è il complesso **12** [Pt(NH₃)(Cl)₂(OH)₂]. Questo sottoprodotto è dovuto alla reazione tra cisplatino e H₂O₂ non reagita col nitrile. La mancata formazione dell'ossidante perossimidico è imputabile alla scarsa velocità di formazione (k_1) della specie, rispetto alla velocità di degradazione (k_2) per reazione con una seconda molecola di H₂O₂ (fig 3.14), come mostrato dagli studi effettuati da Wiberg⁶. Questo porta quindi alla scarsa formazione di acido perossibenzimidico (PBIA) e perossibutirrimidico in soluzione, e di conseguenza una ridotta quantità di prodotto.

Tuttavia, nel caso si utilizzi acetonitrile il meccanismo di degradazione prevede la reazione con una molecola di PAIA⁻, specie più nucleofila di HOO⁻. Questo comporta una variazione delle velocità di formazione e degradazione della specie perossimidica⁷. Infatti, la velocità di degradazione k_2 è minore di k_1 per i nitrili a ridotto ingombro sterico (acetonitrile) mentre per il benzonitrile e butirronitrile la reazione di degradazione è più rapida di quella di formazione (fig 3.21).

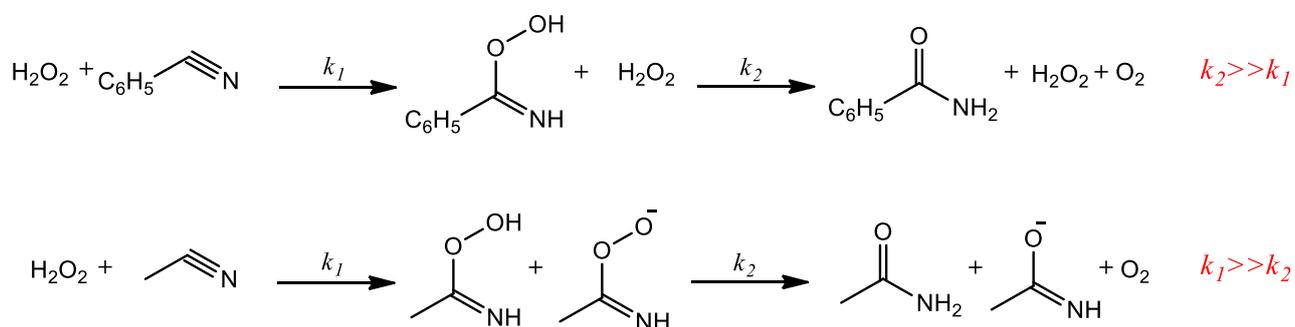


Figura 3.21: Reazioni di formazione e degradazione del PBIA (in alto) e PAIA (in basso)

Questo porta quindi alla scarsa applicabilità del metodo con nitrili di struttura differente. Tuttavia, il complesso **16**, sintetizzato in elevata resa e purezza, può rappresentare un ottima base per ottenere nuovi complessi di Pt^{IV} attraverso successive reazioni di sostituzione del gruppo OH.

[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)(acetilamido)] (16)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC per confermare struttura e formazione del complesso desiderato.

HPLC-MS

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e dal 30% di MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 4.2 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa (fig. 3.22), in cui è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare [M-OH]⁺ con valore di m/z = 358.2, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. E' inoltre presente il picco attribuibile allo ione [M+H]⁺ a m/z = 375.2.

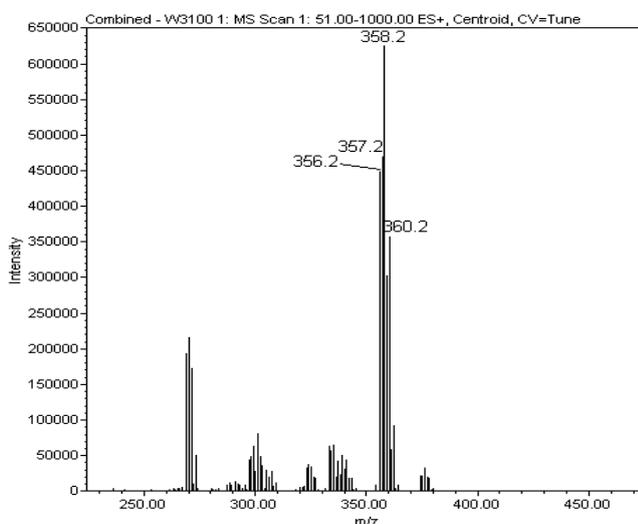
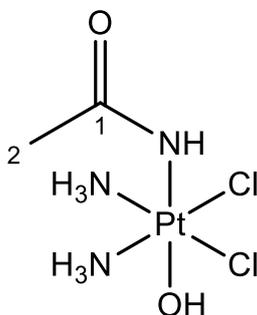


Figura 3.22: Spettro di massa del complesso 16

NMR

Gli spettri del complesso 16 sono stati registrati in d₆-DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

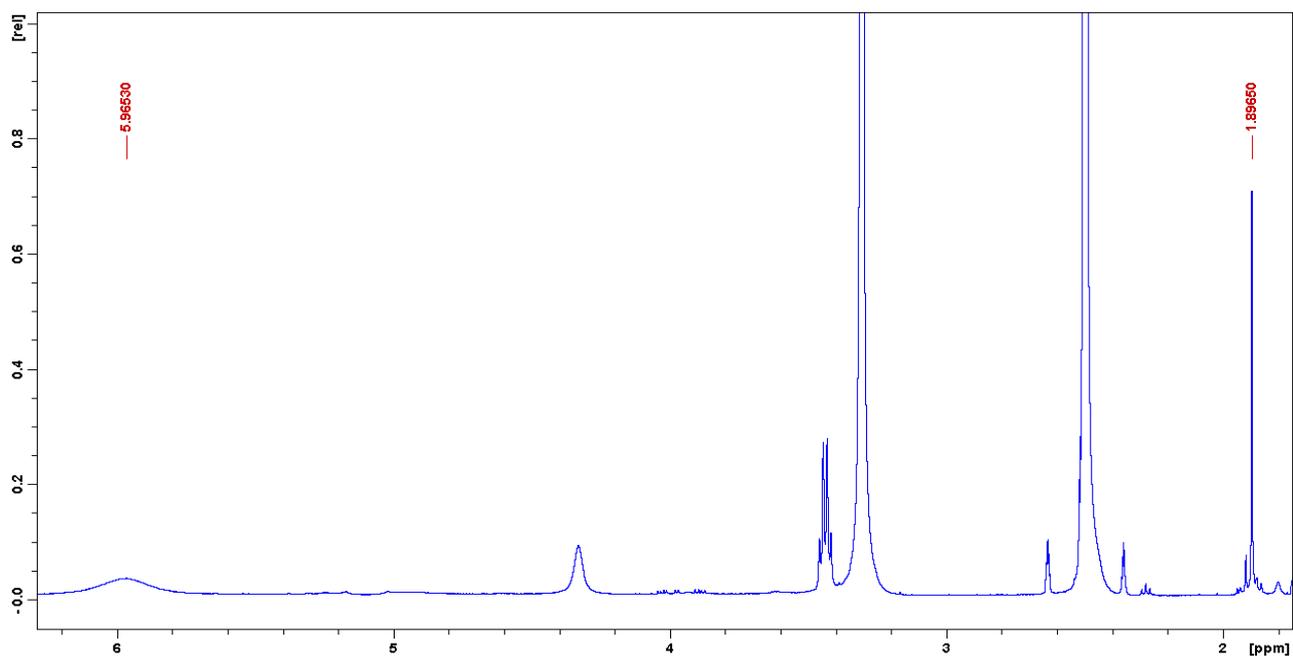


Figura 3.23: Spettro ^1H del complesso **16**

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (1.09 e 3.38 ppm) ed etanolo (1.06, 3.34 e 4.63 ppm)

Tabella 3.3: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **16**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	Integrazione
1.90	2	s	3
5.97	NH_3	m	6

- Spettro ^{13}C NMR

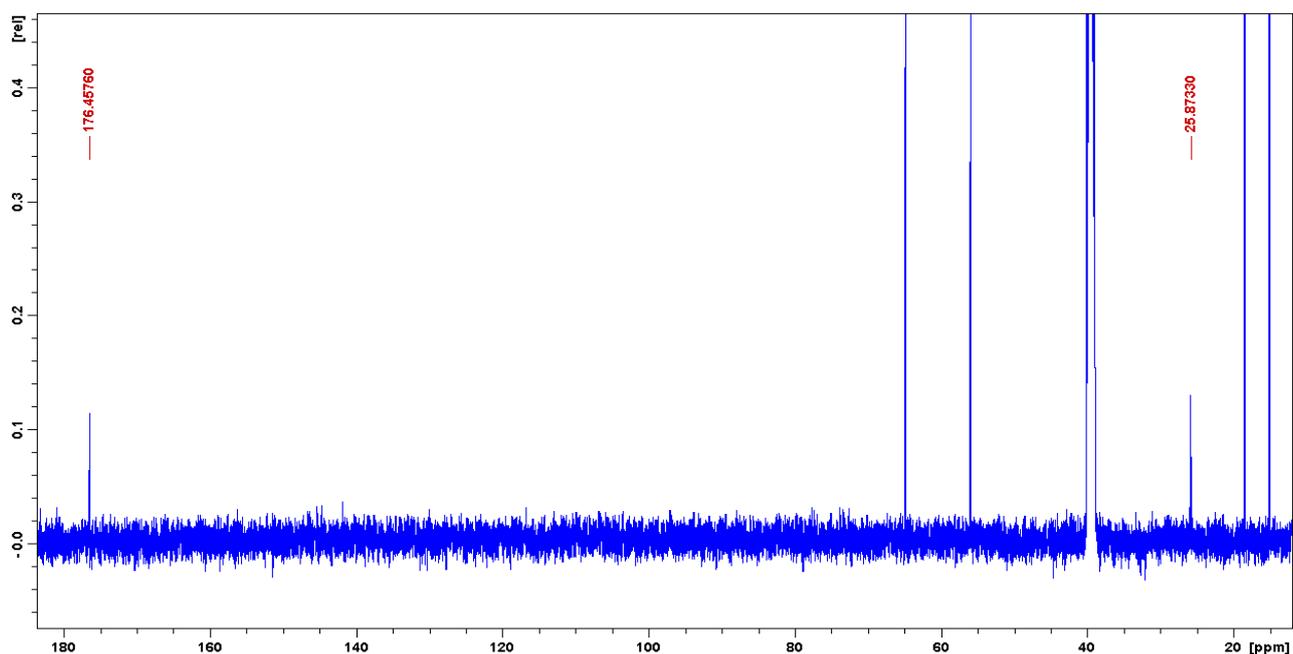


Figura 3.24: Spettro ^{13}C del complesso **16**

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (15.12 e 62.05 ppm) ed etanolo (18.51 e 56.07 ppm).

Tabella 3.4: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **16**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
25.9	2
176.5	1

- Spettro ^{195}Pt NMR

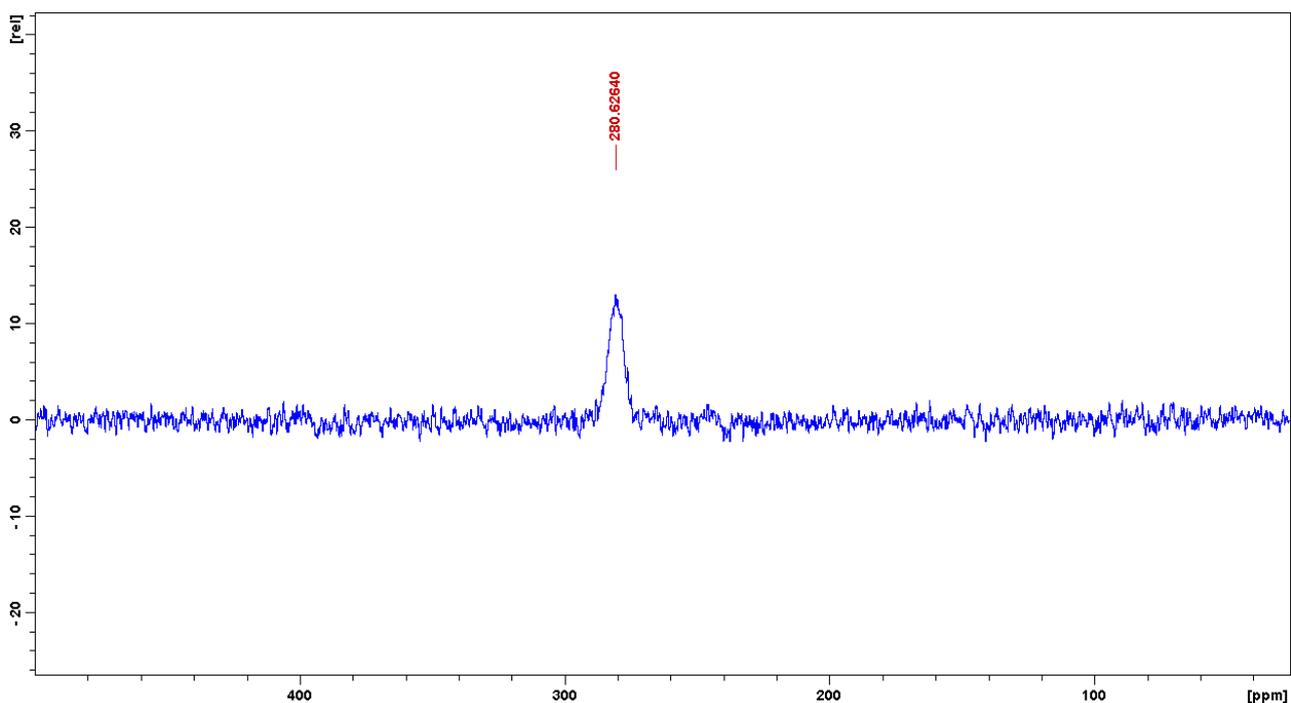


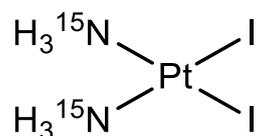
Figura 3.25: Spettro ^{195}Pt del complesso **16**

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 280 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* compatibile con un complesso di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_3\text{Cl}_2\text{O}$.

3.3 Sintesi dei complessi 11 e 16 marcati ^{15}N

Per studi successivi sono stati sintetizzati gli omologhi dei complessi **11** e **16** contenenti ammine marcate con ^{15}N . Questi complessi sono stati sintetizzati con reazioni simili ai composti non marcati ad eccezione della sintesi di formazione del complesso $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{I})_2]$ dove l'ammoniaca viene sostituita con una soluzione di $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ in KOH 1M.

SINTESI DELL'INTERMEDIO CIS- $[\text{Pt}(^{15}\text{NH}_3)_2\text{I}_2]$



Ad una soluzione di $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ (0.7 gr, 1.70 mmoli) in 10 ml di acqua viene aggiunto un eccesso di KI (1.0 gr, 6.0 mmoli) e si lascia reagire al buio sotto agitazione per 15 min a temperatura ambiente. Alla miscela viene aggiunta goccia a goccia sotto agitazione una soluzione di $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ in KOH 1M (0.20 g in 2.5 ml, 3.7 mmol), e la reazione condotta per 30 min a 40°C durante i quali avviene la precipitazione del complesso giallo scuro. La soluzione viene rimossa per centrifugazione ed il precipitato raccolto e lavato con acqua fredda (2x5 ml), MeOH (2x5ml) ed etere (2x5ml).

Resa: 83%

Da questo prodotto sono stati sintetizzati, seguendo le procedure viste per i complessi **11** e **16**, i composti marcati con ^{15}N (fig 3.26).

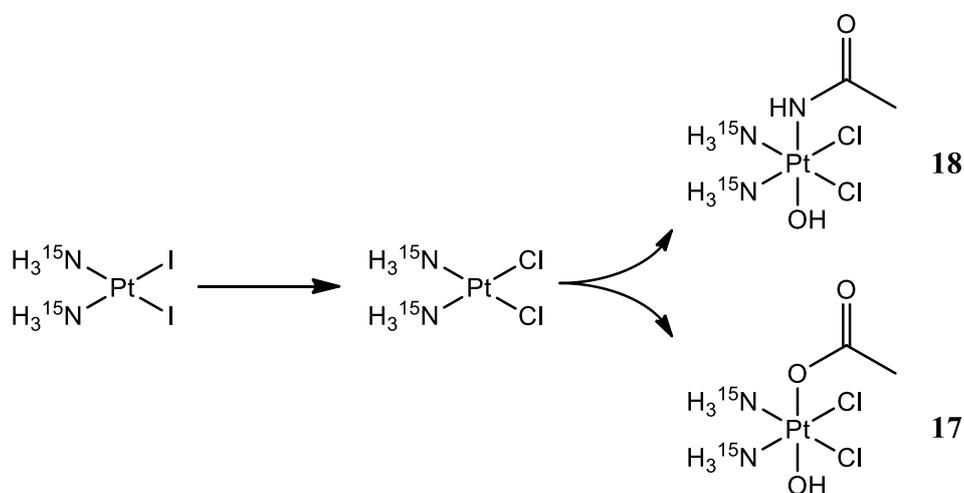


Figura 3.26: Schema di sintesi dei complessi 17 e 18

CARATTERIZZAZIONE DEI COMPLESSI 17 E 18:

[Pt(acetato)Cl₂(¹⁵NH₃)₂(OH)] (17)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

HPLC-MS

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e dal 30% di MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 5.3 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa (fig. 3.27), dove è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare [M-OH]⁺ con valore di $m/z = 361.2$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. E' inoltre presente il picco attribuibile allo ione [M+H]⁺ a $m/z = 378.2$.

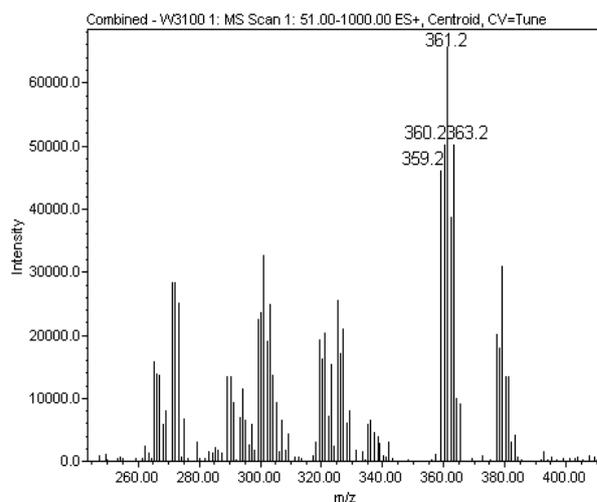
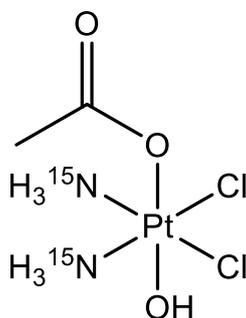


Figura 3.27: Spettro di massa del complesso 17

NMR

Gli spettri del complesso 17 sono stati registrati in 10% D₂O/90% H₂O a 300K.



- Spettro ^{15}N DEPT NMR

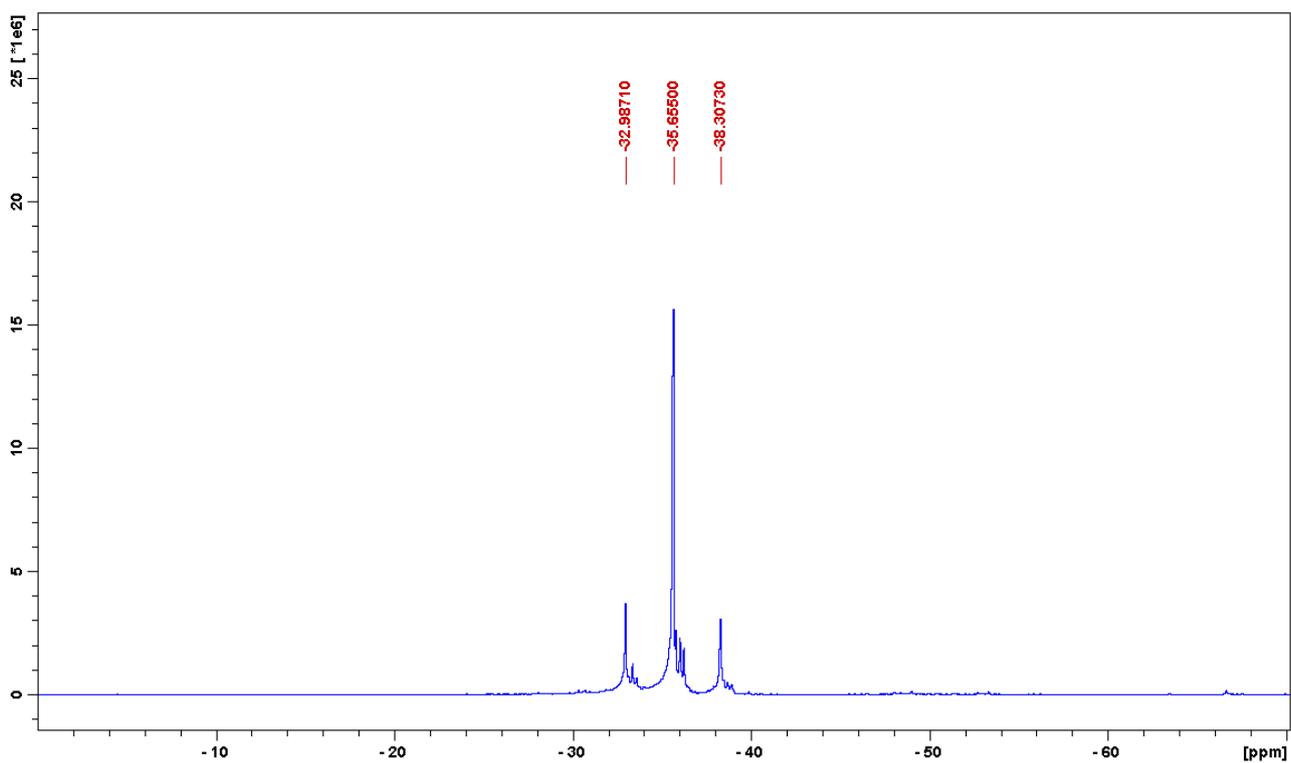


Figura 3.27: Spettro ^{15}N DEPT del complesso 17

- Spettro ^1H - ^{15}N HSQC NMR

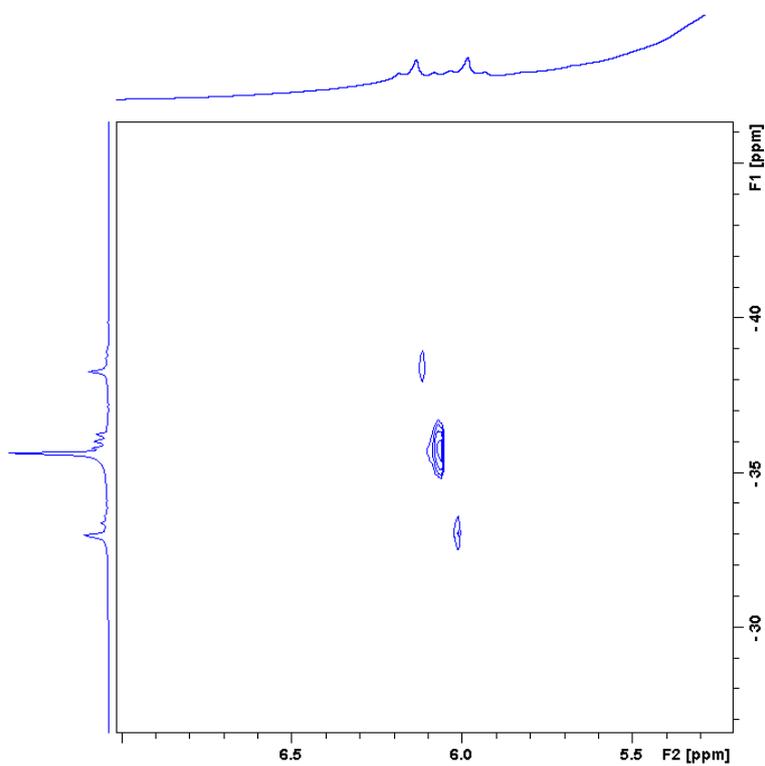


Figura 3.28: Spettro ^1H - ^{15}N HSQC del complesso 17

[Pt(acetamidato)Cl₂(¹⁵NH₃)₂(OH)] (18)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

HPLC-MS

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e dal 30% di MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 4.5 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa (fig. 3.29), dove è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare [M-OH]⁺ con valore di $m/z = 360.1$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt.

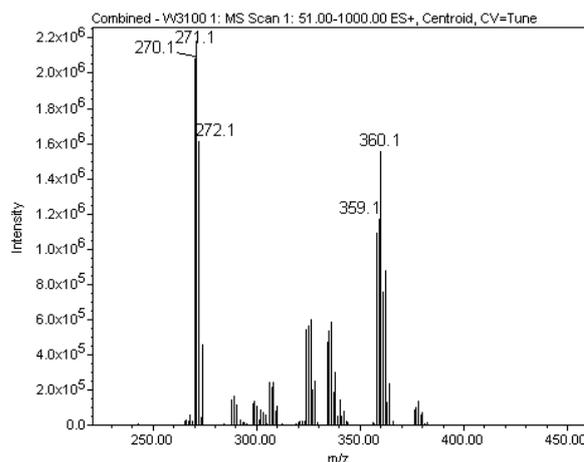
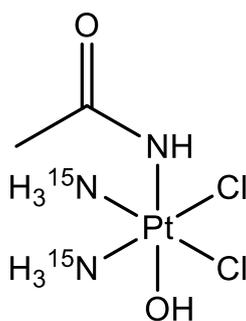


Figura 3.29: Spettro di massa del complesso 18

NMR

Gli spettri del complesso 18 sono stati registrati in 10% D₂O/90% H₂O a 300K.



- Spettro ^{15}N DEPT NMR

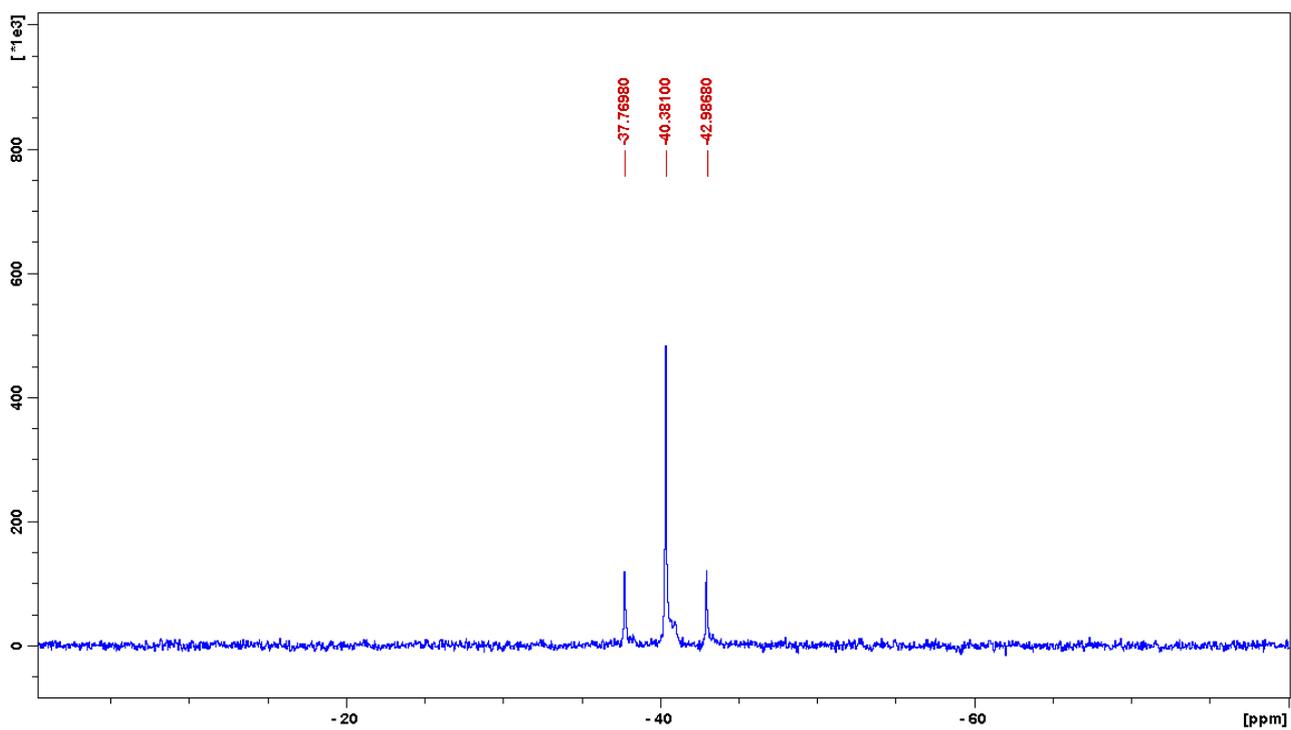


Figura 3.30: Spettro ^{15}N DEPT del complesso 18

- Spettro ^1H - ^{15}N HSQC NMR

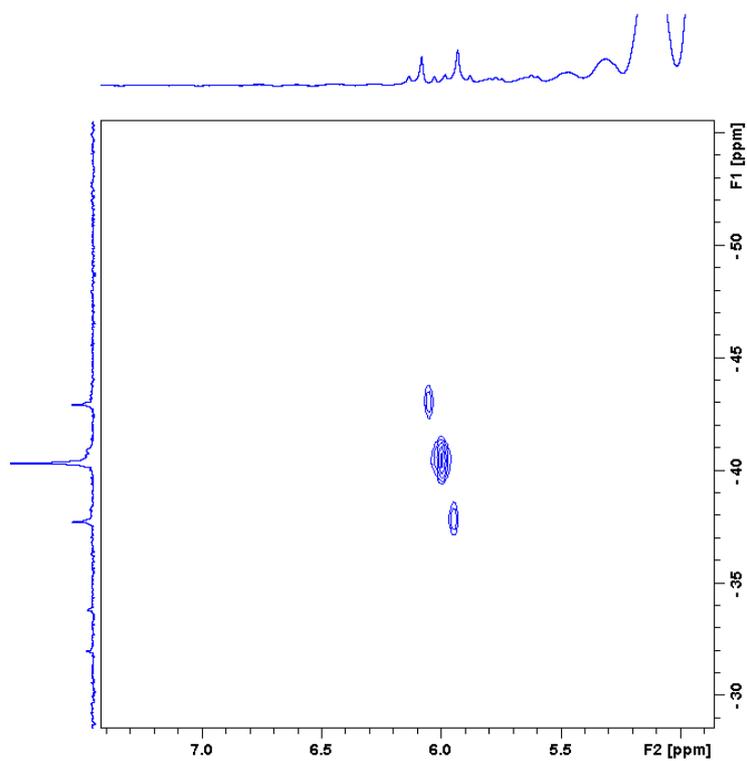


Figura 3.31: Spettro ^1H - ^{15}N HSQC del complesso 18

3.4 Conclusioni

Le sintesi di complessi di Pt^{IV} asimmetrici di formula [Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)(Y)] ottenuti per ossidazione dei rispettivi derivati di Pt^{II} hanno incontrato varie difficoltà.

Queste difficoltà sono legate a molteplici fattori:

- Impossibilità di utilizzare H₂O₂ pura: l'acqua contenuta nella soluzione di H₂O₂ al 50% compete nella reazione, portando alla formazione della specie [Pt(NH₃)₂(Cl)₂(OH)₂].
- Impossibilità di sostituire in modo “stechiometrico” un solo legante nel complesso [Pt(NH₃)(Cl)₂(OH)₂]; data l'insolubilità del complesso di partenza spesso è favorita la reazione che porta ad una seconda sostituzione, con formazione del prodotto disostituito, piuttosto che del complesso monosostituito.
- Degradazione degli intermedi perossimidici favorita per nitrili a catena medio-lunga rispetto alla reazione di formazione.

Tuttavia, i due complessi **11** e **16**, ottenuti in elevata resa e purezza, hanno mostrato ottime proprietà e possono essere ulteriormente sfruttati in *steps* successivi di sostituzione del legante OH con leganti di maggior interesse.

3.5 Bibliografia

1. S. C. Dhara, *A Rapid Method for the Synthesis of cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]*, Indian J. Chem. 1970, 8, 193-194.
2. M. Meldal, C. W. Tornøe, *Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*, 2008
3. Book: *Bioconjugate Techniques*, by Greg T. Hermanson, *Academic Press*
4. G. Laus, *Kinetics of acetonitrile-assisted oxidation of tertiary amines by hydrogen peroxide*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2001, 864-868.
5. K.B. Wiberg, *The Mechanisms of Hydrogen Peroxide Reactions. I. The Conversion of Benzonitrile to Benzamide*, J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 3961
6. H.D. Brauer, B. Eilersa, A. Langea, *Formation of singlet molecular oxygen by the Radziszewski reaction between acetonitrile and hydrogen peroxide in the absence and presence of ketones*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2002, 1288-1295

4. Sintesi dei complessi $[Pt(\text{acetato})Cl_2(NH_3)_2(Y)]$ e $[Pt(\text{acetamidato})Cl_2(NH_3)_2(Y)]$

Non essendo presenti in letteratura studi su complessi di Pt^{IV} con leganti imidati assiali, parte del lavoro si è incentrato sulla sintesi di derivati dal complesso **16** con proprietà lipofiliche differenti, mediante sostituzione del gruppo OH con leganti carbossilato alifatici, in modo da studiarne l'attività biologica ed il meccanismo di attivazione. Come visto per le sintesi dei complessi **13-15**, la sostituzione si basa sulla reazione di esterificazione sul legante idrossido con l'anidride dell'acido carbossilico scelto (fig 4.1).

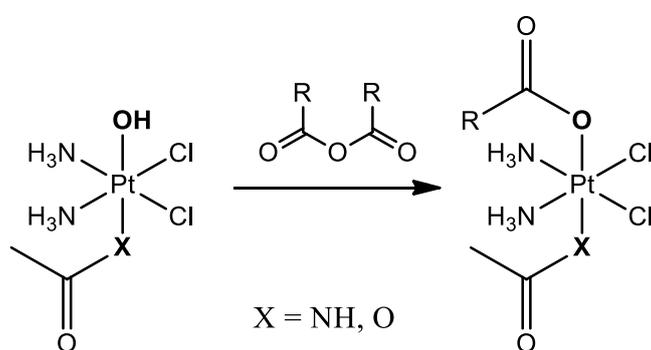


Figura 4.1: Reazione di esterificazione dei complessi di Pt^{IV}

In parallelo sono stati sintetizzati, con la medesima procedura a partire dal complesso **11**, i complessi con struttura analoga in modo da valutare come la coordinazione N-donatore influisca sull'attività biologica del complesso stesso rispetto ad un gruppo O-donatore in posizione assiale.

Mediante la stessa procedura sono stati sintetizzati diversi complessi a lipofilicità crescente, variando la lunghezza della catena del secondo legante assiale (fig 4.2).

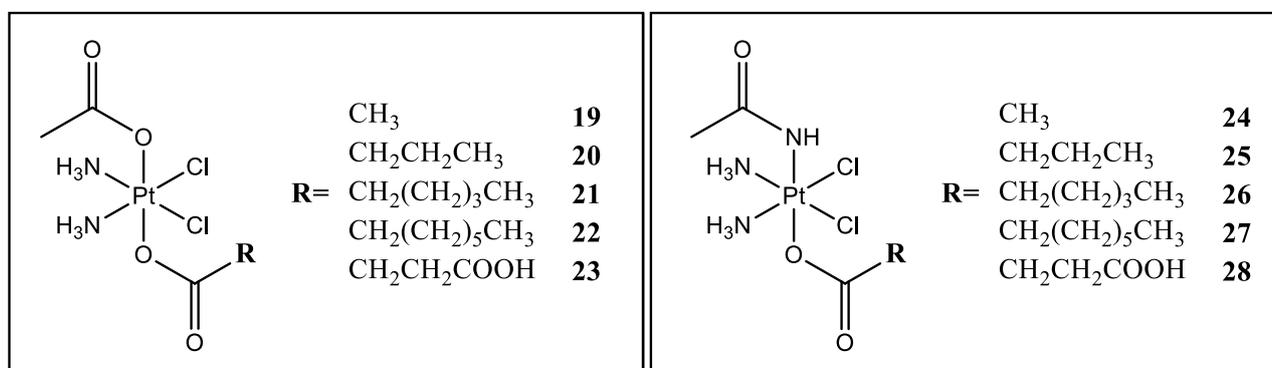


Figura 4.2: Complessi di Pt^{IV} con legante assiale acetato (sx) e acetamidato (dx)

Come leganti assiali sono stati scelti i carbossilati alifatici a catena lineare di formula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ con $n = 0, 2, 4$ e 6 . Oltre a questi è stato scelto un legante bifunzionale (acido succinico) in grado di rendere il complesso adatto per successive strategie di DTD.

Nel caso dei complessi **22** e **27**, l'anidride utilizzata (ottanoica) è stata sintetizzata *in situ*, dal rispettivo acido mediante attivazione con DCC, come indicato nel capitolo precedente (par 3.2).

La struttura dei complessi è stata confermata, oltre che da analisi in soluzione, grazie all'analisi cristallografica a raggi X eseguita sui cristalli ottenuti dal complesso **25** (fig. 4.3). La struttura risolta conferma che il carbossilato sostituisce il legante OH mantenendo invariata la geometria del complesso.

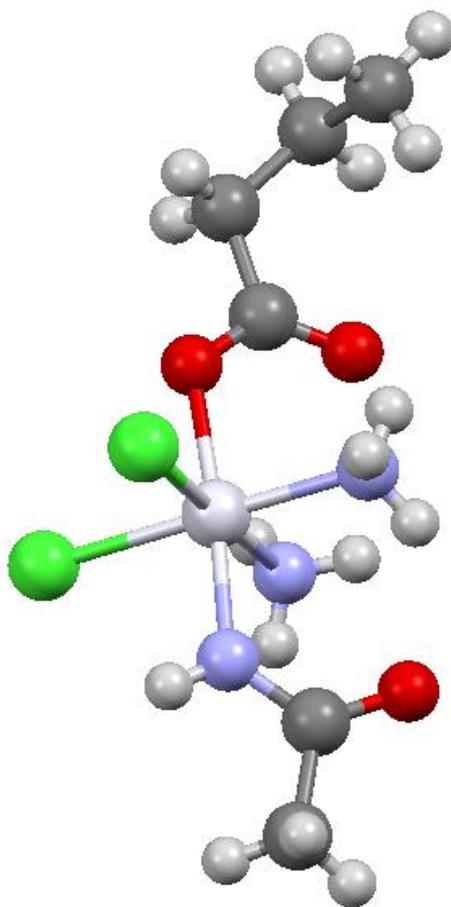


Figura 4.3: Struttura a raggi X del complesso 25

4.1 Sintesi dei complessi asimmetrici [Pt(NH₃)₂Cl₂(X)(Y)]

Il complesso **19** è stato sintetizzato seguendo una procedura già presente in letteratura¹, mentre i complessi **20-28** sono stati ottenuti mediante reazione tra il complesso **11** o **16** con la relativa anidride.

SINTESI DEI COMPLESSI 20-28:

Procedura: Il complesso **11** o **16** (100 mg, 0.267 mmol) viene sospeso in 10 ml di DMF a 50°C. Dopo 5 min vengono addizionati 20 equivalenti di anidride (252 µl di an. Acetica, 436 µl di an. Butirrica, 614 µl di an. Esanoica, 30 mg di an. Succinica e l'anidride ottanoica precedentemente formata in DMF) e la reazione mantenuta a 50°C fino alla completa dissoluzione del solido di partenza (2-4h). La soluzione viene filtrata per rimuovere l'eventuale residuo di complesso non reagito, quindi il solvente viene rimosso mediante evaporatore rotante ed il solido triturato con 10 ml di etere dietilico. Il precipitato viene ricristallizzato da metanolo ed il solido ottenuto viene lavato più volte con etere per rimuovere l'anidride residua.

Resa: 82-95%

CARATTERIZZAZIONE DEI COMPLESSI 19-28:

[Pt(acetato)₂Cl₂(NH₃)₂] (**19**)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e 50% MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 5.5 min relativo al complesso in esame come confermato dallo spettro ESI-MS corrispondente (fig. 4.4), dove è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare [M+H⁺]⁺ con valore di m/z = 419.1, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. E' inoltre presente un picco a m/z = 359.0, attribuibile allo ione [M-acetato]⁺.

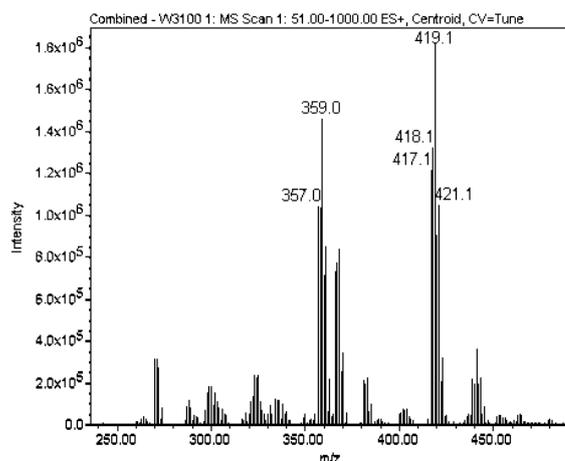
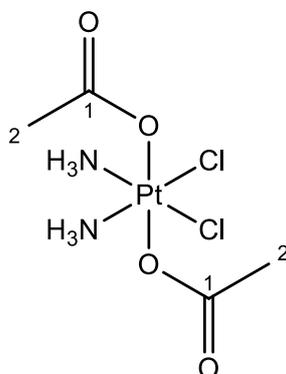


Figura 4.4: Spettro di massa del complesso **19**

NMR

Gli spettri del complesso **19** sono stati registrati in d_6 -DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

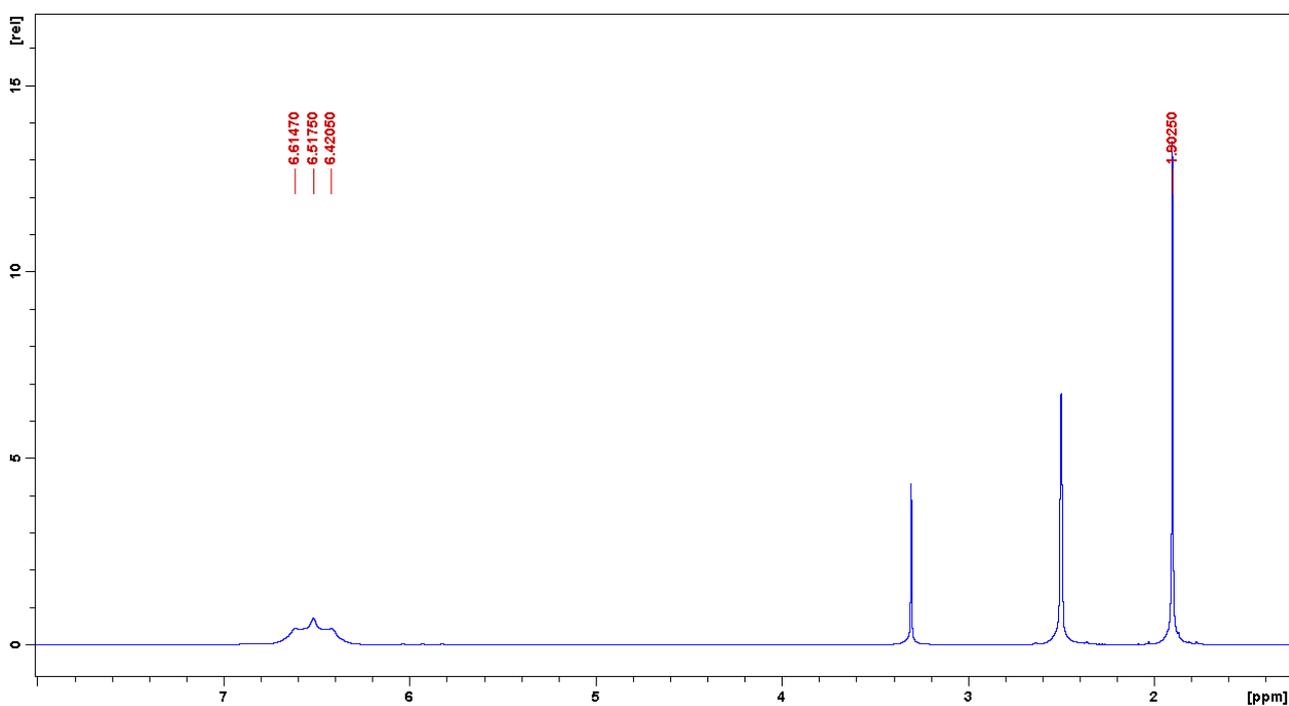


Figura 4.5: Spettro ^1H del complesso 19

Tabella 4.1: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 19

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
1.90	2	s		6
6.52	NH_3	m		6

- Spettro ^{13}C NMR

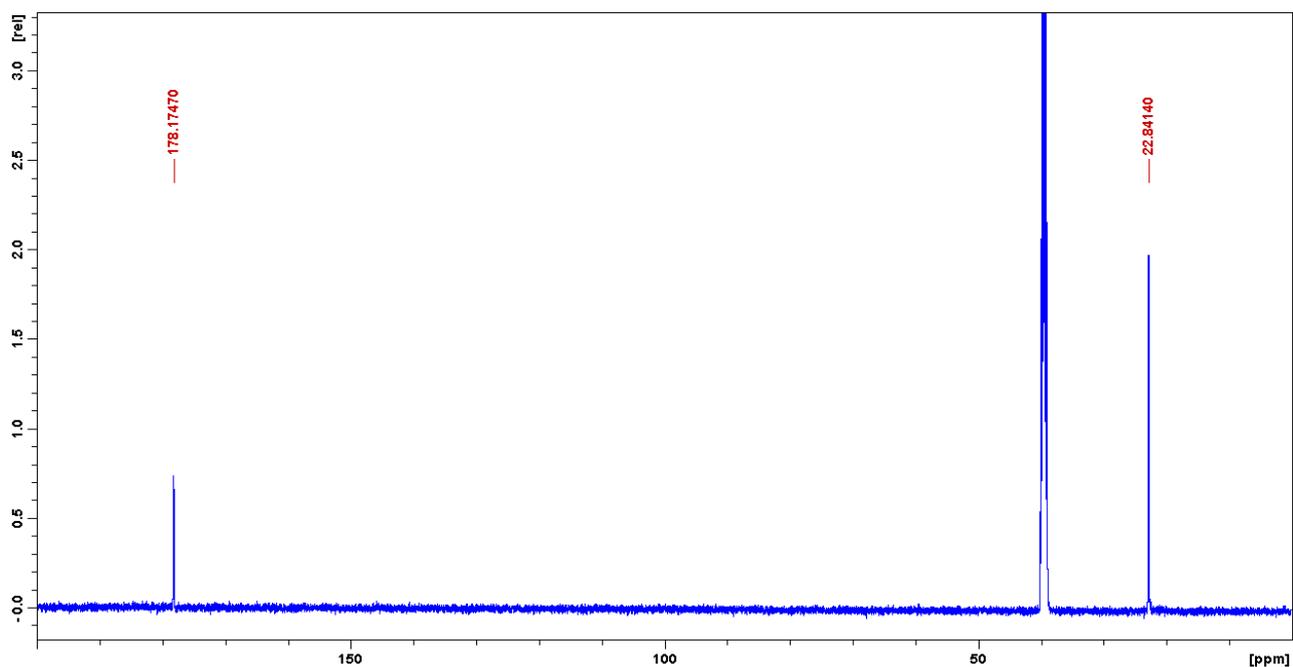


Figura 4.6: Spettro ^{13}C del complesso 19

Tabella 4.2: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 19

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
22.8	2
178.2	1

- Spettro ^{195}Pt NMR

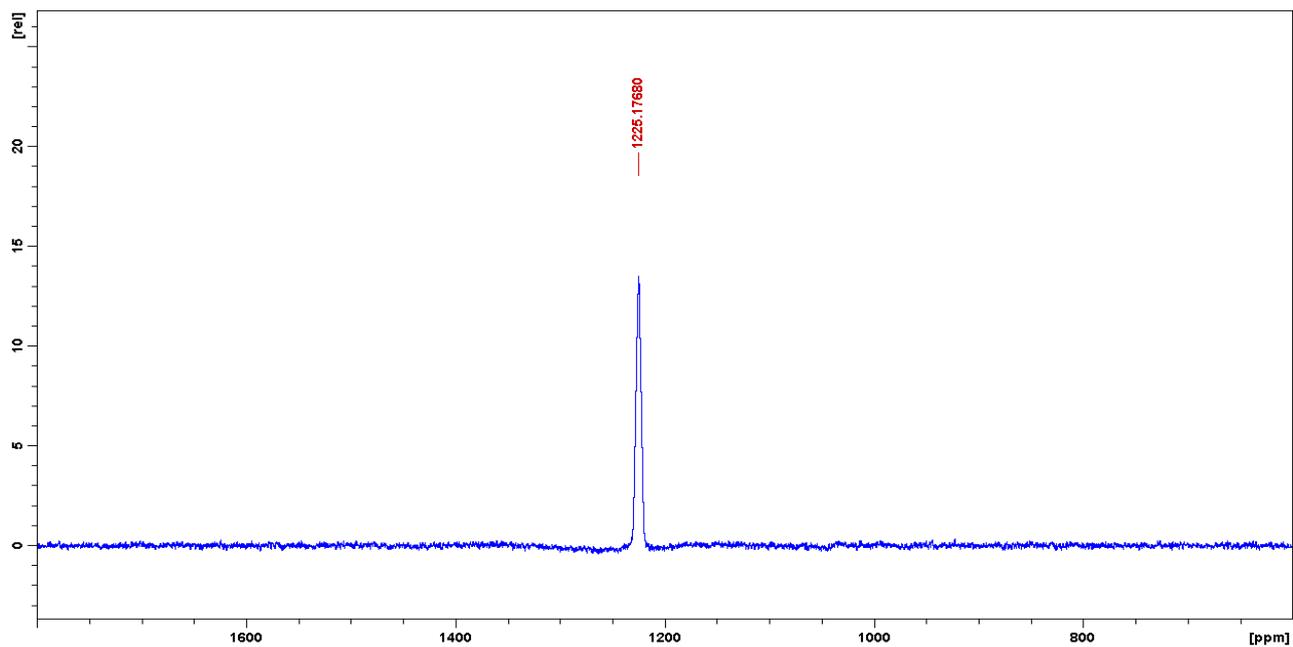


Figura 4.7: Spettro ^{195}Pt del complesso 19

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 1225 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* compatibile con complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

[Pt(acetato)(butanoato)Cl₂(NH₃)₂] (20)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecniche NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e 50% MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 6.7 min relativo al complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa corrispondente (fig. 4.8), dove è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[\text{M}+\text{H}]^+$ con valore di $m/z = 447.3$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi di Pt. Sono inoltre presenti altri picchi a $m/z = 300.1$, 359.2, 388.3 e 470.2 attribuibili rispettivamente alle specie $[\text{M-Acetato-butanoato-H}^+]^+$, $[\text{M-Butanoato}]^+$, $[\text{M-acetato}]^+$ e $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$.

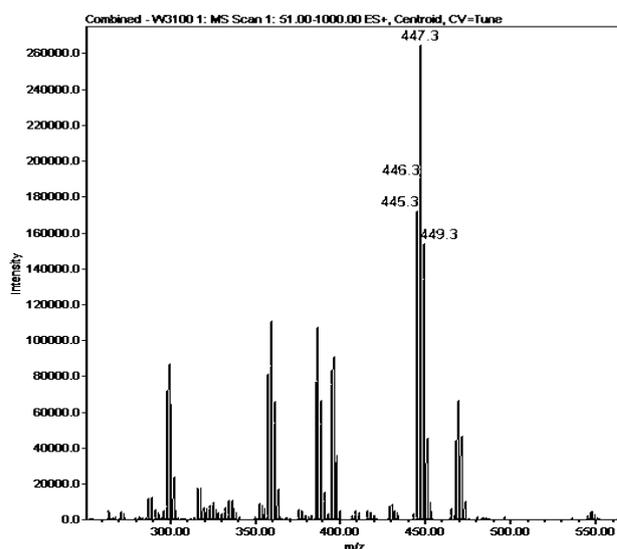
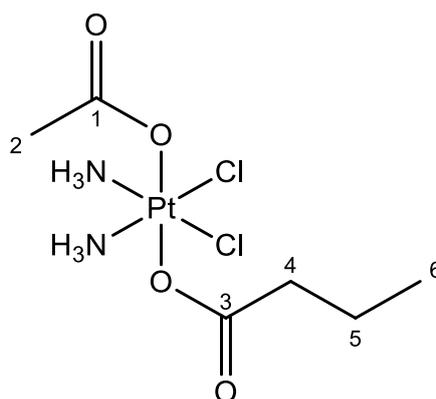


Figura 4.8: Spettro di massa del complesso 20

NMR

Gli spettri del complesso 20 sono stati registrati in d_6 -DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

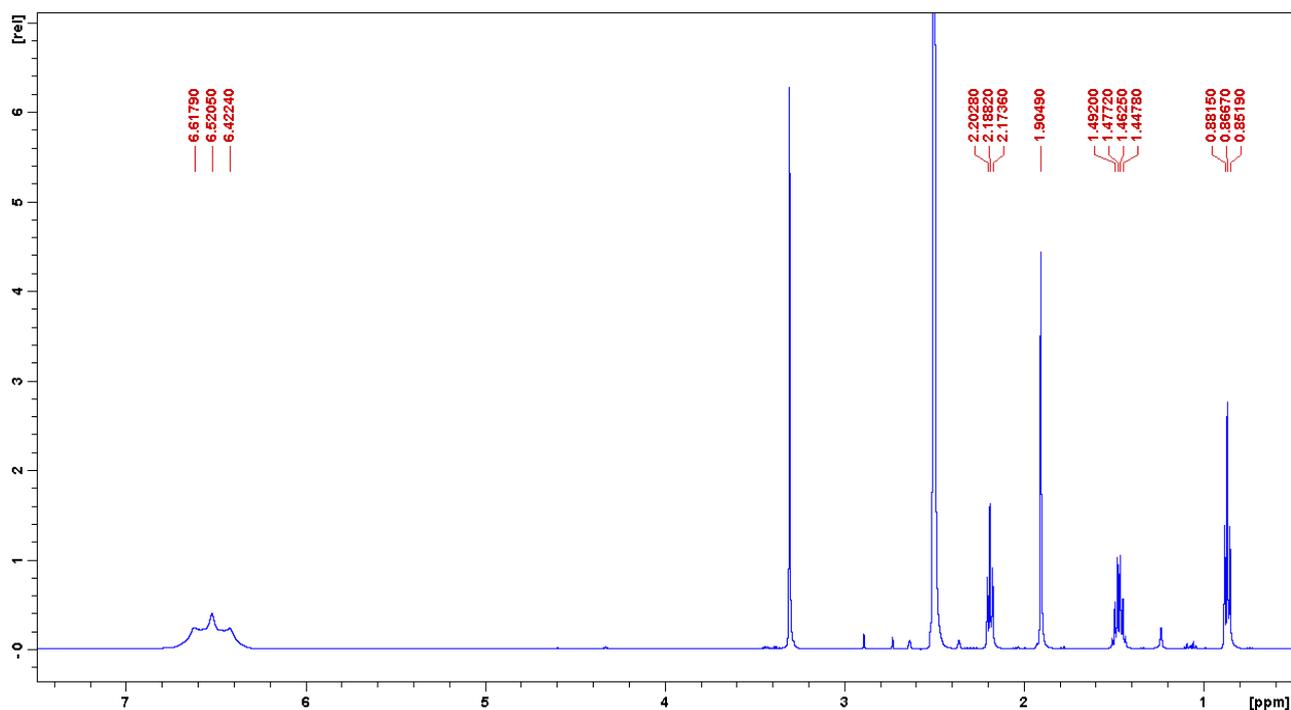


Figura 4.9: Spettro ^1H del complesso **20**

Tabella 4.3: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **20**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
0.87	6	t	7.4	3
1.47	5	q	7.4	2
1.90	2	s		3
2.19	4	t	7.4	2
6.52	NH_3	m		6

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^1H è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy)

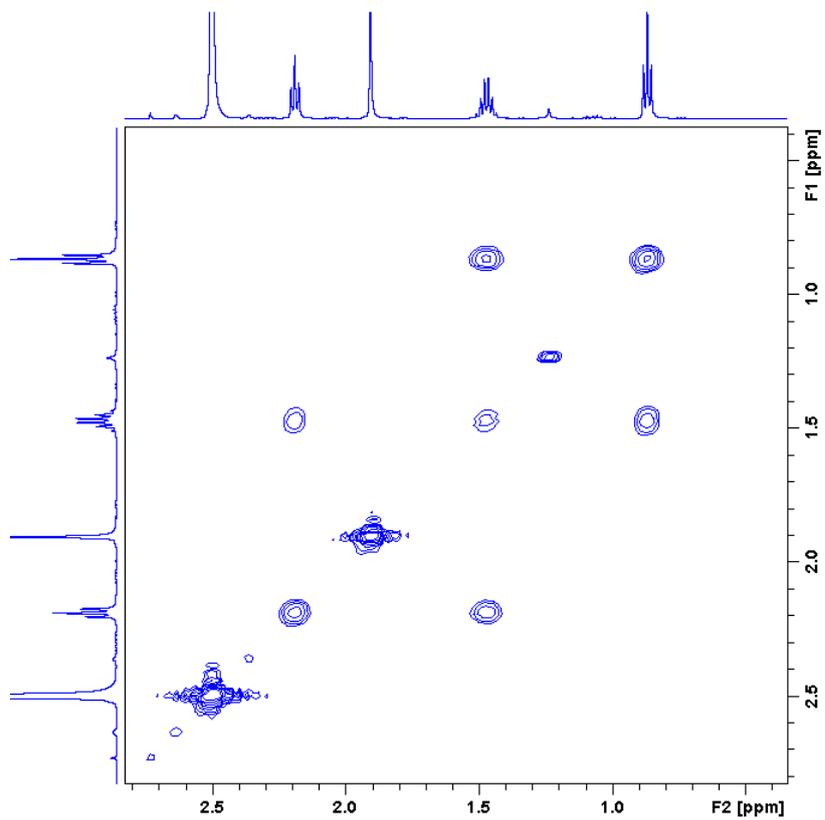


Figura 4.10: Spettro ^1H COSY del complesso 20

- Spettro ^{13}C NMR

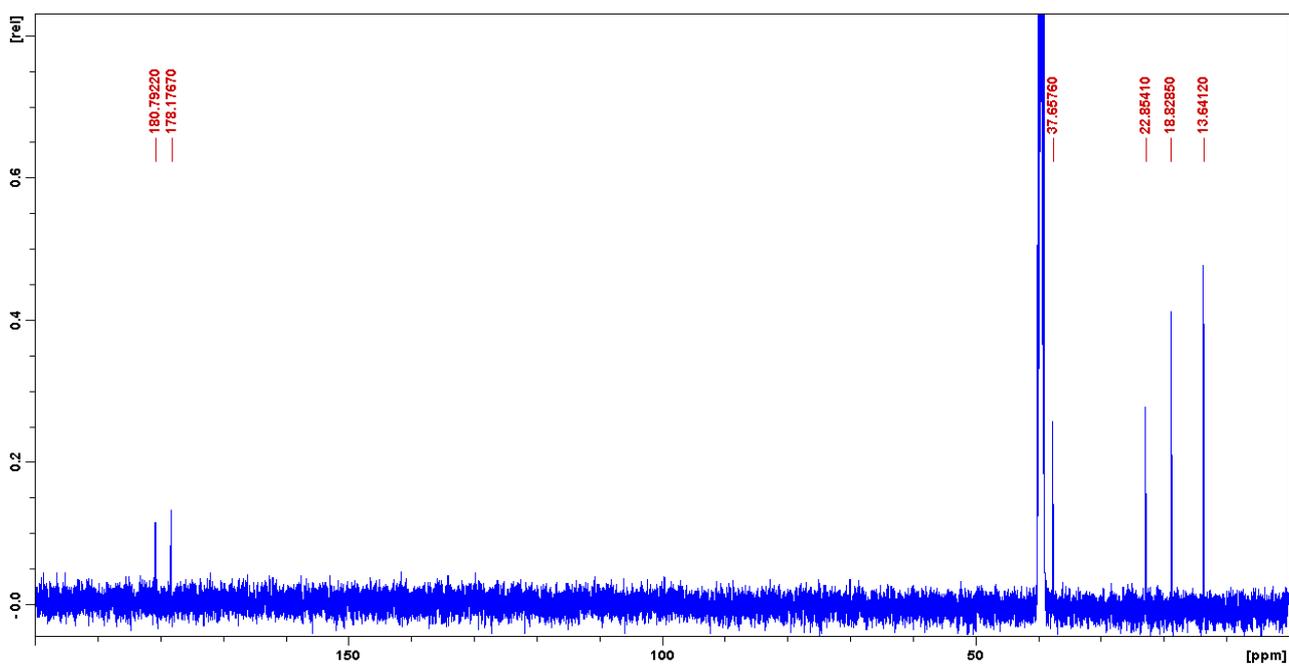


Figura 4.11: Spettro ^{13}C del complesso 20

Tabella 4.4: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **20**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
13.6	6
18.8	5
22.9	2
37.7	4
178.2	1
180.8	3

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

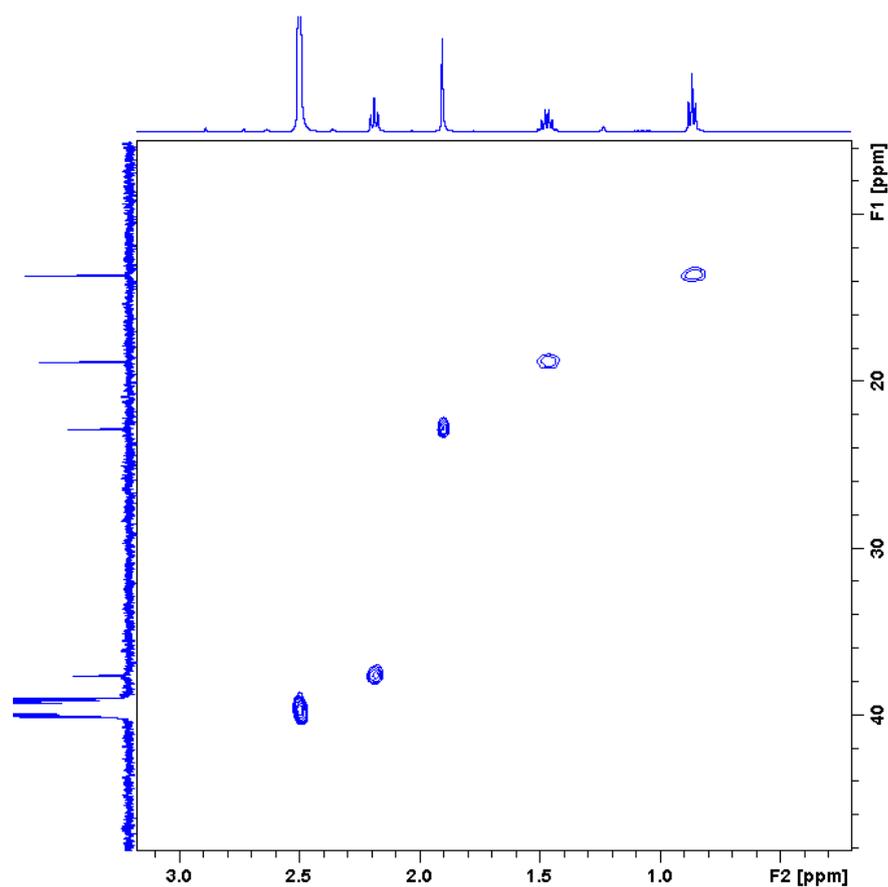


Figura 4.12: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso **20**

- Spettro ^{195}Pt NMR

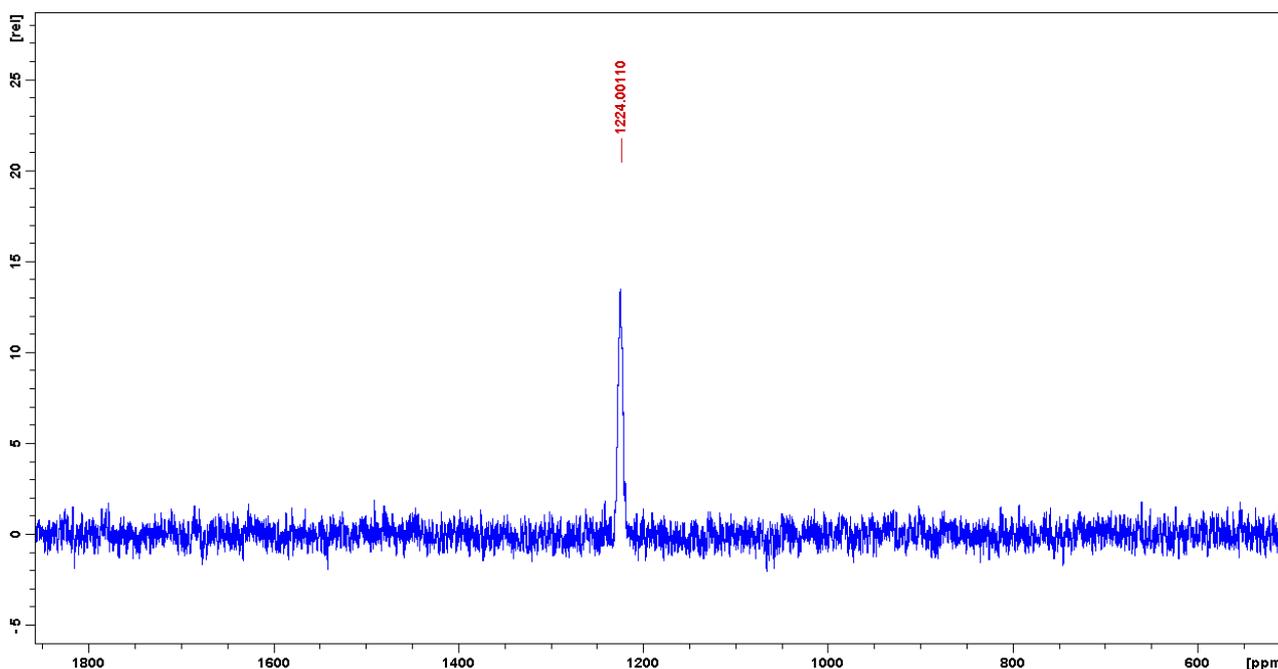


Figura 4.13: Spettro ^{195}Pt del complesso **20**

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 1224 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

[Pt(acetato) Cl_2 (esanoato)(NH_3) $_2$] (**21**)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e dal 50% di metanolo e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 14.1 min relativo al complesso in esame, come confermato dallo spettro ESI-MS corrispondente (fig. 4.14), dove è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[\text{M}+\text{H}]^+$ con valore di $m/z = 475.1$, il quale mostra il *pattern*

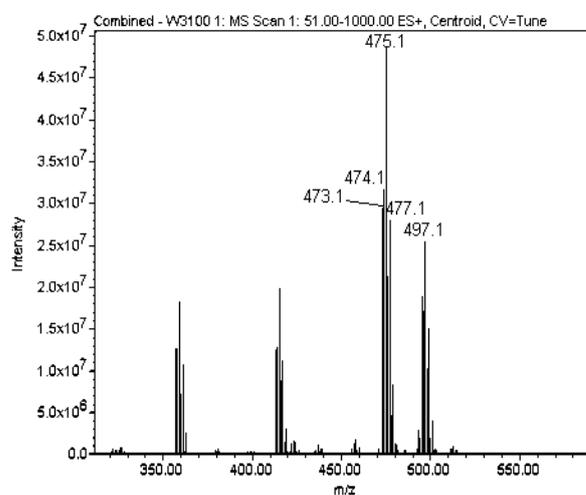
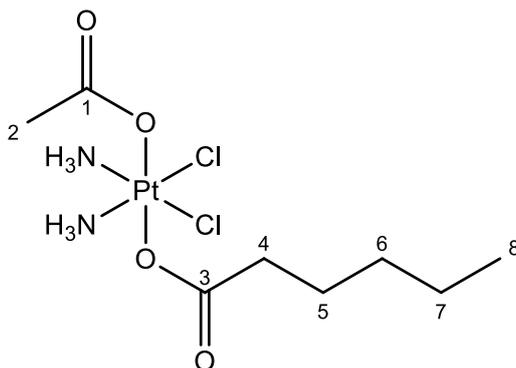


Figura 4.14: Spettro di massa del complesso **21**

isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. Sono inoltre presenti altri picchi a $m/z = 359.0$, 415.1 e 497.1 rispettivamente degli ioni $[M\text{-esanoato}]^+$, $[M\text{-acetato}]^+$ e $[M+\text{Na}^+]^+$.

NMR

Gli spettri del complesso **21** sono stati registrati in d_6 -DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

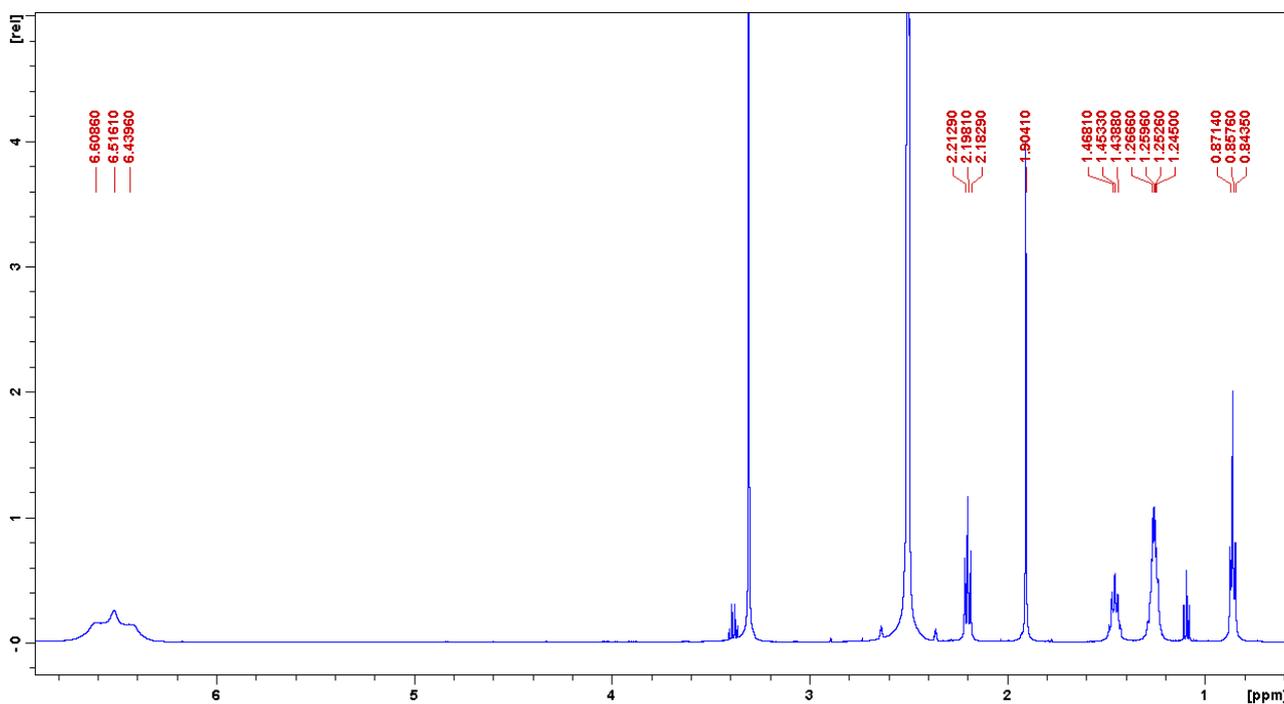


Figura 4.15: Spettro ^1H del complesso **21**

Tabella 4.5: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 21

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
0.86	8	t	7.0	3
1.26	6-7	m		4
1.45	5	m		2
1.90	2	s		3
2.20	4	t	7.4	2
6.52	NH ₃	m		6

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (1.09 e 3.38 ppm).

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^1H è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).

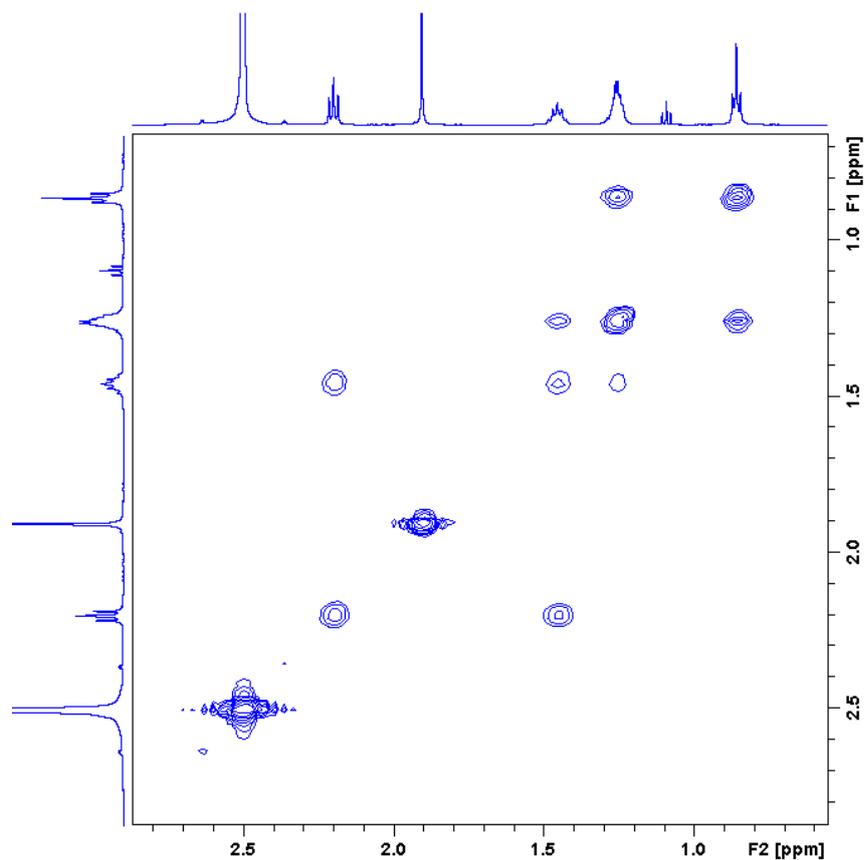


Figura 4.16: Spettro ^1H COSY del complesso 21

- Spettro ^{13}C NMR

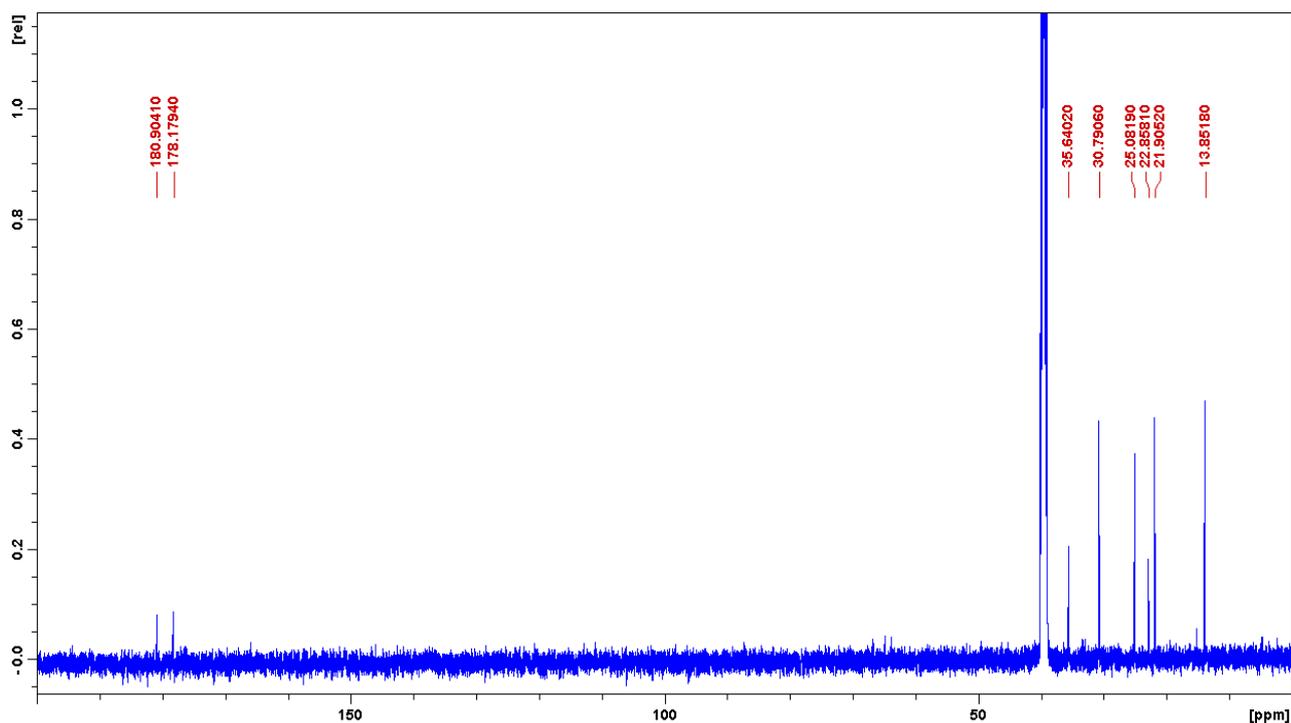


Figura 4.17: Spettro ^{13}C del complesso **21**

Tabella 4.6: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **21**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
13.9	8
21.9	7
22.9	2
25.1	5

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
30.8	6
35.6	4
178.2	1
180.9	3

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

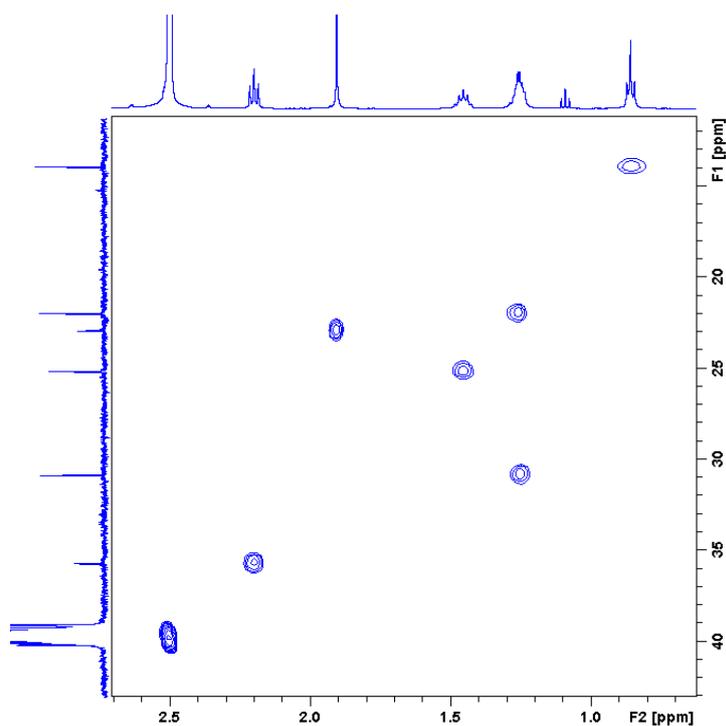


Figura 4.18: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso **21**

- Spettro ^{195}Pt NMR

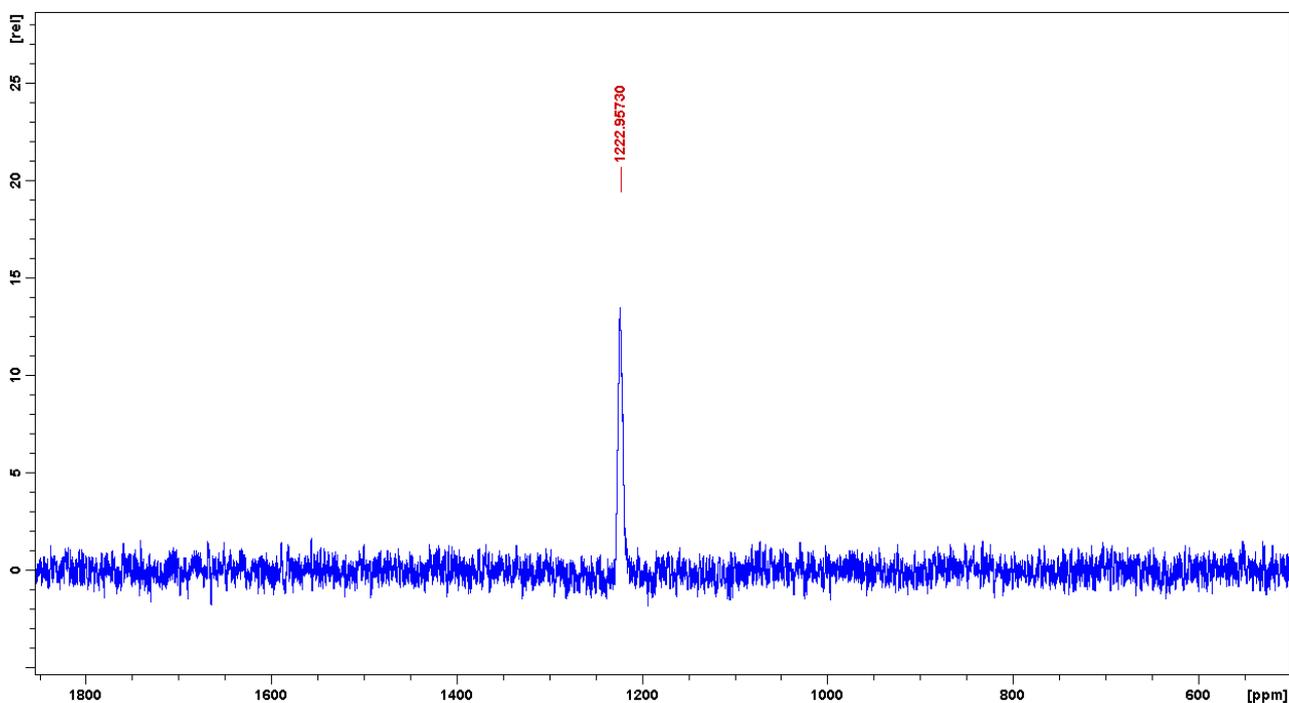


Figura 4.19: Spettro ^{195}Pt del complesso **21**

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a -1223 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* compatibile con complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

[Pt(acetato)Cl₂(NH₃)₂(ottanoato)] (22)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e dal 50% di metanolo e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 54.3 min relativo al complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa corrispondente (fig. 4.20), dove si è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare [M-OH]⁺ con valore di m/z = 503.2, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. Sono inoltre presenti altri picchi a m/z = 359.0, 443.2 e 525.2 attribuibili agli ioni [M-ottanoato]⁺, [M-acetato]⁺ e [M+Na⁺]⁺.

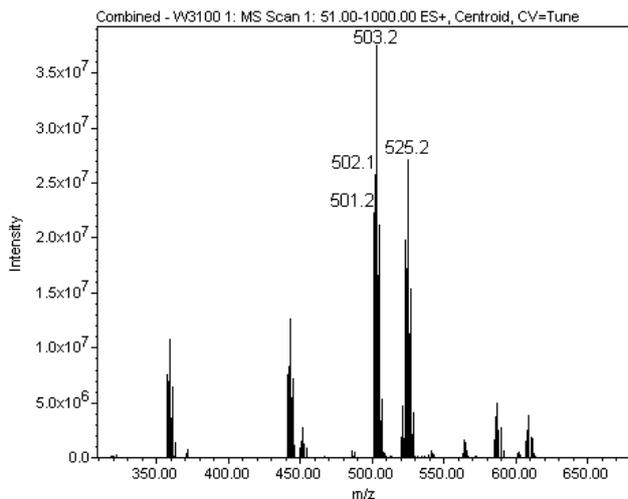
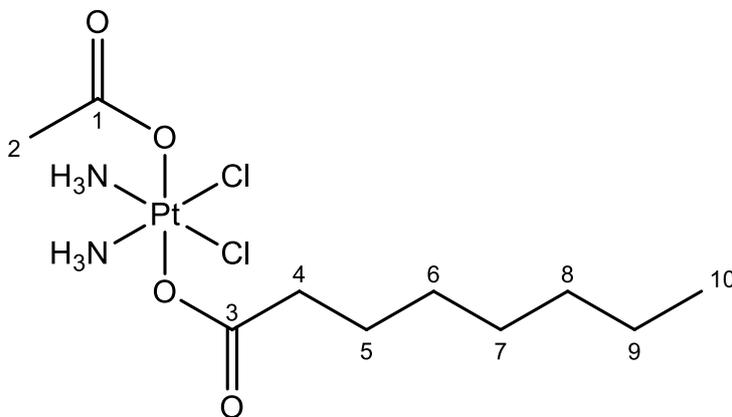


Figura 4.20: Spettro di massa del complesso 22

NMR

Gli spettri del complesso 22 sono stati registrati in d₆-DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

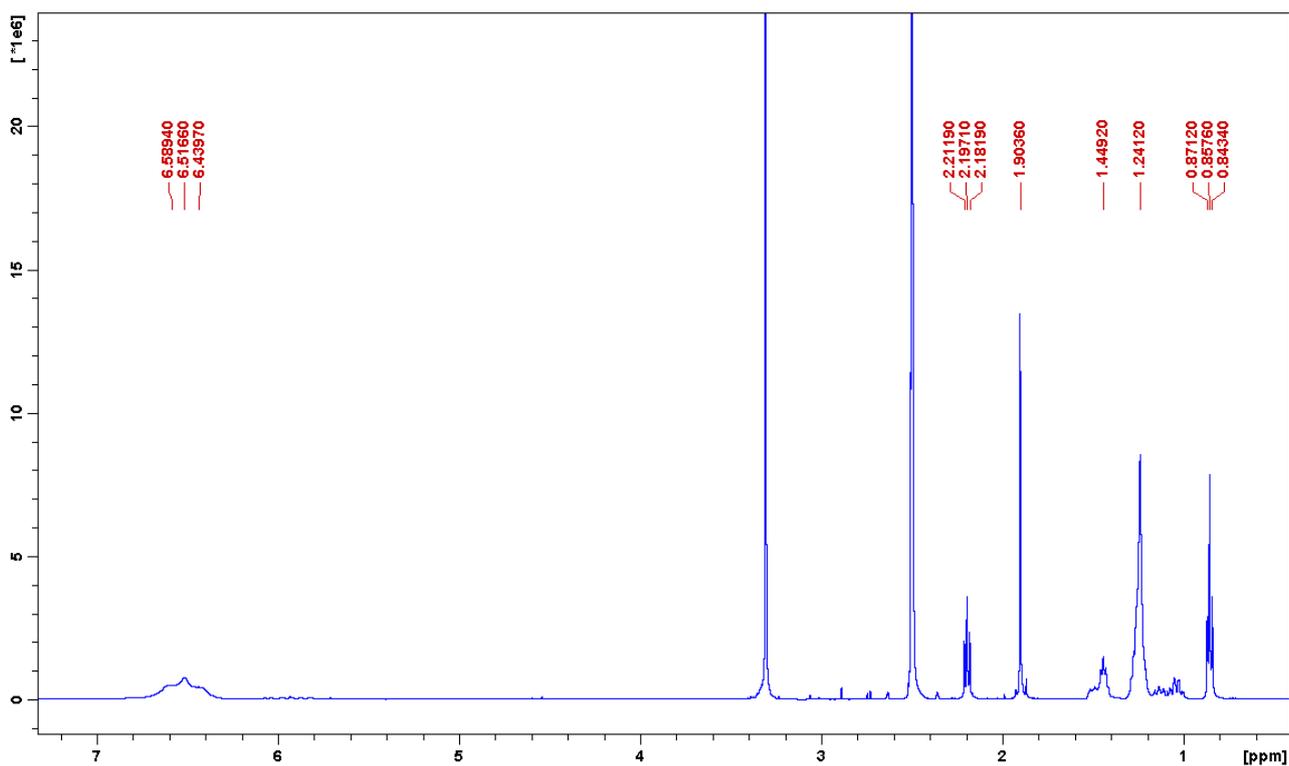


Figura 4.21: Spettro ^1H del complesso 22

Tabella 4.7: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 22

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
0.86	10	t	6.8	3
1.25	6-7-8-9	m		8
1.45	5	m		2
1.90	2	s		3
2.20	4	t	7.4	2
6.47	NH_3	m		6

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^1H è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).

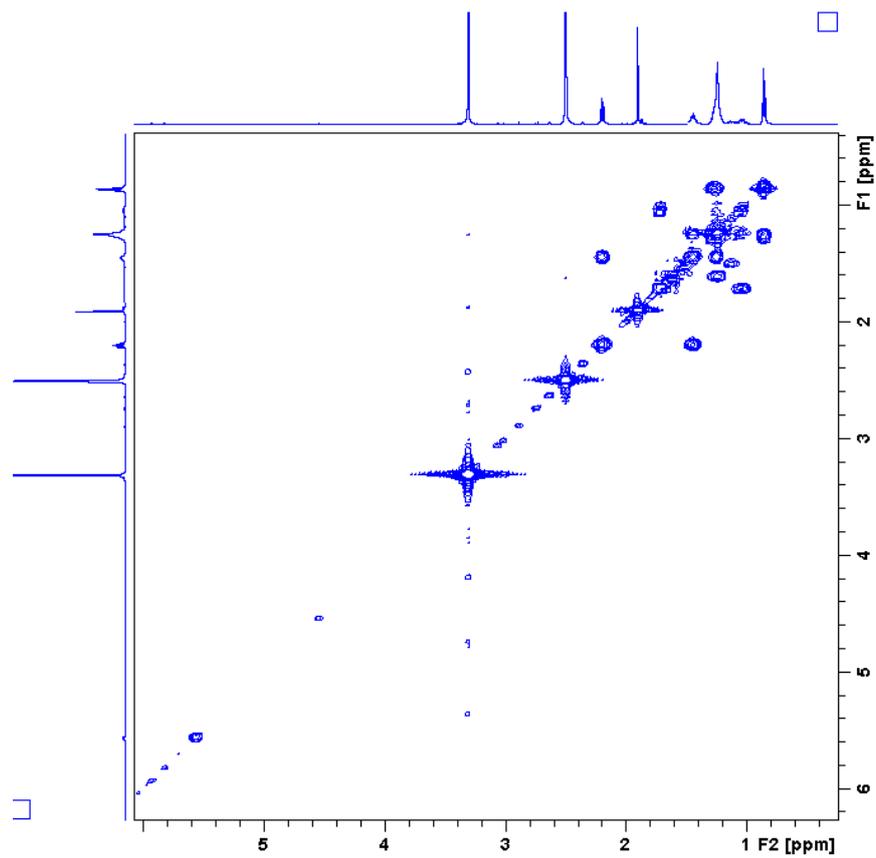


Figura 4.22: Spettro ^1H COSY del complesso 22

- Spettro ^{13}C NMR

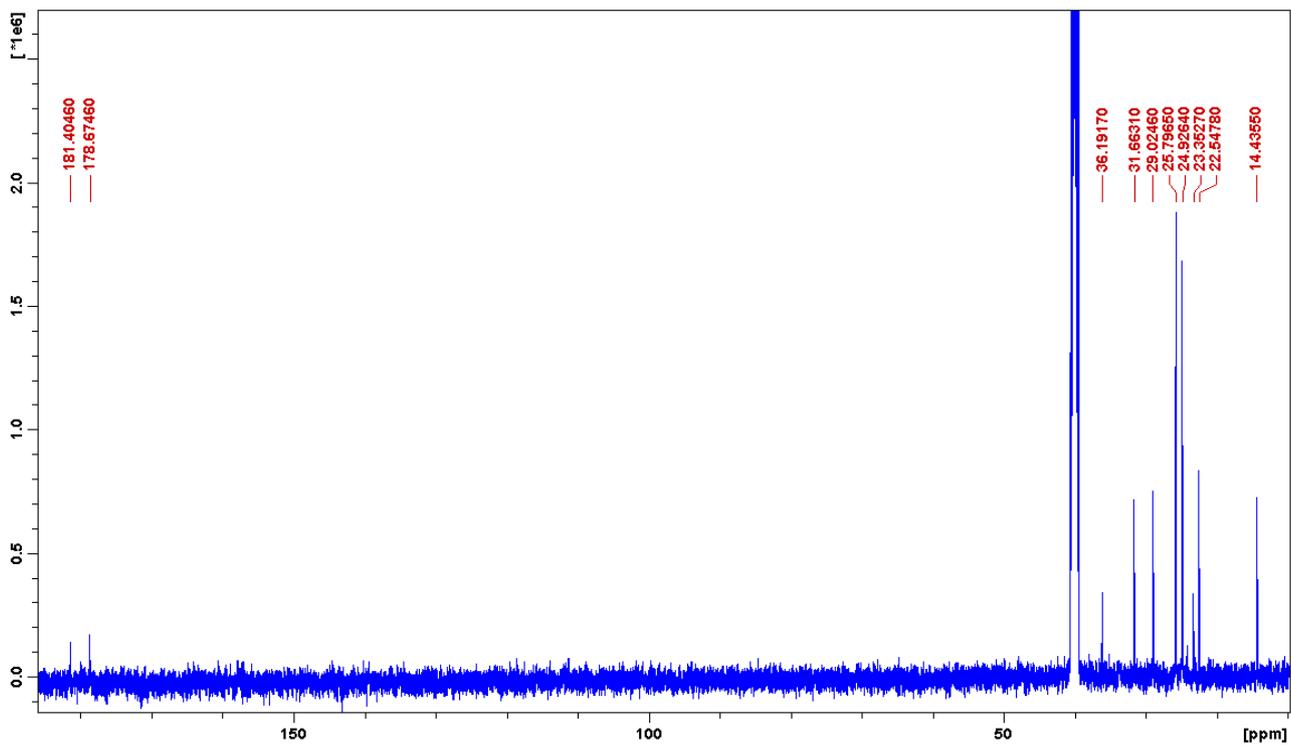


Figura 4.23: Spettro ^{13}C del complesso 22

Tabella 4.8: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 22

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
14.4	10	29.0	7
22.6	9	31.7	6
23.4	2	36.2	4
24.9	8	178.7	1
25.8	5	181.4	3

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

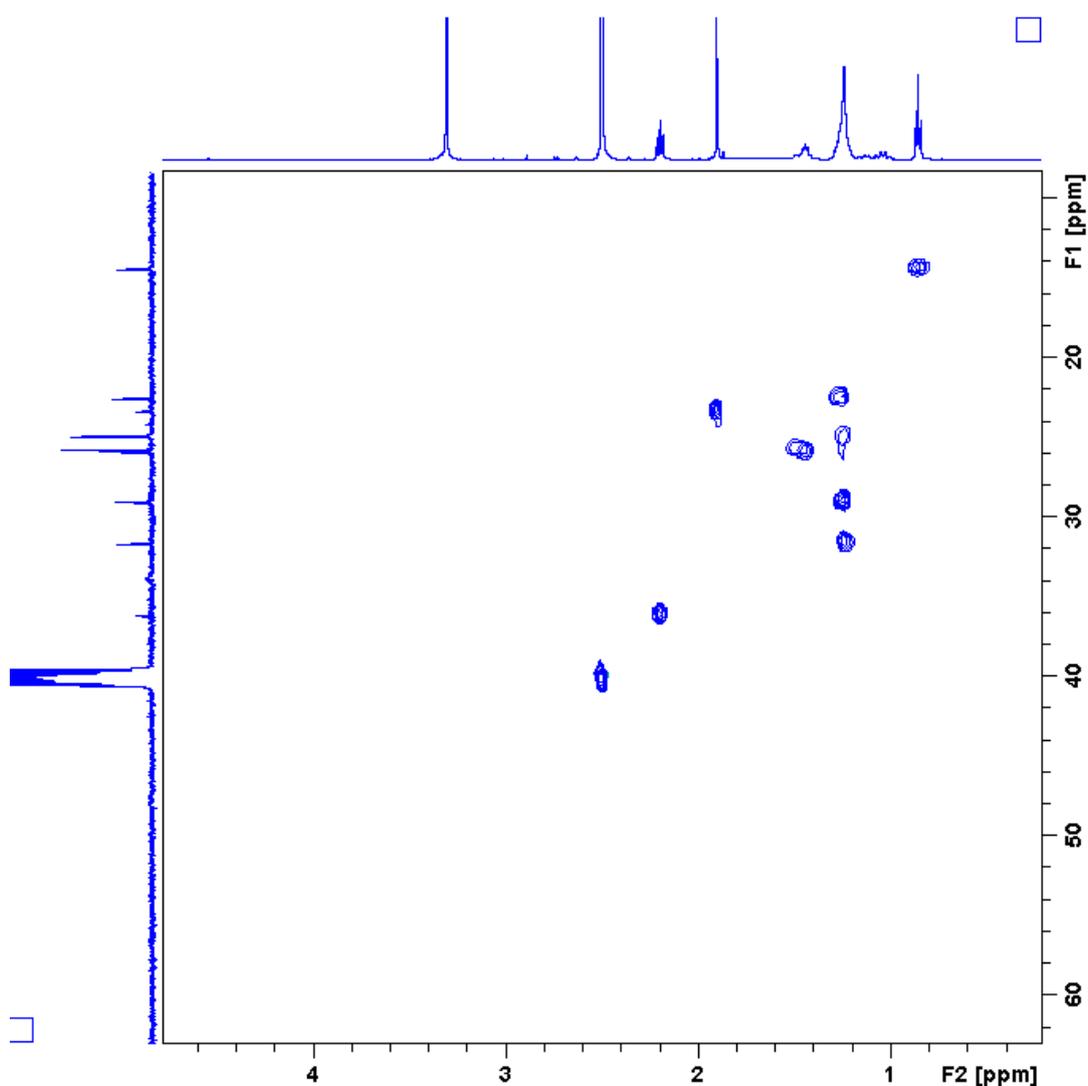


Figura 4.24: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 22

- Spettro ^{195}Pt NMR

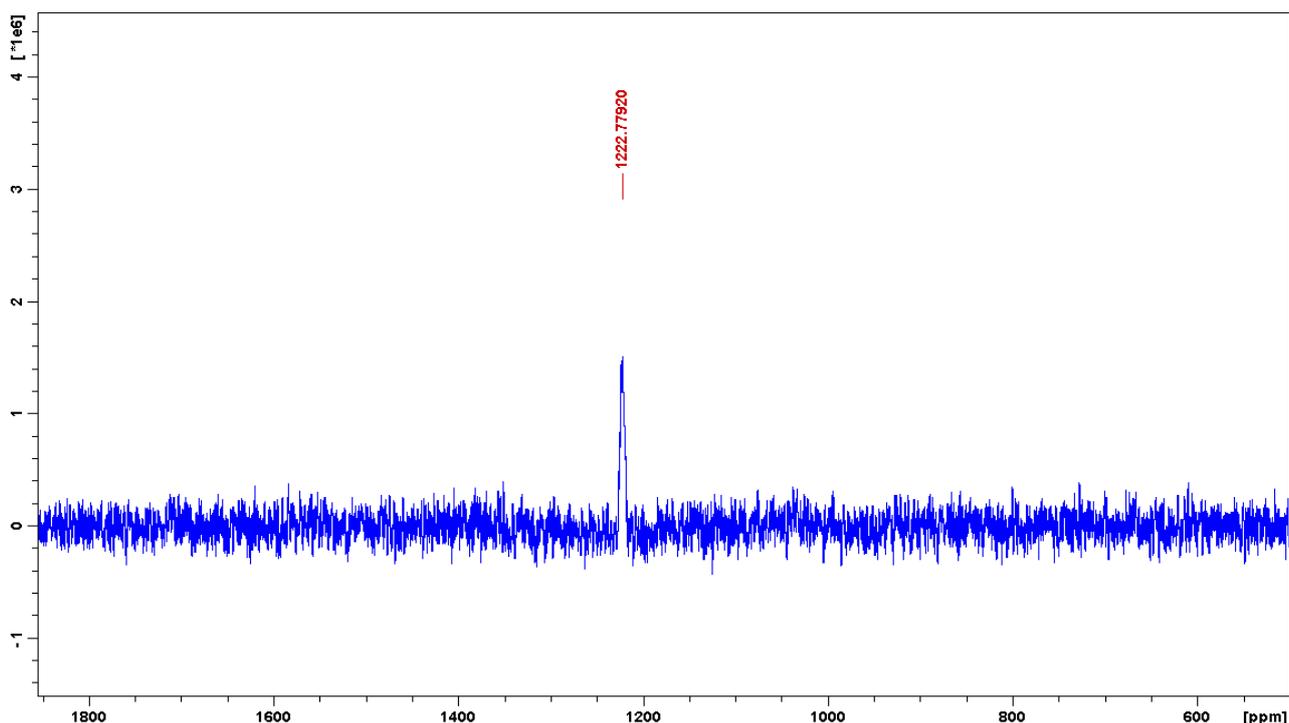


Figura 4.25: Spettro ^{195}Pt del complesso 22

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 1223 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* compatibile con complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

[Pt(acetato) $\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2(\text{succinato})$] (23)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e 30% MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 6.0 min relativo al complesso in esame, come confermato dallo spettro ESI-MS (fig. 4.26), dove è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo

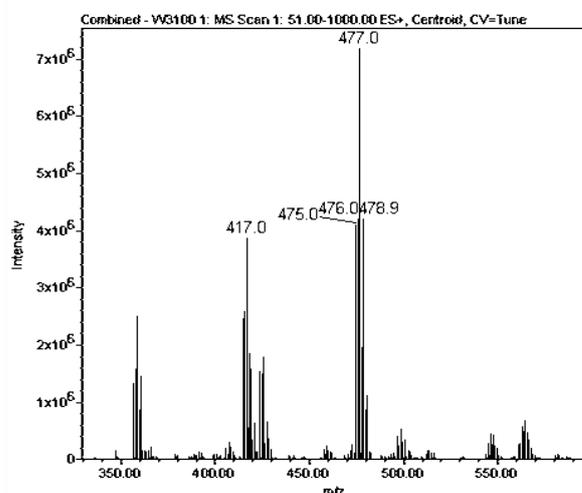
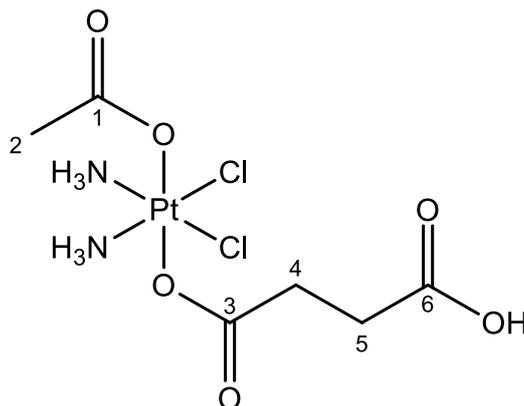


Figura 4.26: Spettro di massa del complesso 23

molecolare $[M-OH]^+$ con valore di $m/z = 477.0$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. Sono inoltre presenti altri picchi a $m/z = 359.0$ e 417.0 attribuibili agli ioni $[M-succinato]^+$ e $[M-acetato]^+$.

NMR

Gli spettri del complesso **23** sono stati registrati in d_6 -DMSO a 300K.



- Spettro 1H NMR

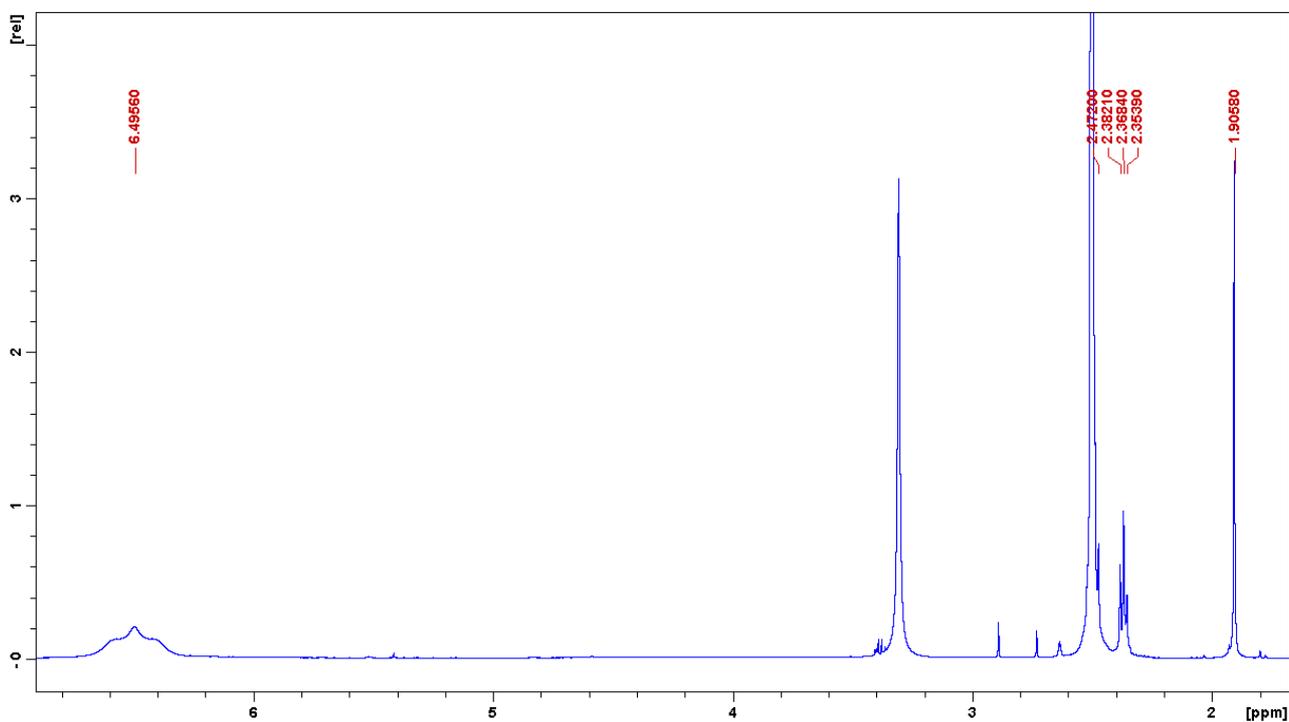


Figura 4.27: Spettro 1H del complesso 23

Lo spettro presenta tracce di DMF (2.73, 2.89 e 7.95 ppm).

Tabella 4.9: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 23

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	Integrazione
1.90	2	s	3
2.37	5	m	2
2.40-2.60	4	m	2
6.50	NH_3	m	6

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^1H è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).

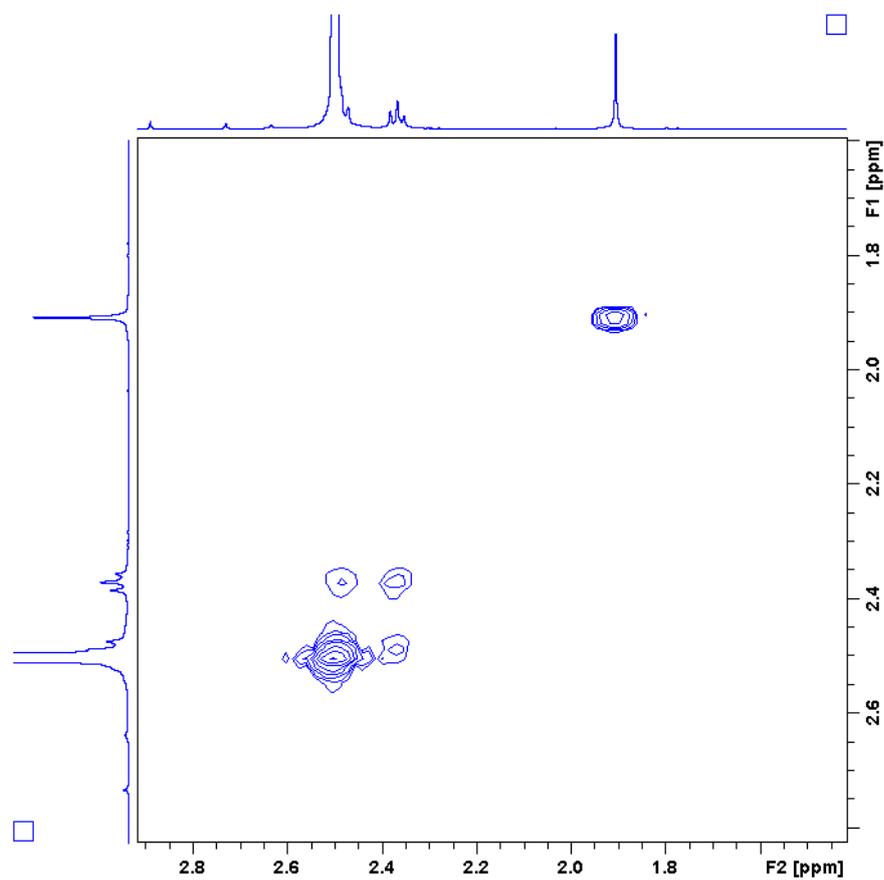


Figura 4.28: Spettro ^1H COSY del complesso 23

- Spettro ^{13}C NMR

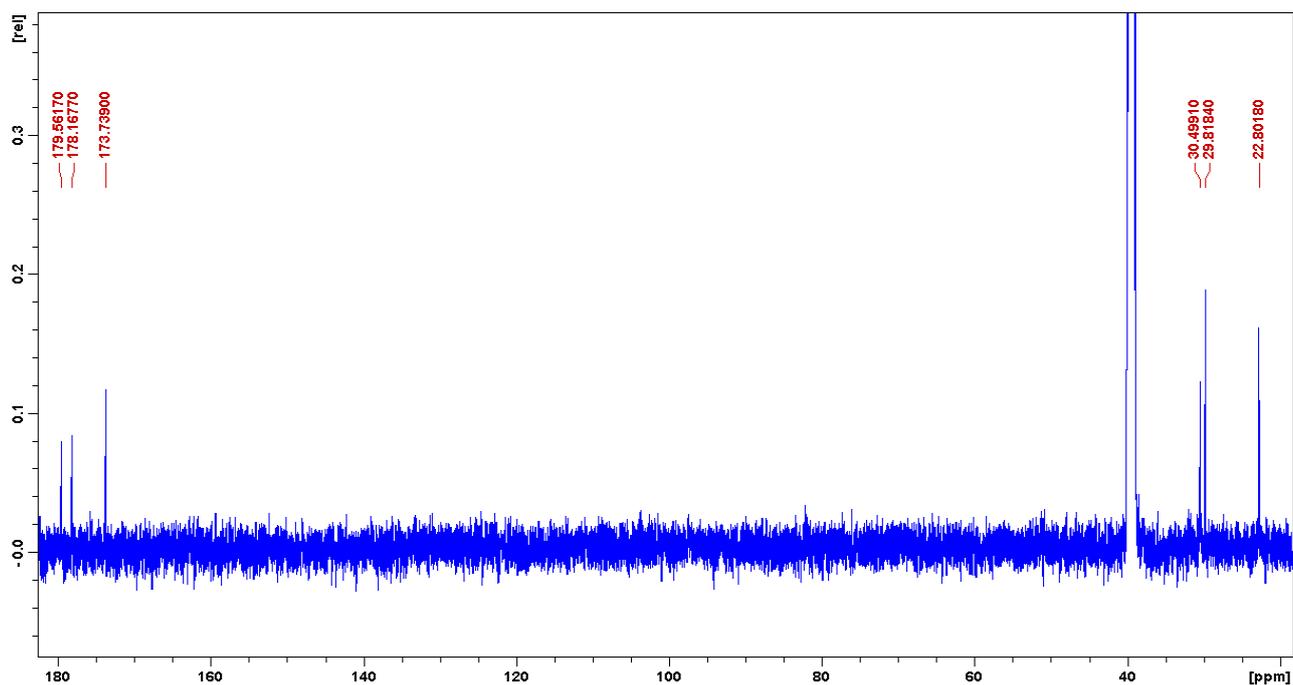


Figura 4.29: Spettro ^{13}C del complesso **23**

Tabella 4.10: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **23**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
22.8	2
29.8	5
30.5	4

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
173.8	6
178.2	1
179.6	3

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

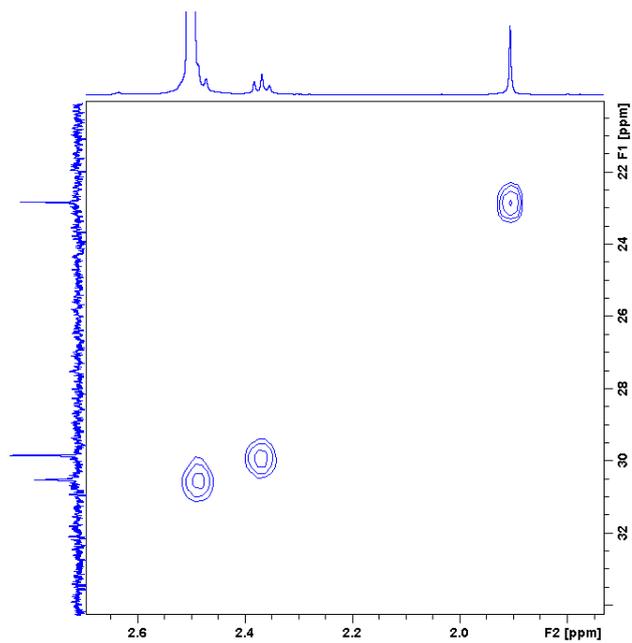


Figura 4.30: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 23

- Spettro ^{195}Pt NMR

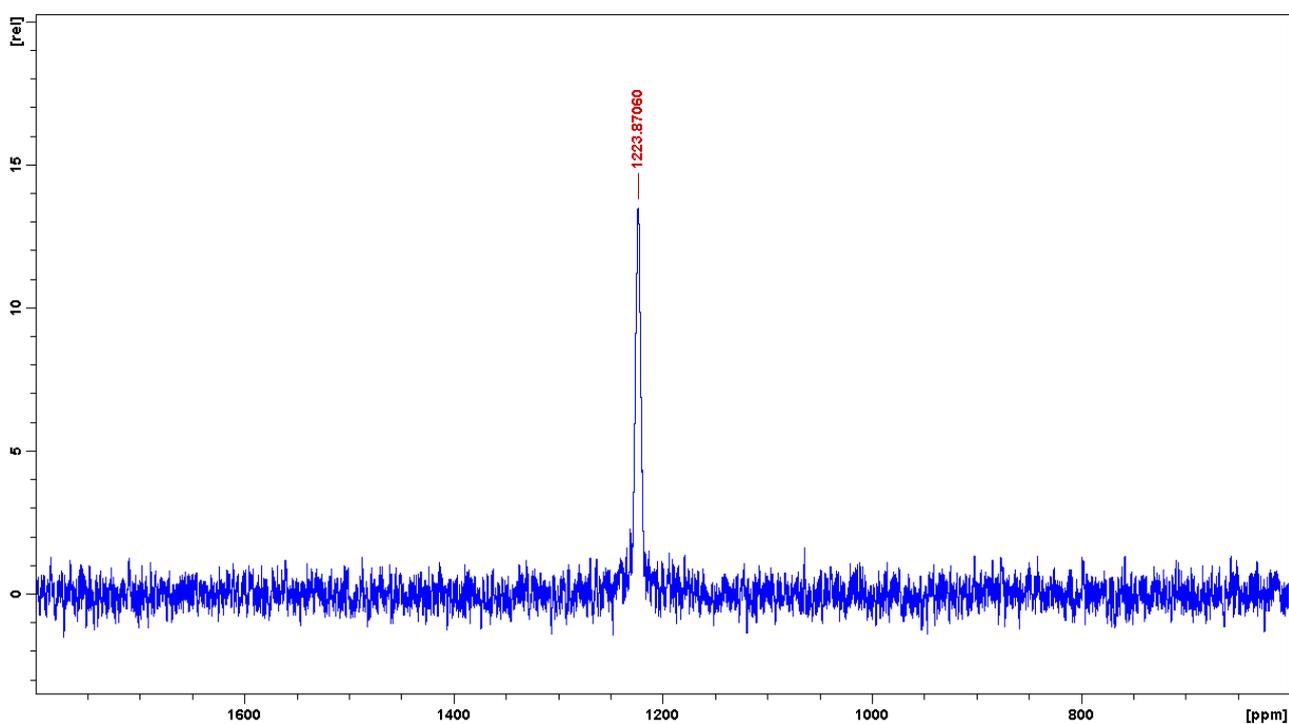


Figura 4.31: Spettro ^{195}Pt del complesso 23

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 1224 ppm, zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

[Pt(acetilamido)(acetato)Cl₂(NH₃)₂] (24)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e dal 50% di metanolo e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 5.4 min relativo al complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa (fig. 4.32), dove è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[M+H]^+$ con valore di $m/z = 418.3$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. Sono inoltre presenti i picchi con $m/z = 358.2$ e 367.3 attribuibili agli ioni $[M\text{-acetato}]^+$ e $[M\text{-acetato-Cl}^- + \text{formiato}]^+$.

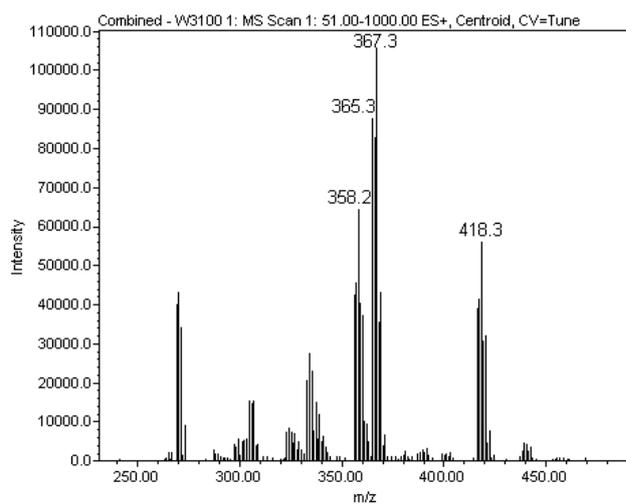
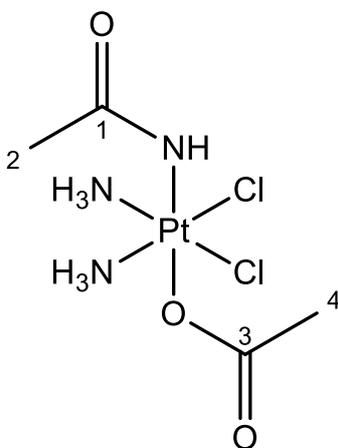


Figura 4.32: Spettro di massa del complesso 24

NMR

Gli spettri del complesso 24 sono stati registrati in d₆-DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

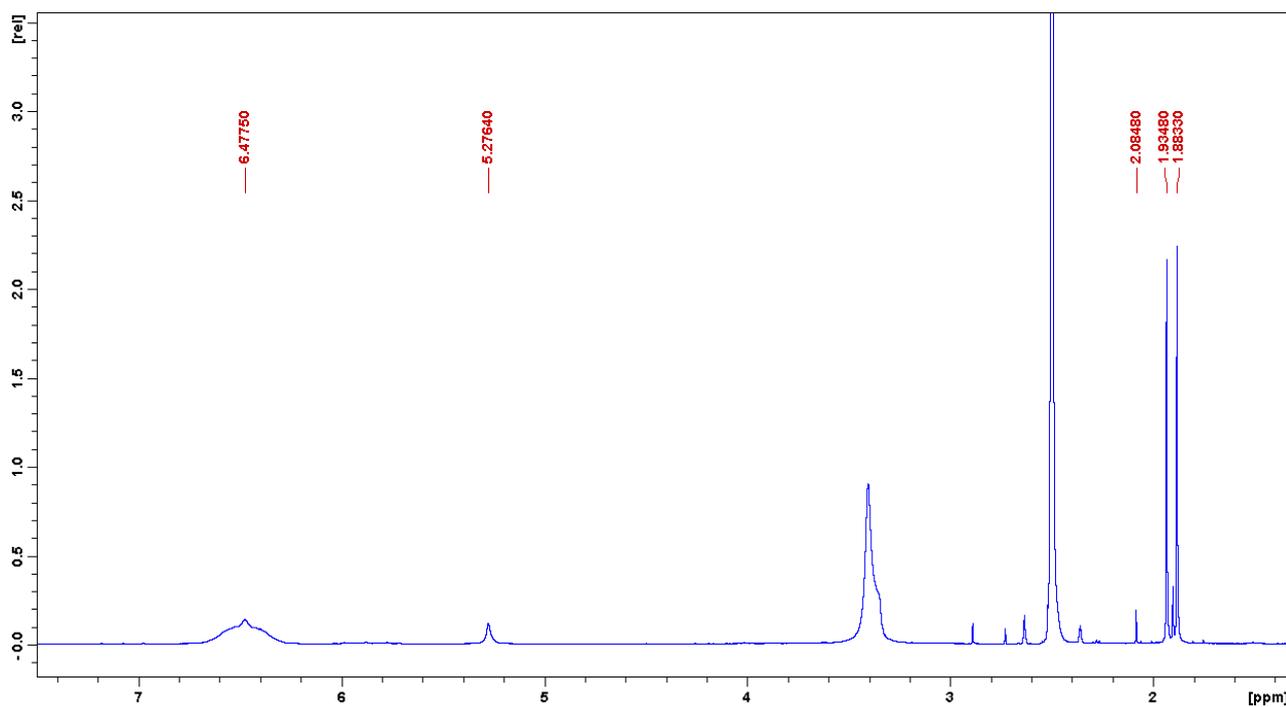


Figura 4.33: Spettro ^1H del complesso **24**

Tabella 4.11: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **24**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	Integrazione
1.88	4	s	3
1.93	2	s	3
5.28	NH	s	1
6.48	NH_3	m	6

- Spettro ^{13}C NMR

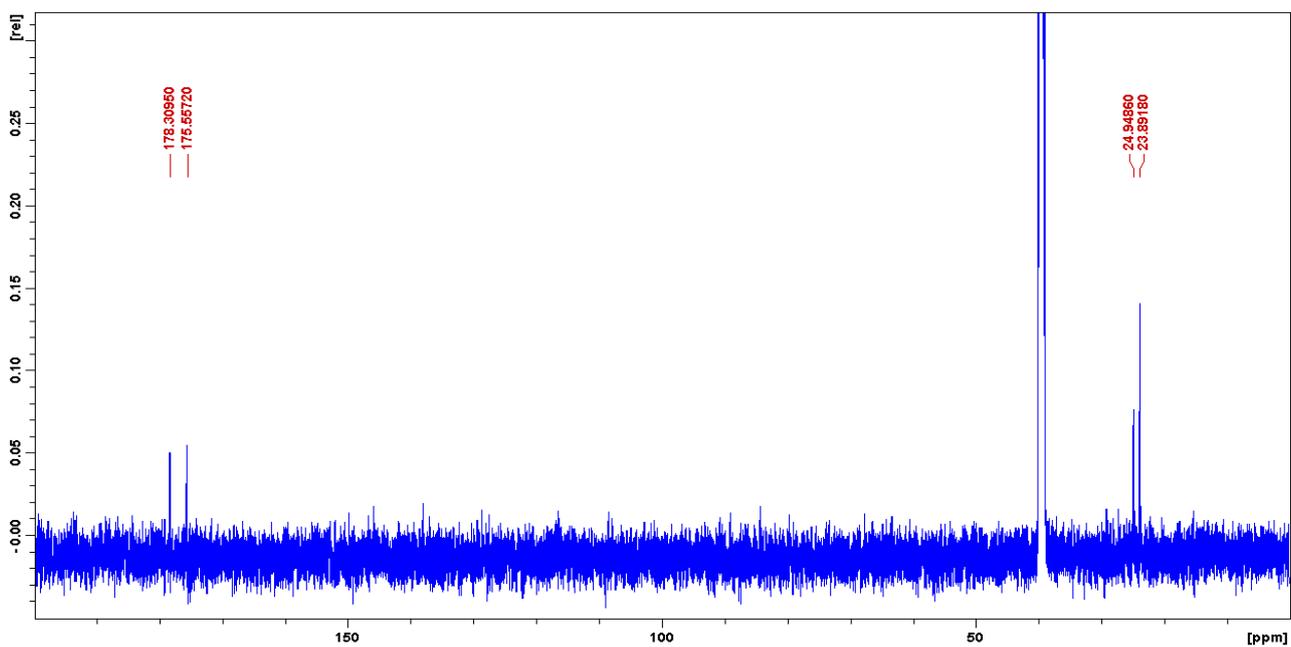


Figura 4.34: Spettro ^{13}C del complesso 24

Tabella 4.12: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 24

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
23.9	4
24.9	2

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
175.5	1
178.3	3

- Spettro ^{195}Pt NMR

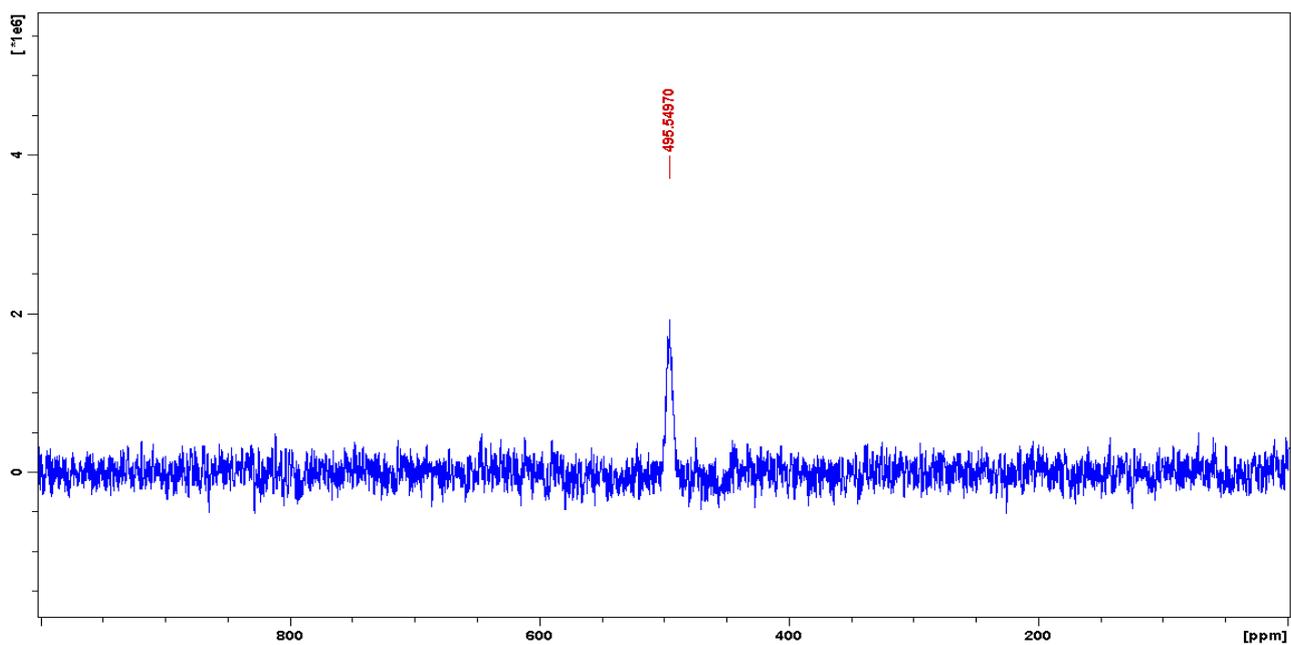


Figura 4.35: Spettro ^{195}Pt del complesso 24

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 495 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* compatibile con complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_3\text{Cl}_2\text{O}$.

[Pt(acetilamido)(butanoato)Cl₂(NH₃)₂] (25)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e 50% MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 6.8 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa (fig. 4.36).

Dallo spettro ESI-MS è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[\text{M}+\text{H}]^+$ con valore di $m/z = 446.3$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. Sono inoltre presenti altri picchi a $m/z = 358.2$ e 395.3 rispettivamente degli ioni $[\text{M}-\text{butanoato}]^+$ e $[\text{M}-\text{acetamidato}+\text{formiato}-\text{Cl}]^+$.

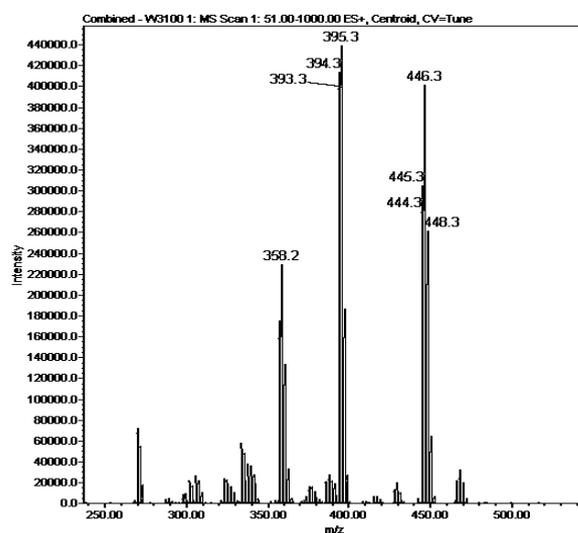
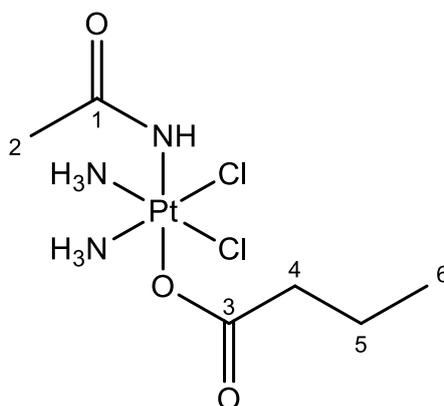


Figura 4.36: Spettro di massa del complesso 25

NMR

Gli spettri del complesso 25 sono stati registrati in d_6 -DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

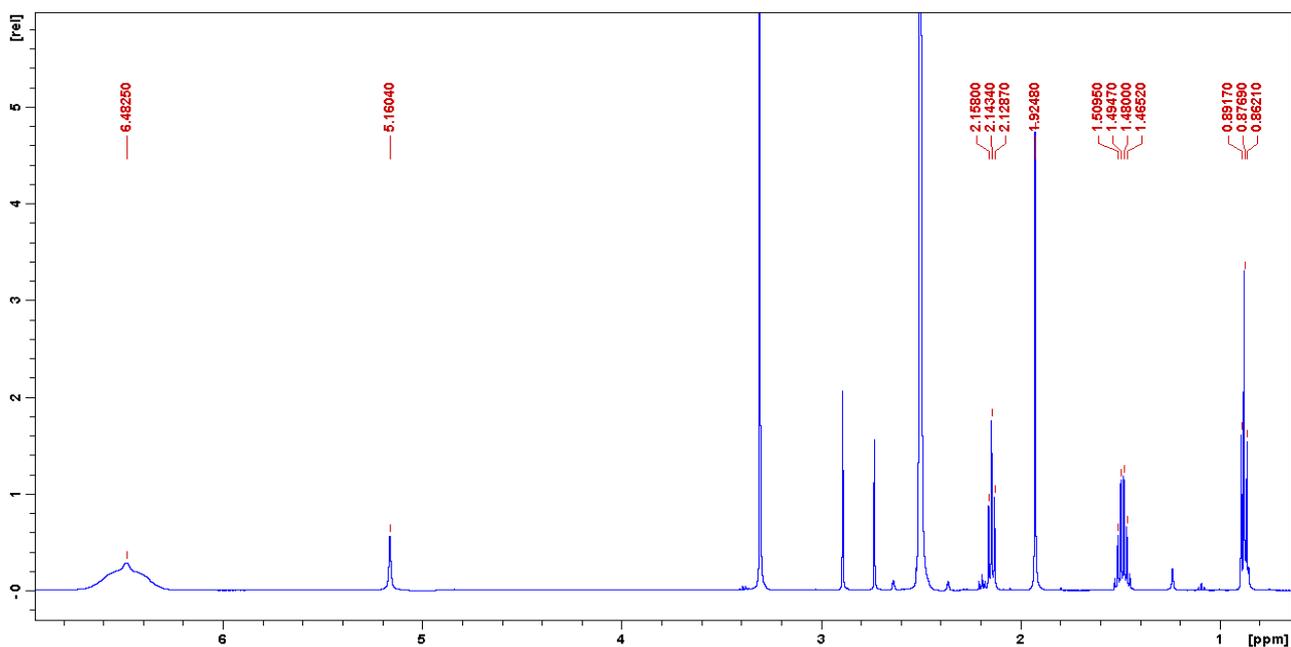


Figura 4.37: Spettro ^1H del complesso 25

Tabella 4.13: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 25

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
0.88	6	t	7.4	3
1.49	5	q	7.4	2
1.92	2	s		3
2.14	4	t	7.4	2
5.16	NH	s		1
6.48	NH ₃	m		6

Lo spettro presenta tracce di DMF (2.73, 2.89 e 7.95 ppm).

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^1H è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).

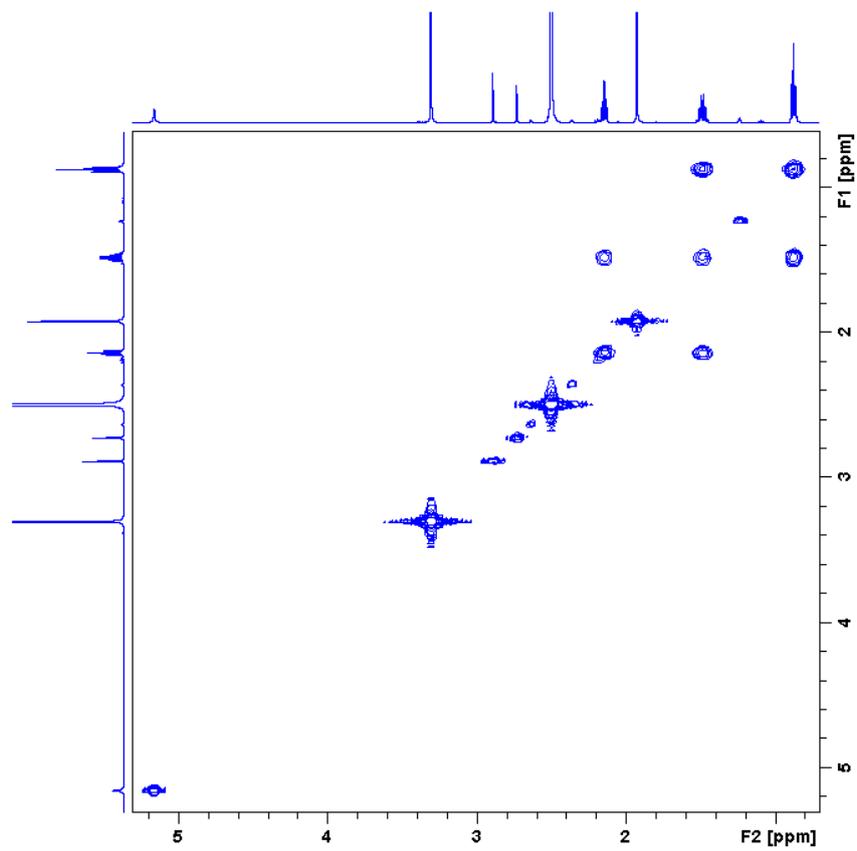


Figura 4.38: Spettro ^1H COSY del complesso 25

- Spettro ^{13}C NMR

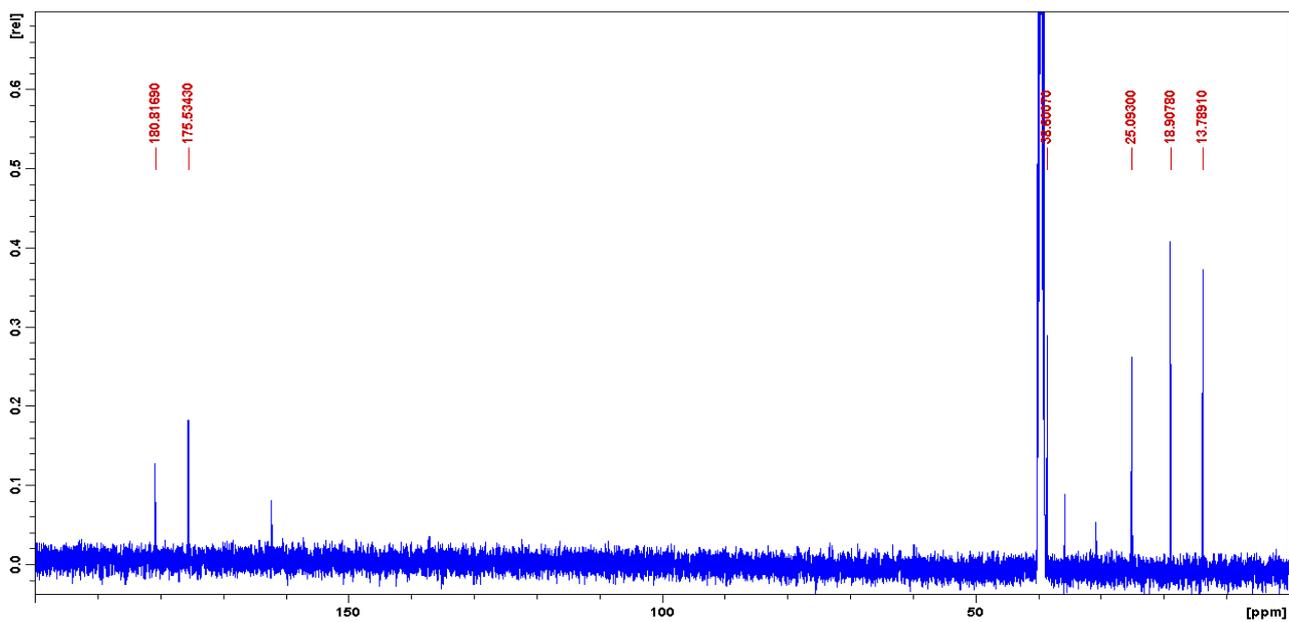


Figura 4.39: Spettro ^{13}C del complesso 25

Tabella 4.14: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 25

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
13.8	6	38.6	4
18.9	5	175.5	1
25.1	2	180.8	3

Lo spettro presenta tracce di DMF (30.73, 35.73 e 162.29 ppm).

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

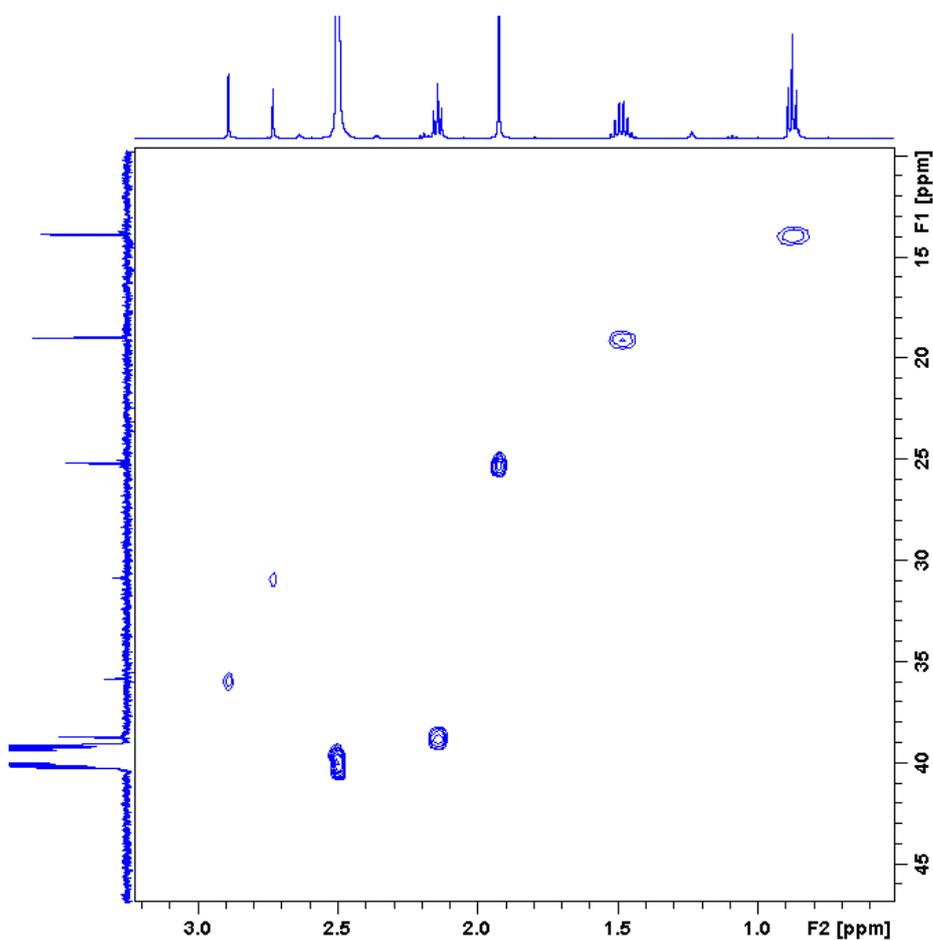


Figura 4.40: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 25

- Spettro ^{195}Pt NMR

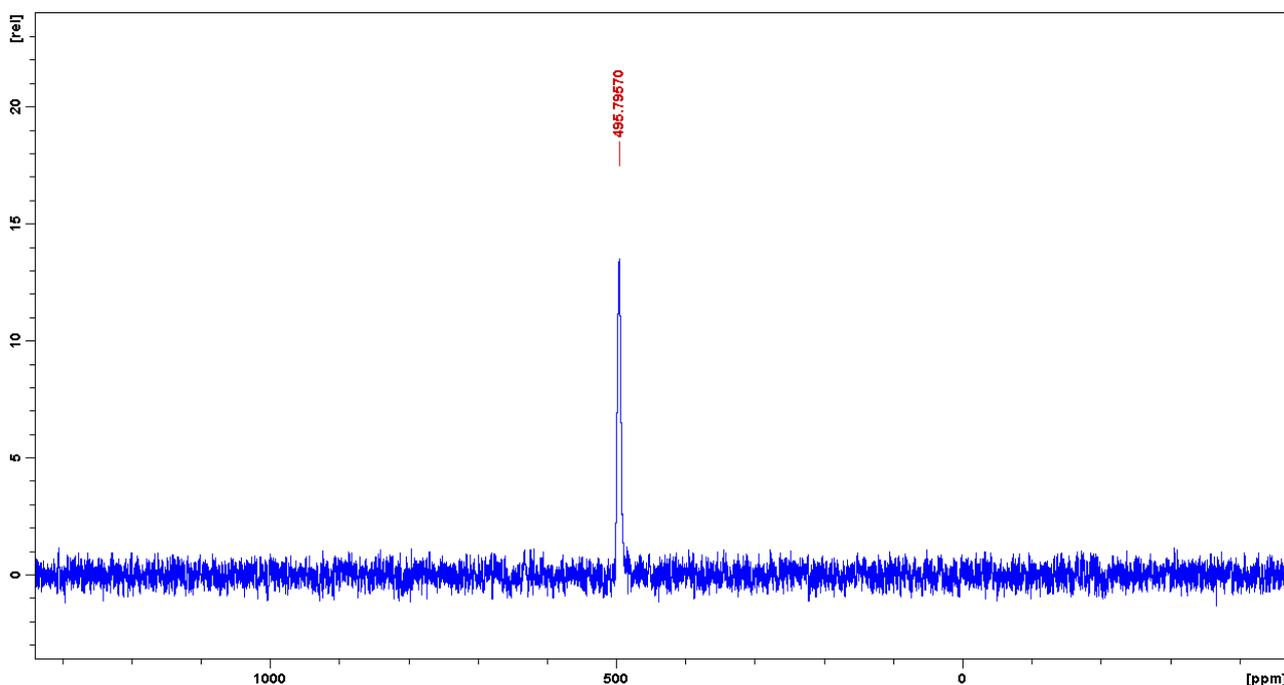


Figura 4.41: Spettro ^{195}Pt del complesso 25

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 495 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_3\text{Cl}_2\text{O}$.

[Pt(acetilamido)Cl₂(esanoato)(NH₃)₂] (26)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e dal 50% di metanolo e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 14.4 min relativo al complesso in esame, come confermato dallo spettro ESI-MS (fig. 4.42), dove è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[\text{M}+\text{H}]^+$ con valore di

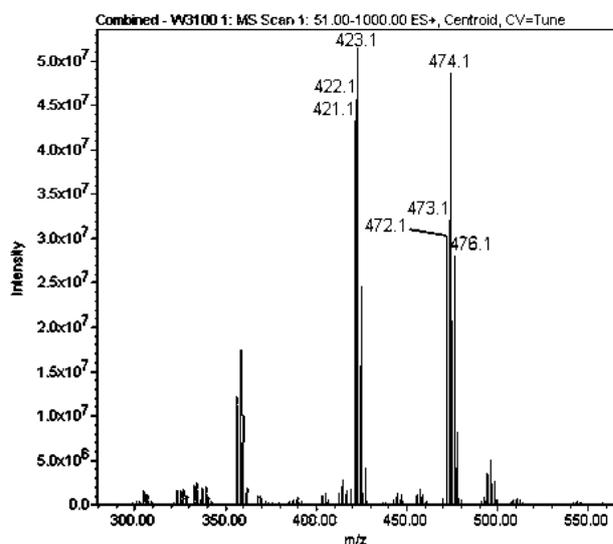
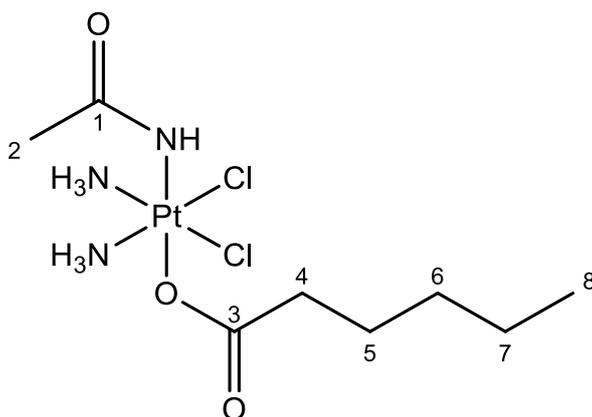


Figura 4.42: Spettro di massa del complesso 26

$m/z = 474.1$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. Sono inoltre presenti altri picchi a $m/z = 358.2$ e 423.1 rispettivamente degli ioni $[M\text{-esanoato}]^+$ e $[M\text{-acetamidato+formiato-Cl}]^+$.

NMR

Gli spettri del complesso **26** sono stati registrati in d_6 -DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

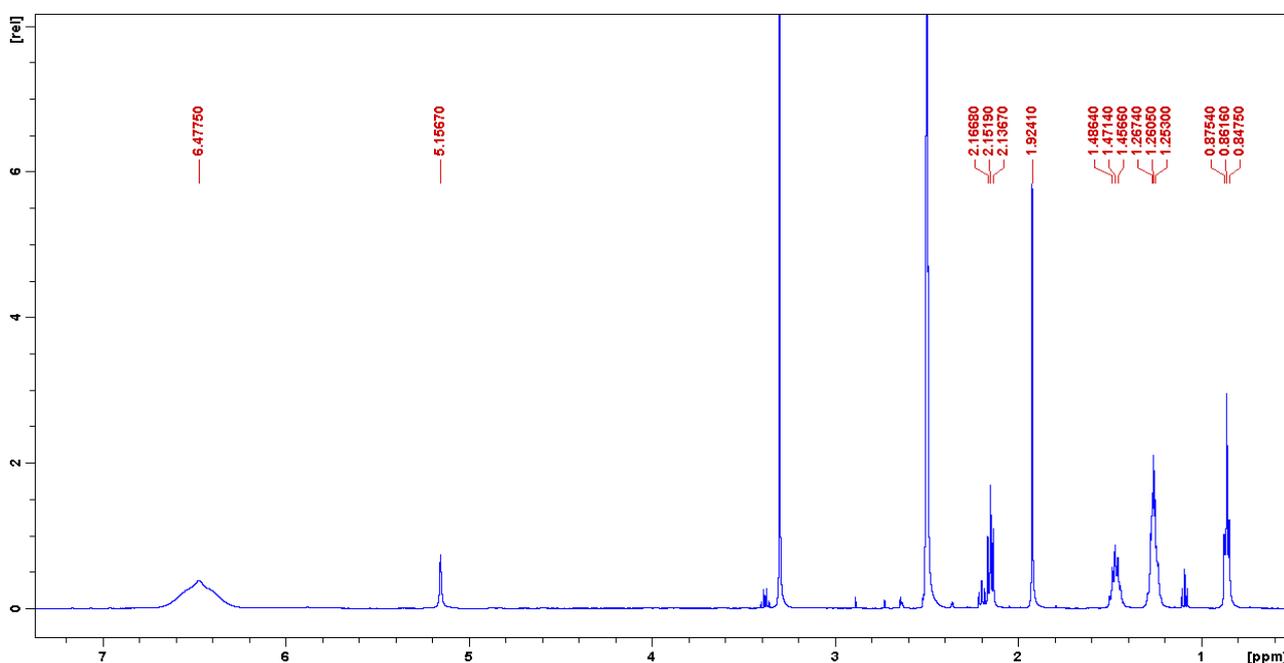


Figura 4.43: Spettro ^1H del complesso **26**

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (1.09 e 3.38 ppm).

Tabella 4.15: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **26**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
0.86	8	t	6.9	3
1.26	6-7	m		4
1.47	5	m		2
1.92	2	s		3
2.15	4	t	7.4	2
5.16	NH	s		1
6.52	NH ₃	m		6

L'attribuzione dei segnali è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).

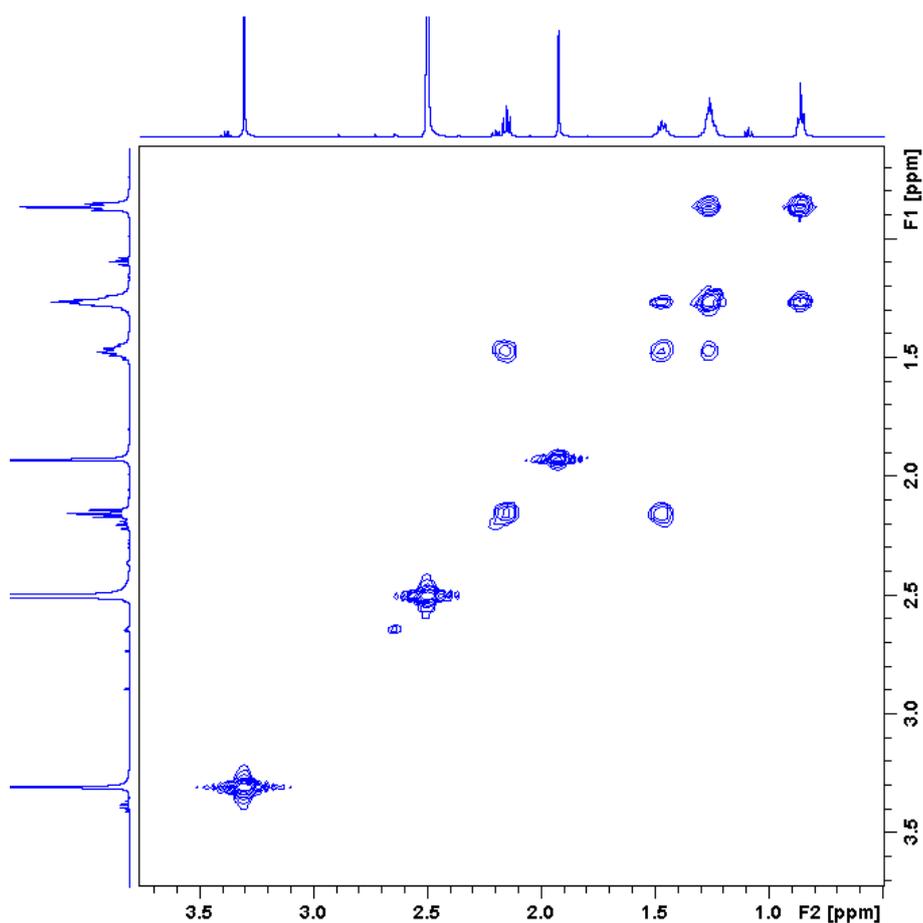


Figura 4.44: Spettro ^1H COSY del complesso **26**

- Spettro ^{13}C NMR

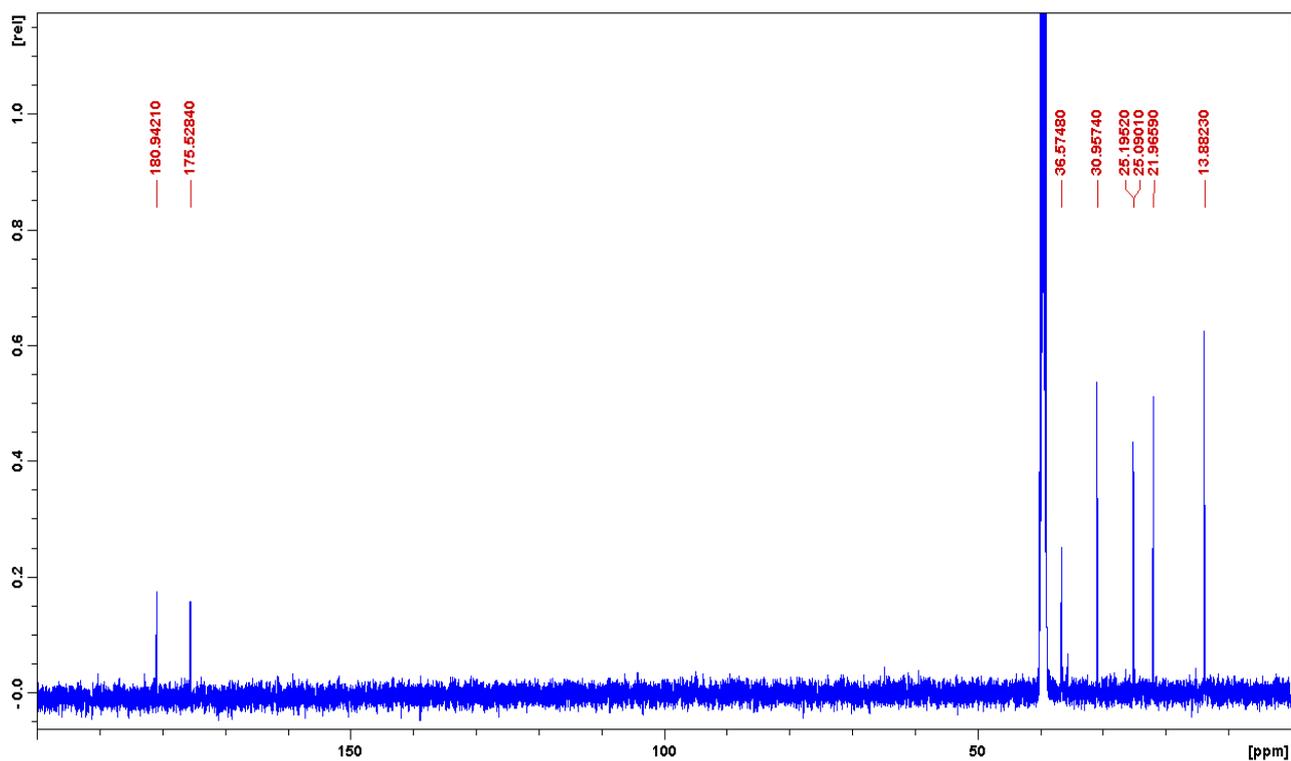


Figura 4.45: Spettro ^{13}C del complesso 26

Tabella 4.16: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 26

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
13.9	8
22.0	7
25.1	2
25.2	5

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
31.0	6
36.6	4
175.5	1
180.9	3

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

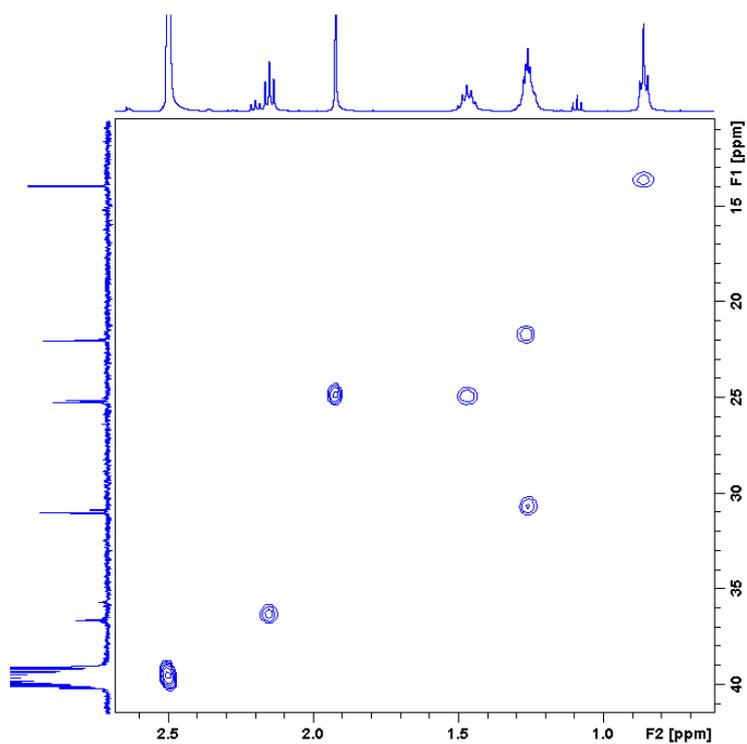


Figura 4.46: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 26

- Spettro ^{195}Pt NMR

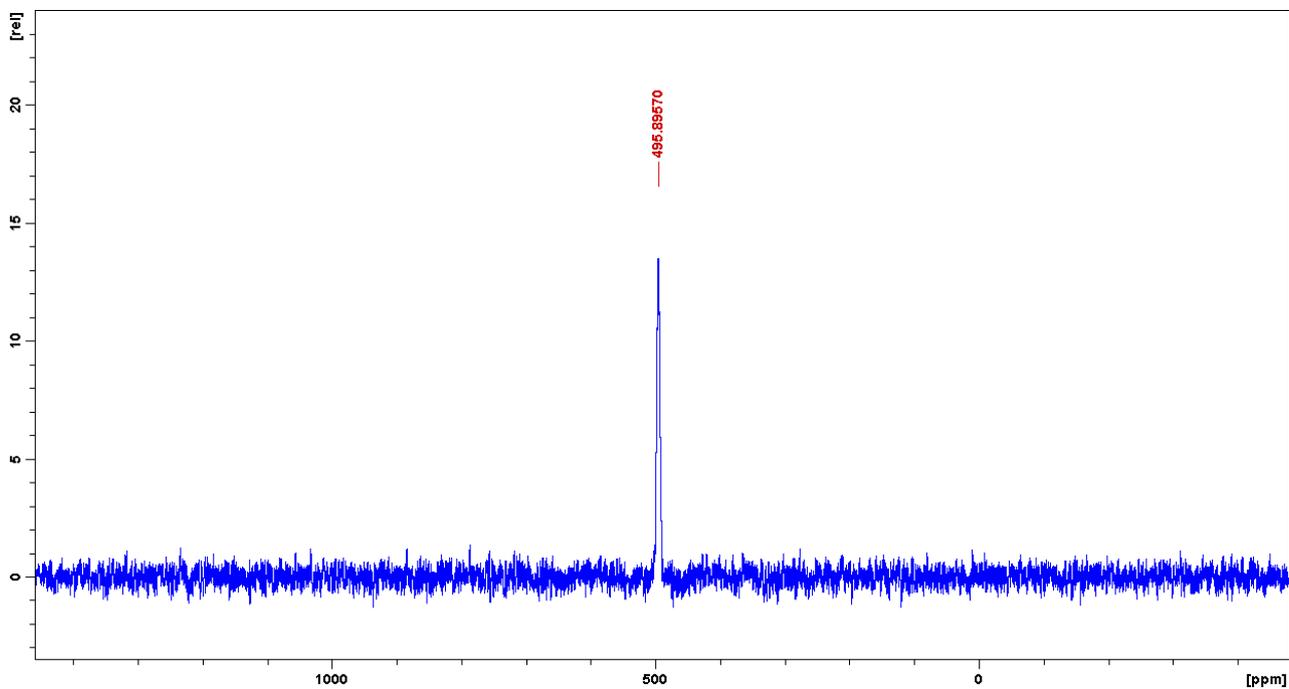


Figura 4.47: Spettro ^{195}Pt del complesso 26

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 496 ppm, zona di *chemical shift* compatibile con complessi di Pt^{II} con intorno chimico $\text{PtN}_3\text{Cl}_2\text{O}$.

[Pt(acetilamido)Cl₂(NH₃)₂(ottanoato)] (27)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e 50% MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 56.8 min relativo al complesso in esame e dallo spettro ESI-MS (fig. 4.48) è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[M+H]^+$ con valore di $m/z = 502.2$, il quale mostra il *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. Sono inoltre presenti altri picchi a $m/z = 358.3$ e 451.2 rispettivamente degli ioni $[M\text{-ottanoato}]^+$ e $[M\text{-acetamidato+formiato-Cl}]^+$.

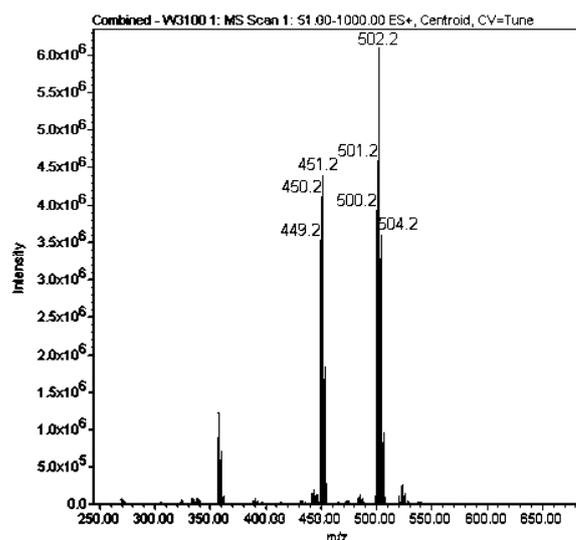
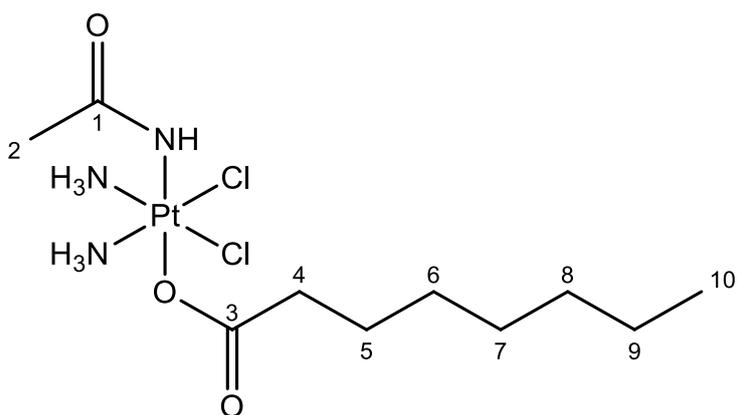


Figura 4.48: Spettro di massa del complesso 27

NMR

Gli spettri del complesso 27 sono stati registrati in d₆-DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

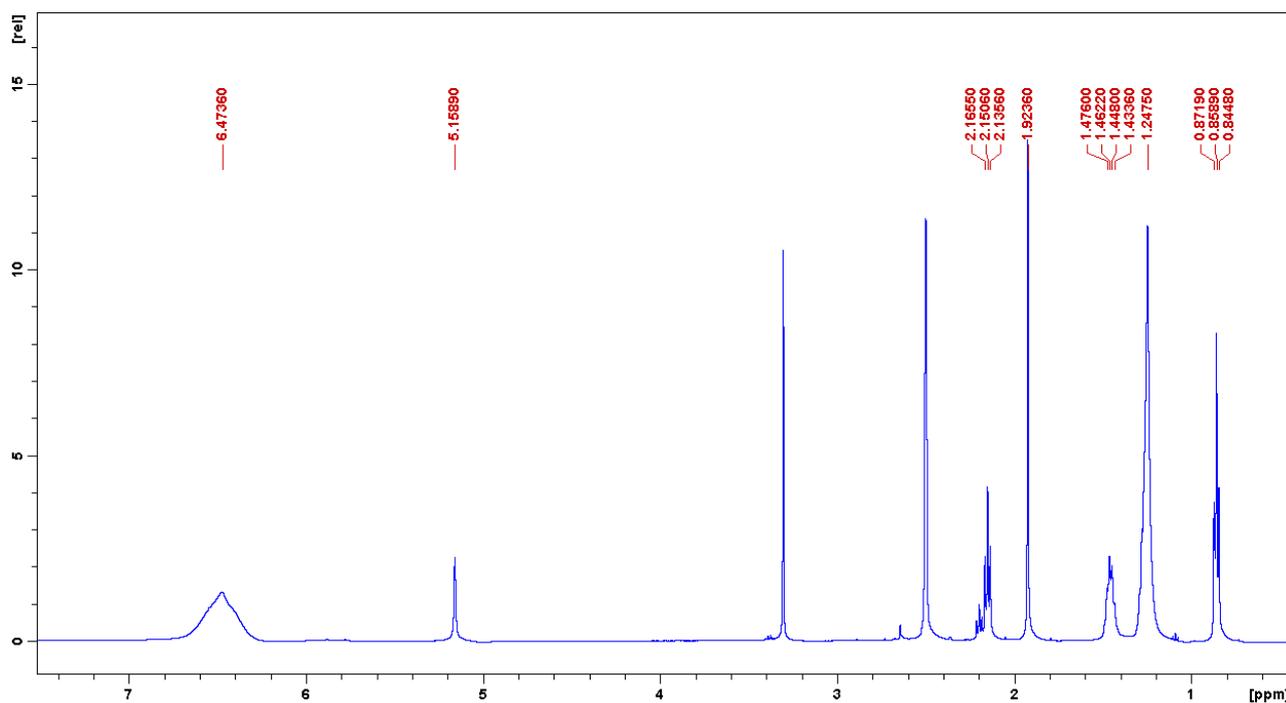


Figura 4.49: Spettro ^1H del complesso 27

Tabella 4.17: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 27

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
0.86	10	t	6.5	3
1.25	6-7-8-9	m		8
1.46	5	m		2
1.92	2	s		3
2.15	4	t	7.5	2
5.16	NH	s		1
6.47	NH_3	m		6

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^1H è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).

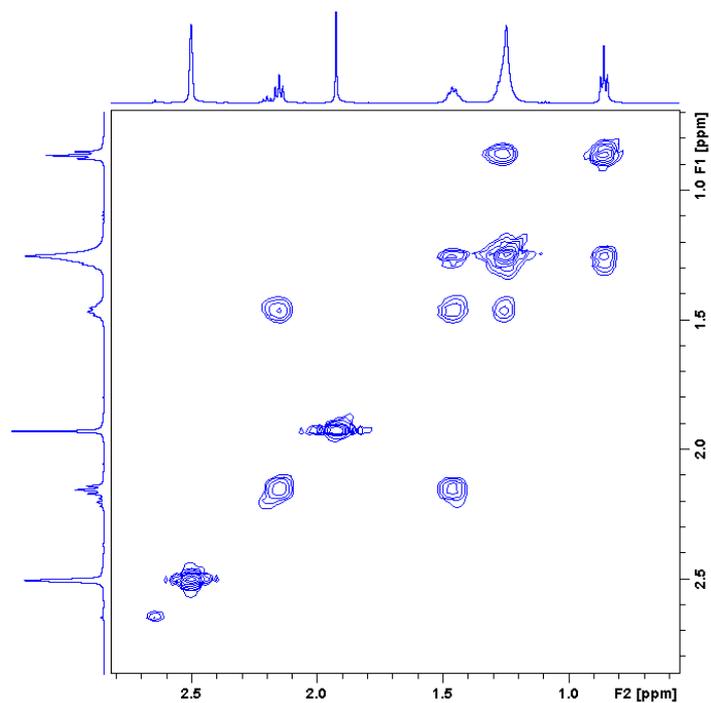


Figura 4.50: Spettro ^1H COSY del complesso 27

- Spettro ^{13}C NMR

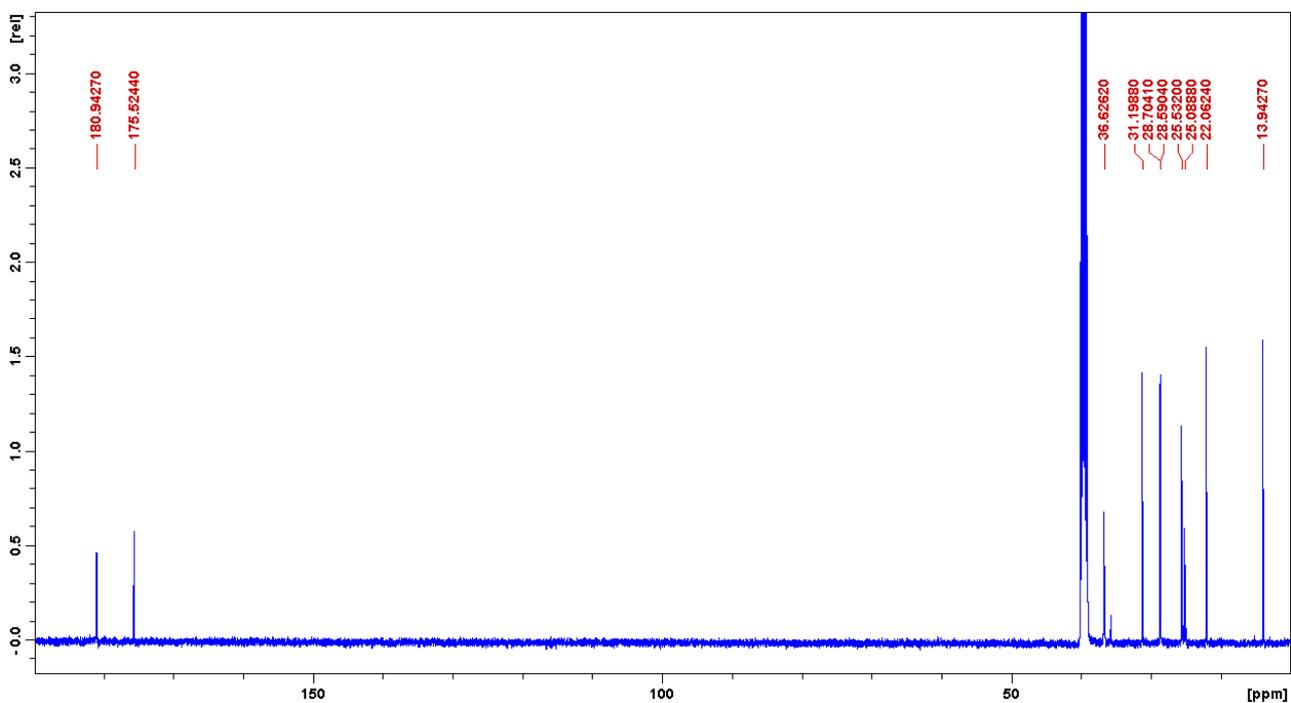


Figura 4.51: Spettro ^{13}C del complesso 27

Tabella 4.18: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 27

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
13.9	10
22.1	6
25.1	2
25.5	9
28.6	7-8
28.7	
31.2	5
36.6	4
175.5	1
180.9	3

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

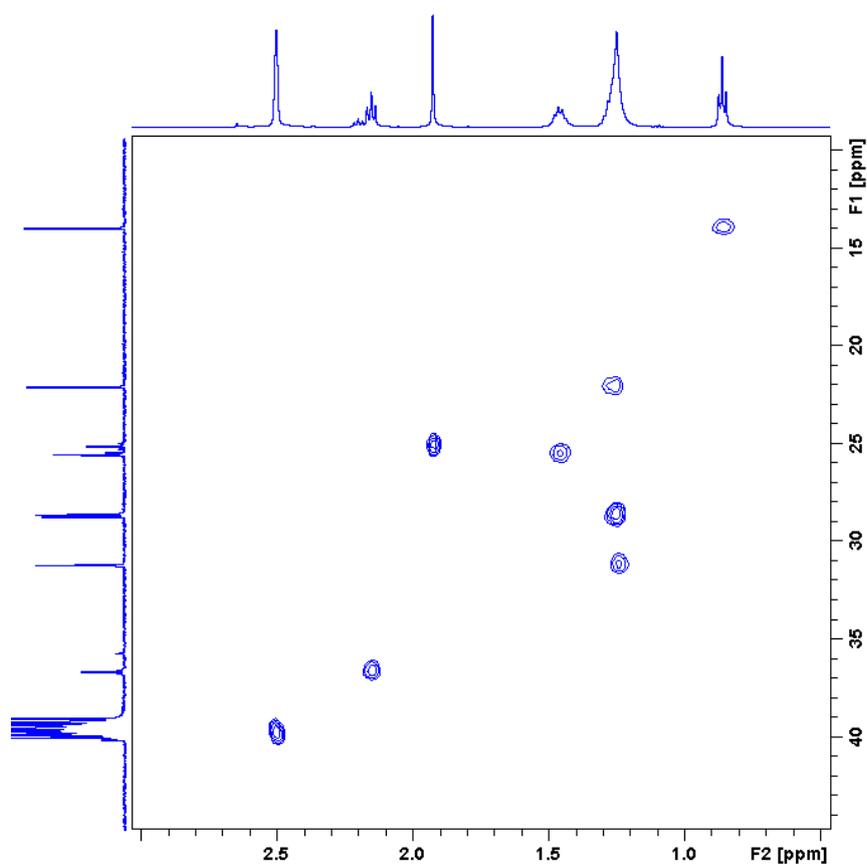


Figura 4.52: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 27

- Spettro ^{195}Pt NMR

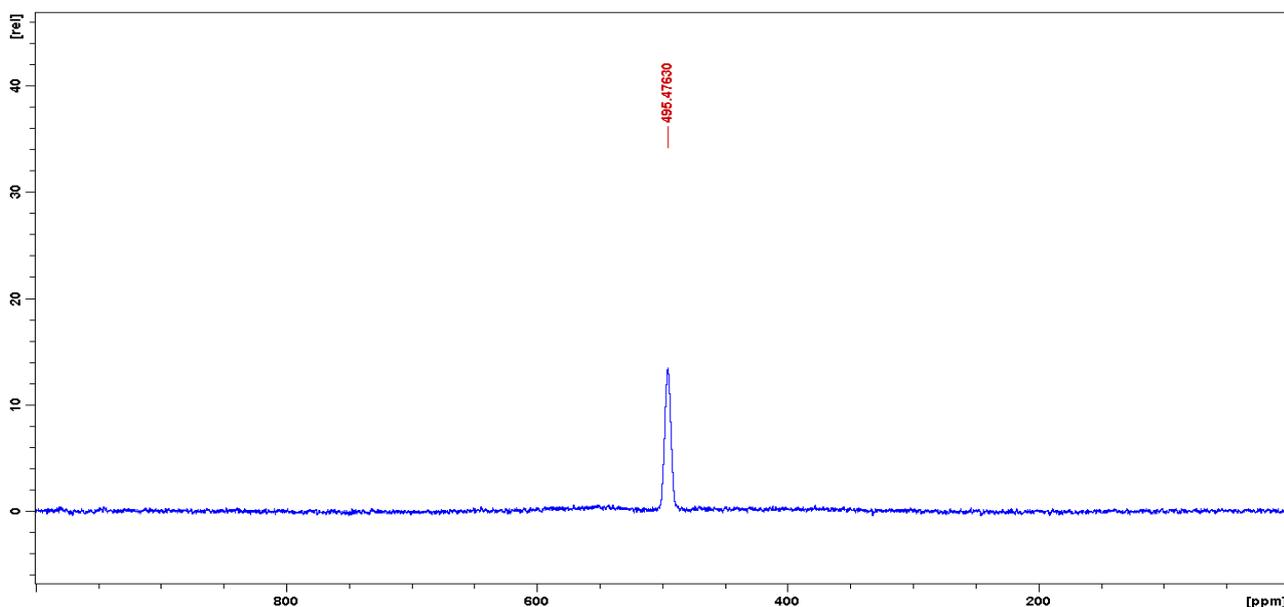


Figura 4.53: Spettro ^{195}Pt del complesso 27

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 496 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* compatibile con complessi di Pt^{II} con intorno chimico $\text{PtN}_3\text{Cl}_2\text{O}$.

[Pt(acetilamido)Cl₂(NH₃)₂(succinato)] (28)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecnica NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e 50% MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 5.5 min relativo al complesso in esame. Dallo spettro ESI-MS (fig. 4.54) è possibile osservare il picco relativo allo ione pseudo molecolare $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ con valore di $m/z = 476.3$ ed un picco a $m/z = 358.3$ relativo alla specie $[\text{M}-\text{succinato}]^+$.

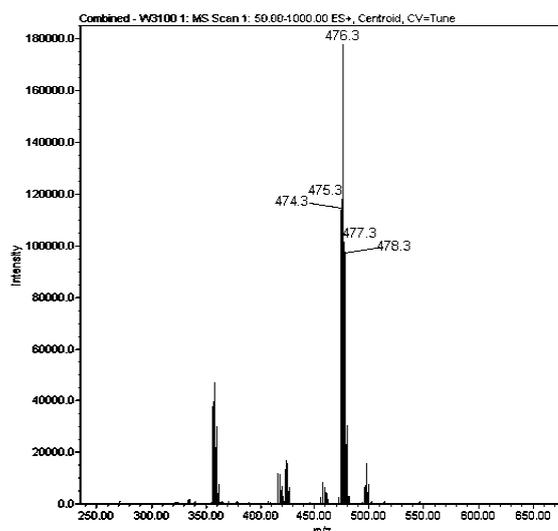
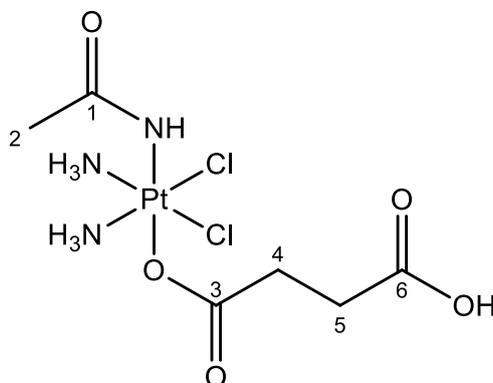


Figura 4.54: Spettro di massa del complesso 28

NMR

Gli spettri del complesso **28** sono stati registrati in d6-DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

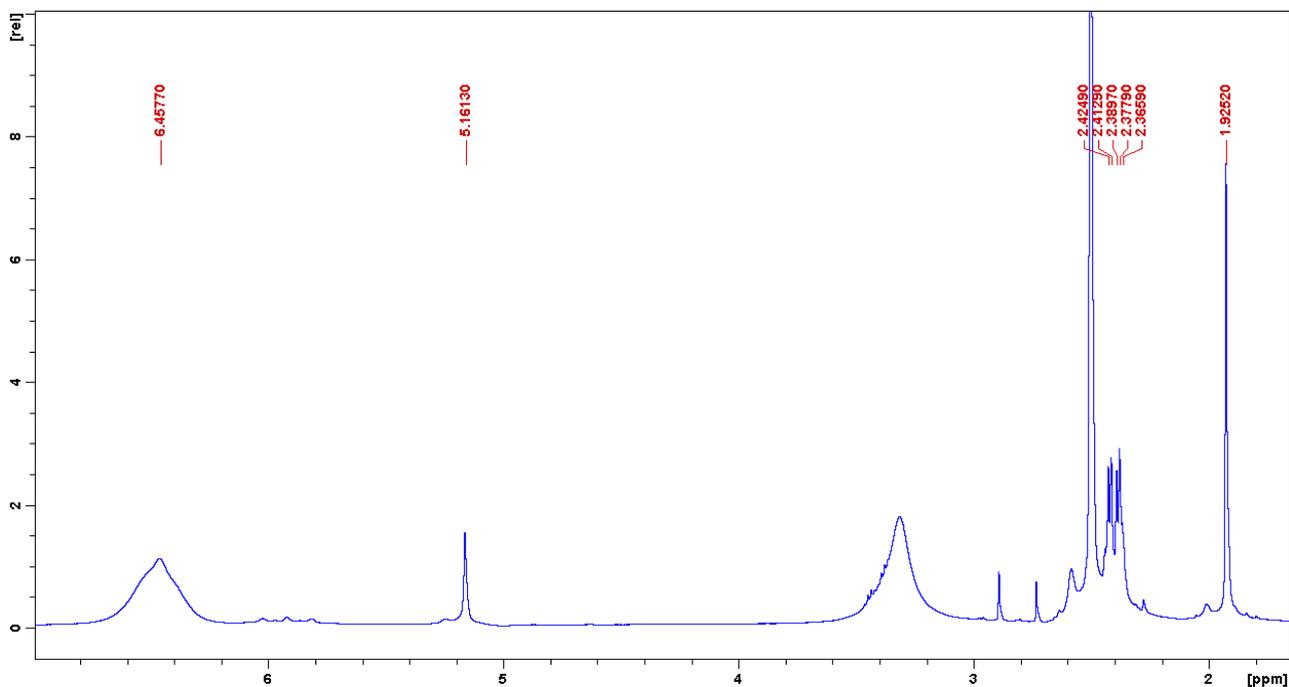


Figura 4.55: Spettro ^1H del complesso **28**

Lo spettro presenta tracce di DMF (2.73, 2.89 e 7.95 ppm).

Tabella 4.19: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **28**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	Integrazione
1.93	2	s	3
2.38	5	m	2
2.41	4	m	2
5.16	NH	s	1
6.46	NH ₃	m	6

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^1H è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy) (fig. 4.56). In particolare, in alto a sinistra si può vedere l'accoppiamento (basso) del segnale a 5.16 dell'NH con il segnale a 1.93 del CH_3 acetimidico.

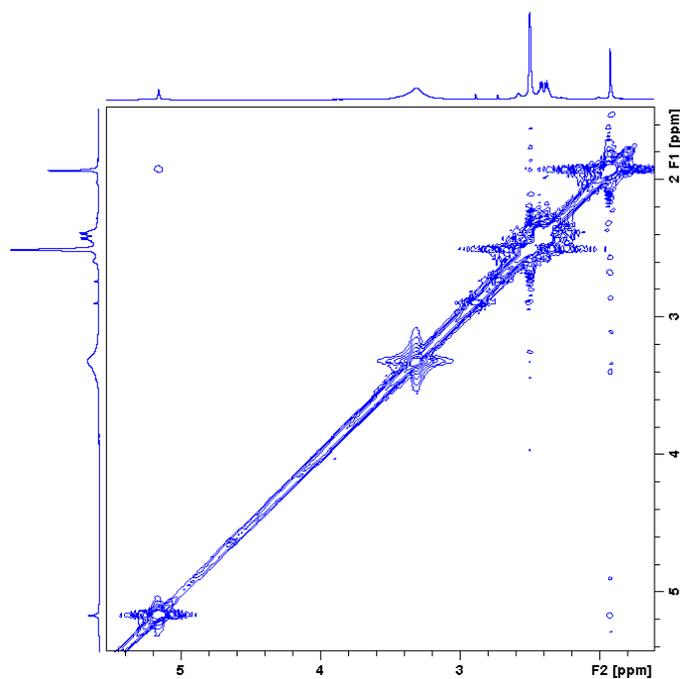


Figura 4.56: Spettro ^1H COSY del complesso 28

- Spettro ^{13}C NMR

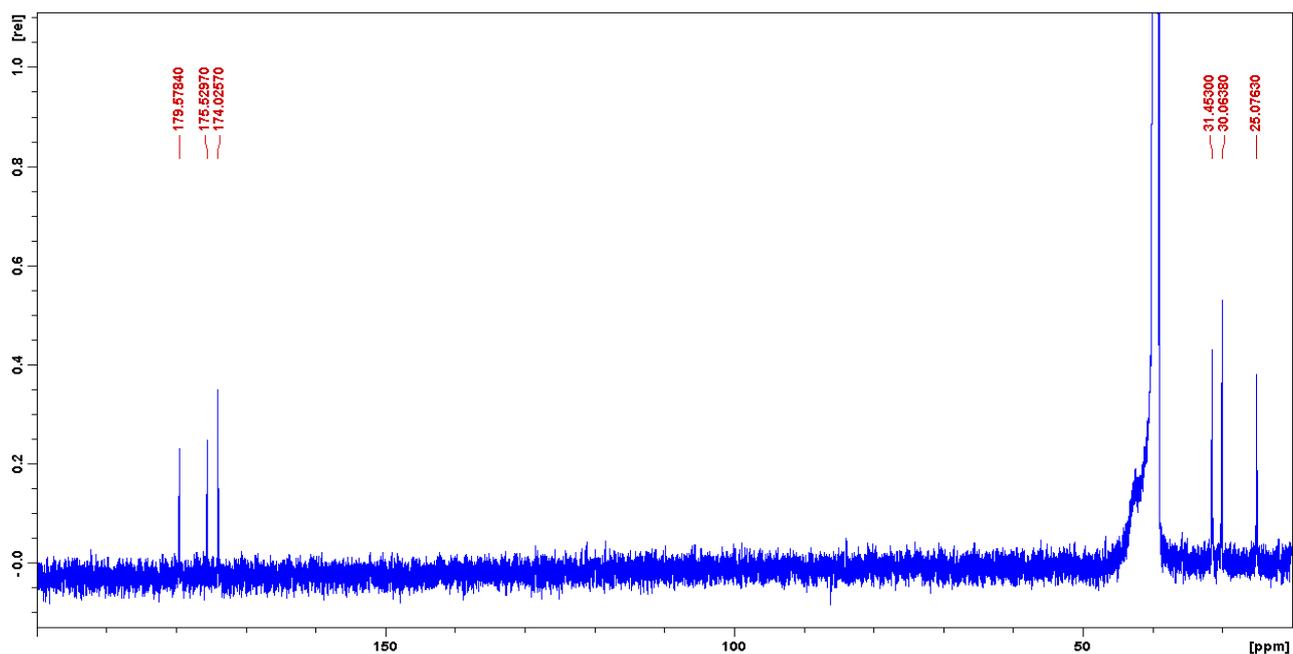


Figura 4.57: Spettro ^{13}C del complesso 28

Tabella 4.20: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 28

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
25.1	2
30.1	5
31.5	4
174.0	6
175.5	1
179.6	3

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

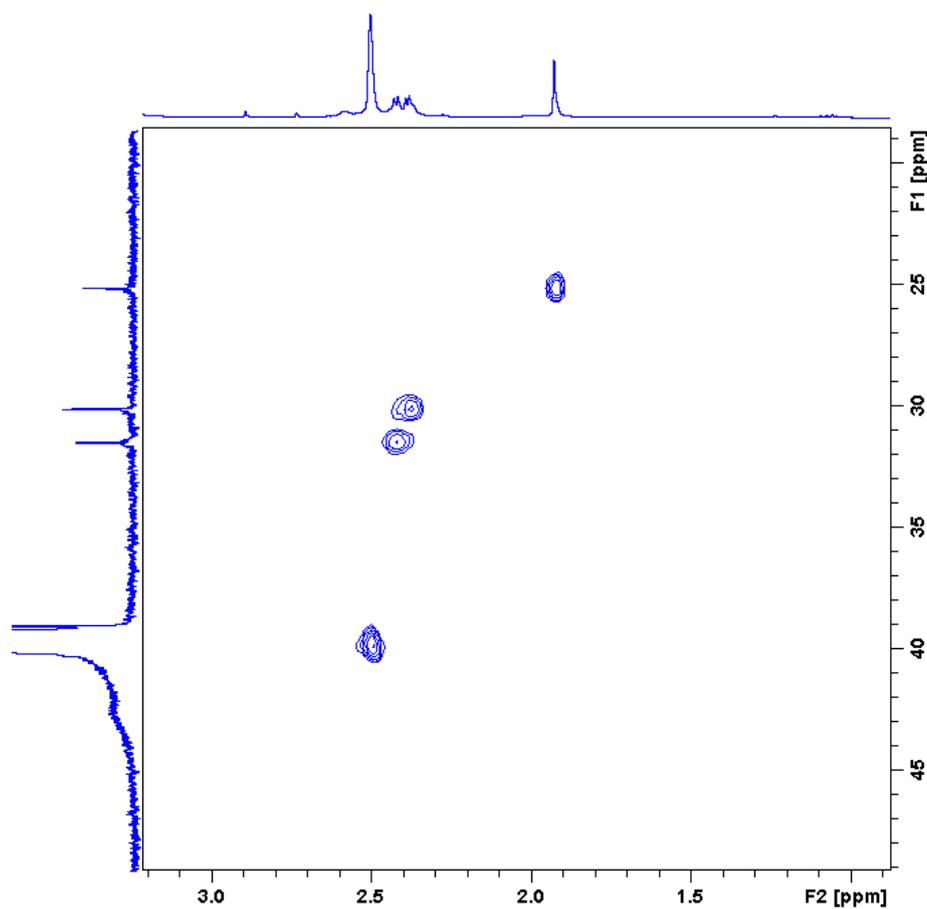


Figura 4.58: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 28

- Spettro ^{195}Pt NMR

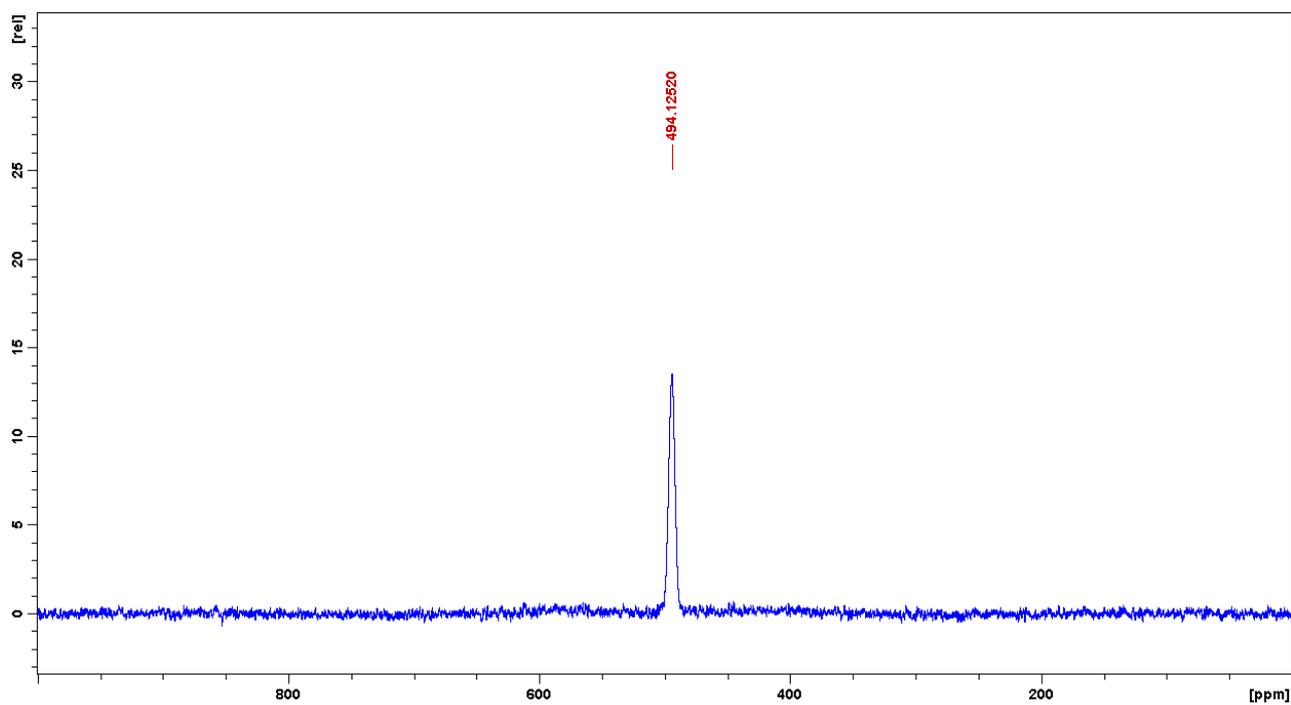


Figura 4.59: Spettro ^{195}Pt del complesso **28**

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 494 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_3\text{Cl}_2\text{O}$.

4.2 Bibliografia

1. P. Gramatica, E. Papa, M. Luini, E. Monti, M.B. Gariboldi, M. Ravera, E. Gabano, L. Gaviglio, D. Osella, *Antiproliferative Pt(IV) complexes: synthesis, biological activity, and quantitative structure–activity relationship modeling*, JBIC, 2010, Volume 15, Issue 7, pp 1157-1169

5. *Studio dei complessi [Pt(NH₃)₂Cl₂(acetamidato)(Y)] e [Pt(NH₃)₂Cl₂(acetato)(Y)]*

Dei complessi **19-28** e dei rispettivi intermedi **11** e **16** sono state studiate alcune proprietà chimico-fisiche (stabilità in soluzione acquosa, lipofilicità, potenziale e cinetica di riduzione) che potessero essere correlate con la loro eventuale attività biologica¹.

5.1 *Stabilità in soluzione acquosa*

Il primo passo nello studio dei complessi di interesse è incentrato sulla stabilità in soluzione acquosa. Essa rappresenta infatti un fattore molto importante per un farmaco che debba poi essere utilizzato in ambito clinico. Infatti, il composto deve mantenere la propria struttura invariata finché non raggiunge la cellula bersaglio, in modo da evitare la formazione di specie tossiche o inattive e poter svolgere la propria attività.

Lo studio di stabilità è stato condotto in una soluzione tampone a pH 7.4 con contenuto di cloruri simile a quello cellulare per simulare l'ambiente intracellulare. Per questo scopo viene utilizzato un tampone fosfato (PB) a pH 7.4 con concentrazione di fosfato pari a 8.3 mM o un tampone fosfato salino (PBS) in cui sono presenti cloruri alla concentrazione di 139.7 mM. La stabilità dei complessi è stata studiata nel tempo e seguita mediante tecnica NMR ed HPLC-MS.

STABILITÀ VIA NMR:

I complessi in esame sono stati sciolti alla concentrazione di 20 mM in tampone fosfato (PB) 100 mM in D₂O. Il campione è stato mantenuto a temperatura ambiente al buio per 4 giorni e gli spettri ¹H-NMR registrati ogni 0, 24, 62 e 100 ore.

Di seguito sono riportati come esempio gli spettri di alcuni dei complessi in esame.

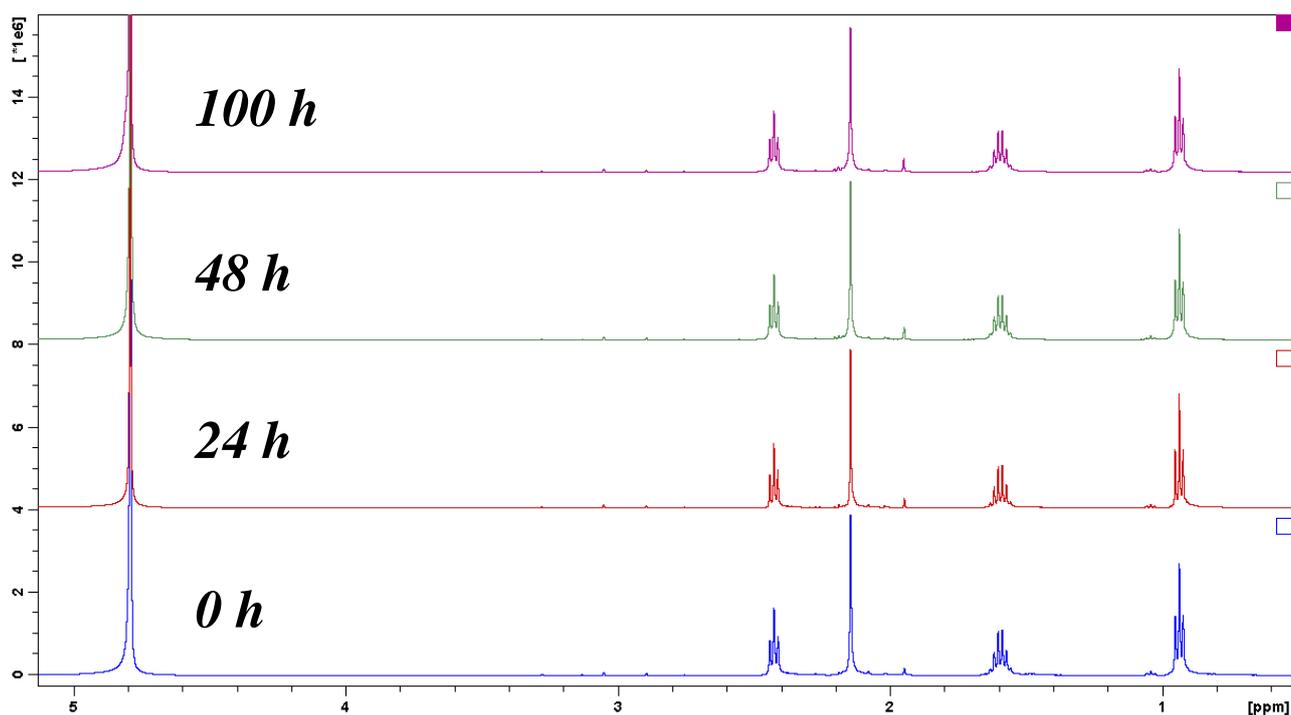


Figura 5.1: Spettri $^1\text{H-NMR}$ del complesso 20 nel tempo.

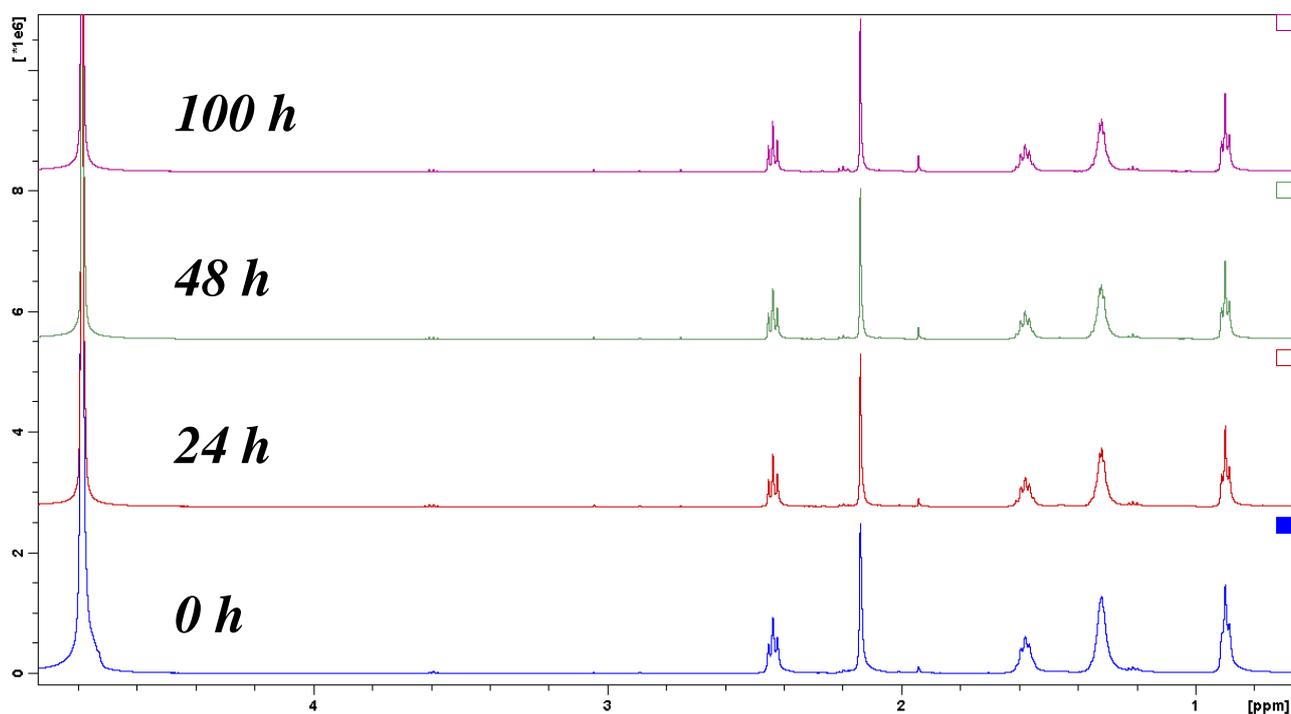


Figura 5.2: Spettri $^1\text{H-NMR}$ del complesso 21 nel tempo.

Per tutti i complessi studiati si riscontra il comportamento mostrato nelle fig. 5.1 e 5.2. Data la mancanza di variazioni dei segnali negli spettri, si evince che tutti i complessi sono stabili nell'arco dei 4 giorni di analisi.

STABILITÀ VIA HPLC-MS:

Per le analisi HPLC-MS i complessi sono stati sciolti alla concentrazione 1 mM in tampone HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico) 5 mM per evitare di introdurre fosfato nella sorgente ESI.

Ogni campione è stato mantenuto a temperatura ambiente al buio per 4 giorni ed i cromatogrammi registrati ogni 50 min. La figura seguente mostra alcuni esempi.

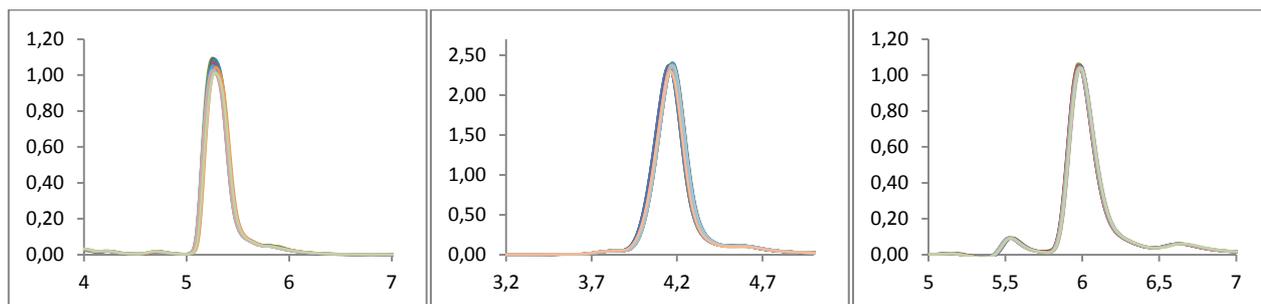


Figura 5.3: Variazione dei cromatogrammi dei complessi **11** (sx), **16** (centro) e **67** (dx) lungo 96h.

Come illustrato in fig. 5.3, tutti i complessi sono risultati stabili (> 95% di farmaco inalterato) nelle rispettive condizioni nei 4 giorni di analisi, confermando i risultati ottenuti con la spettroscopia NMR.

5.2 Lipofilicità

La lipofilicità è una caratteristica fondamentale dei farmaci in generale perché è correlata alla capacità di attraversamento delle membrane biologiche.

La lipofilicità viene comunemente espressa attraverso il coefficiente di partizione ottanolo-acqua, $P_{o/w}$, che rappresenta il rapporto tra le concentrazioni di un composto all'interno delle due fasi immiscibili di una miscela di due liquidi all'equilibrio. La miscela utilizzata per effettuare queste misure è formata dal 1-ottanolo (composto idrofobo) e dall'acqua³. Questo coefficiente viene comunemente indicato su scala logaritmica in base 10 ($\log P_{o/w}$) che descrive il logaritmo del rapporto tra la concentrazione del soluto nella fase idrofoba e quella nella fase acquosa.

$$\log P_{ow} = \log \left(\frac{[\text{soluto}]_{\text{ottanolo}}}{[\text{soluto}]_{\text{acqua}}} \right)$$

I valori assunti da $\log P_{ow}$ risultano negativi per sostanze ad alto carattere idrofilo e positivi per sostanze a carattere idrofobo.

In questo lavoro un indice approssimativo della lipofilità dei complessi è stata verificata mediante l'analisi dei tempi di ritenzione (t_R) dei complessi attraverso l'uso della cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC). Il processo di ripartizione che avviene all'interno della colonna cromatografica tra la fase stazionaria apolare e la fase mobile polare è molto simile a quello che avviene tra n-ottanolo ed acqua. Per questo motivo c'è una correlazione tra il logaritmo del fattore di capacità k' ($k' = (t_R - t_0) / t_0$, dove t_0 è il tempo morto di colonna), $\log k'$, ed il $\log P_{o/w}$ di un composto. $\log k'$ o più semplicemente il tempo di ritenzione di un composto può quindi essere usato come indice della sua lipofilità.

Pertanto, visto che anche per i complessi di Pt^{IV} la lipofilità è importante e ne influenza l'attività biologica², è stata valutata la lipofilità dei complessi in esame tramite RP-HPLC..

Procedura: I complessi in esame vengono disciolti in una miscela 50:50 acqua:metanolo in modo da ottenere una soluzione con concentrazione di platino 1mM. Le soluzioni sono iniettate in una colonna C18 (Phenosphere-NEXT) ed eluiti con una miscela 50:50 (pH 3.0). Il tempo morto di colonna è stato determinato facendo passare una soluzione 1mM di KCl. I tempi di ritenzione sono riportati in tabella 5.1

Tabella 5.1: Tempo di ritenzione dei complessi di Pt^{IV} in esame

<u>Composto</u>	<u>t_R (min)</u>	<u>$\log (t_R - t_0)/t_0$ (min)</u>
10	5,2	-0,35
12	4,1	-0,86
11	5,2	-0,35
16	4,1	-0,86
19	5,5	-0,28
24	5,4	-0,30
20	6,7	-0,06
25	6,8	-0,05
21	14,1	0,46
26	14,4	0,48
22	54,4	1,15
27	56,8	1,17
23	5,5	-0,28
28	5,5	-0,28

Come si può vedere dalla tabella 5.1 il tempo di ritenzione cresce all'aumentare della catena alifatica del legante. Considerando il rapporto tra $\log((t_R-t_0)/t_0)$ ed il numero di atomi di carbonio della catena si può verificare l'andamento pseudo-lineare tra la lunghezza della catena e lipofilità (fig. 5.4).

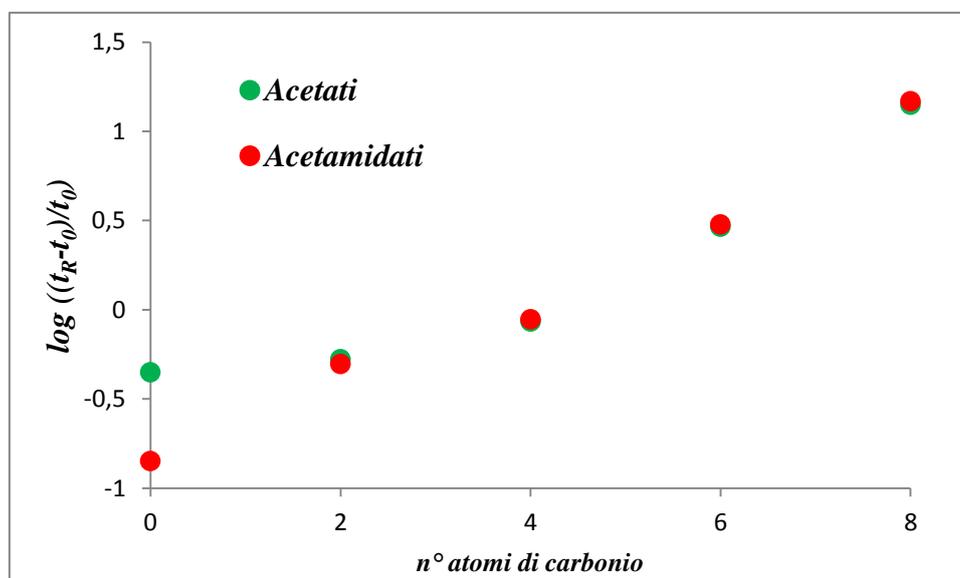


Figura 5.4: Andamento della lipofilità ($\log (t_R-t_0)/t_0$) rispetto all'aumentare della catena carbossilica

5.3 Potenziali

Un altro parametro che influenza l'attività biologica risulta essere il potenziale di riduzione da Pt^{II} a Pt^{IV} .

Il potenziale di riduzione del complesso deve essere compatibile con il *range* di potenziali delle biomolecole intracellulari (acido ascorbico, glutazione, ecc.) in modo da permettere la riduzione a Pt^{II} ed il conseguente rilascio del metabolita attivo.

La misura del potenziale è stata effettuata mediante voltammetria ciclica (CV) ed a onda quadrata (SWV). Le misure voltammetriche sono state effettuate su soluzioni 1 mM di complesso in etanolo. La fig. 5.5 mostra alcuni voltammogrammi e la tabella 5.2 riporta i potenziali ottenuti.

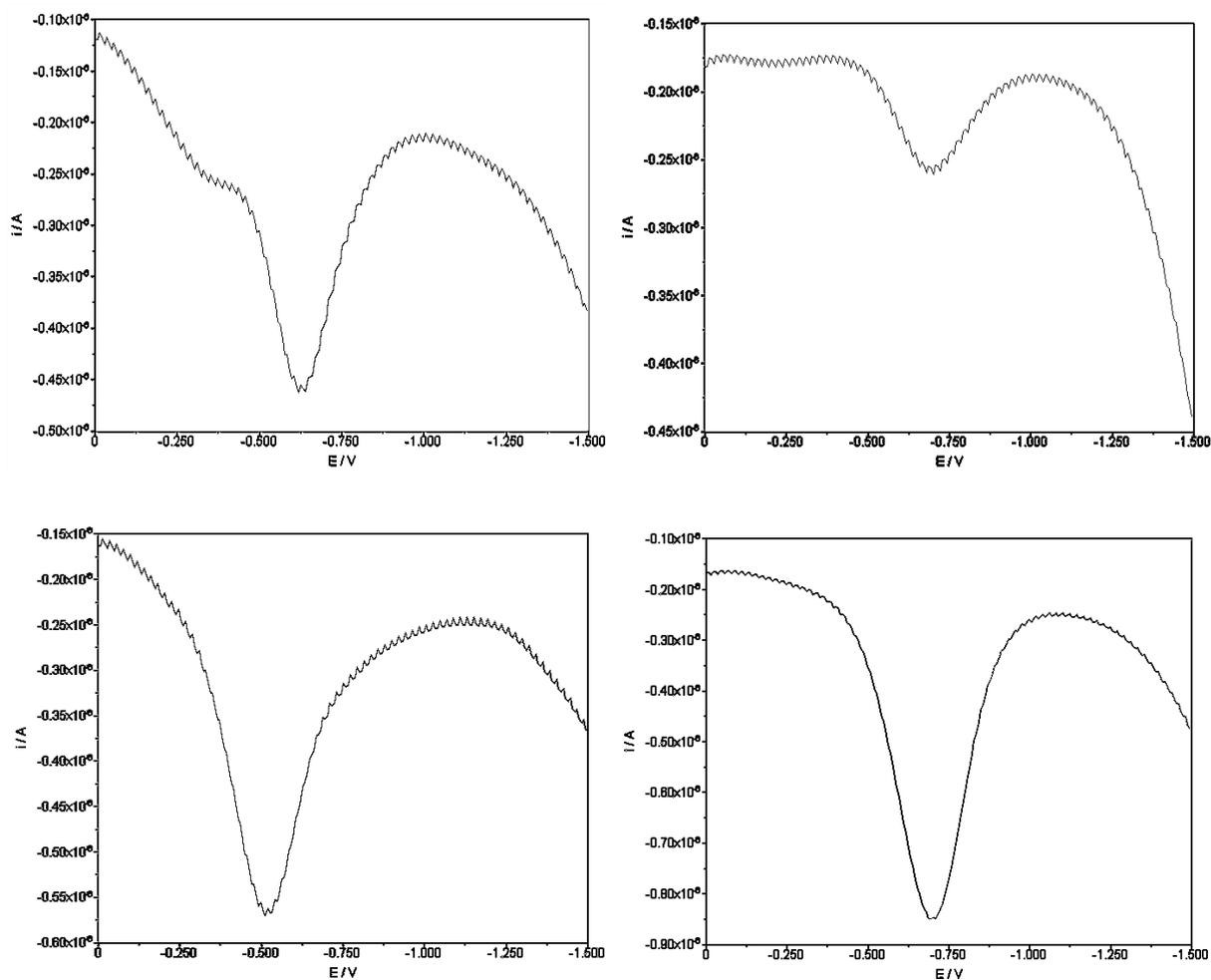


Figura 5.5: Esempi di misure SWV sui complessi 11 (alto sx), 16 (alto dx), 20 (basso sx) e 25 (basso dx)

Tabella 5.2: Potenziali di riduzione dei complessi di Pt^{IV} in esame

<u>Composto</u>	<u>E_{rid} (V)</u>	
28	-0,709	Acetamidati
16	-0,702	
27	-0,702	
25	-0,688	
26	-0,681	
24	-0,660	
11	-0,618	Acetati
21	-0,547	
22	-0,526	
20	-0,512	
23	-0,470	
19	-0,456	

Come si può vedere in tabella 5.2, i complessi con legante acetato (**11, 19-23**) mostrano un potenziale compreso tra -0.62 V e -0.45 V mentre i complessi con legante acetamidato (**16, 24-28**) mostrano potenziali, più negativi, compresi tra -0.71 V e -0.66 V. Questa differenza di potenziale è attribuibile alla diversa natura dell'atomo donatore impiegato dal legante assiale per coordinarsi, il quale porta ad una variazione della densità elettronica del centro metallico.

5.4 Riduzioni con acido ascorbico

All'interno della cellula i profarmaci a base di Pt^{IV} vengono ridotti rilasciando il metabolita attivo. La scelta dei leganti assiali può influire sul tempo di riduzione a Pt^{II}. Questa reazione avviene grazie agli agenti riducenti presenti nell'ambiente cellulare quali: acido ascorbico, glutatione o α -tocoferolo (fig 5.6).

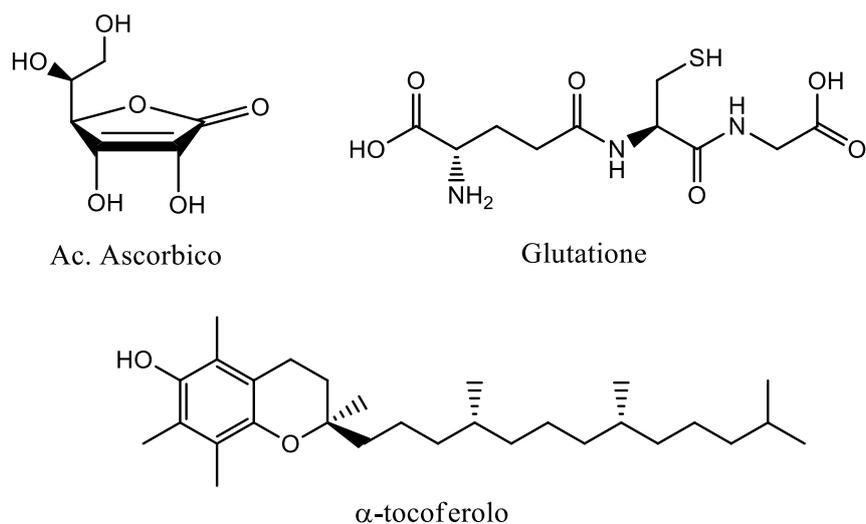


Figura 5.6: Strutture dei principali riducenti intracellulari

In questo lavoro, per simulare *in vitro* il processo di riduzione e studiarne tempi e metaboliti rilasciati, è stato utilizzato l'acido ascorbico, (5R)-5-[(1S)-1,2-diidrossietil]-3,4-diidrossifurano-2(5H)-one, come agente riducente.

La riduzione è stata studiata sciogliendo il complesso ($[Pt] = 0.5 \text{ mM}$) in tampone HEPES 2mM in presenza di acido ascorbico 5 mM. La soluzione è stata analizzata mediante tecnica HPLC-MS nell'arco di 18 ore, analizzando la crescita e diminuzione dei picchi cromatografici relativi alla specie in esame. Analizzando i picchi relativi ai complessi di partenza è possibile studiare l'andamento della riduzione e determinarne il tempo di dimezzamento $t_{1/2}$ (tempo necessario a consumare metà della quantità iniziale di complesso). Le condizioni di eluizione sono state scelte in base al complesso in esame in modo da evitare le sovrapposizioni di picchi cromatografici. Tuttavia per il complesso **24** non è stato possibile trovare una condizione in cui il picco dell'acido ascorbico si discostasse da quello del complesso di Pt(IV). Per questo motivo non è stato possibile determinare il tempo di riduzione.

Questo studio è stato quindi applicato ai complessi **11**, **12**, **16**, **19-22** e **25-27** e di seguito sono riportati alcuni esempi riduzioni seguite nel tempo mediante tecnica HPLC-MS.

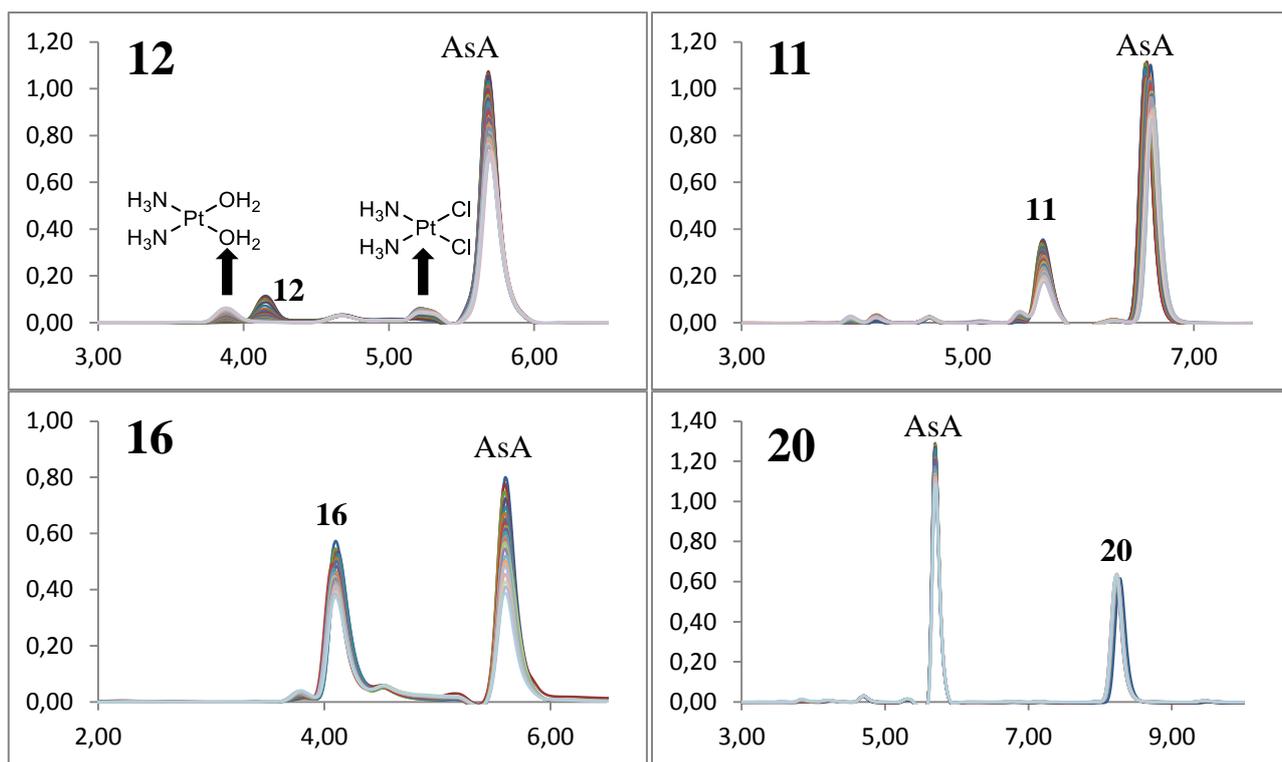


Figura 5.7: Riduzione dei complessi **12**, **11**, **16** e **20** con Acido Ascorbico (AsA).

I complessi di Pt^{IV} analizzati vengono ridotti dall'acido ascorbico con formazione di più specie di Pt^{II} (principalmente cisplatino e la sua forma solvatata). Per i complessi contenenti il legante acetamidato, oltre al cisplatino si forma in quantità minima (<5%) come sottoprodotto della riduzione una specie di Pt^{II} contenente due molecole di ammoniaca, un acetamidato ed un cloruro. Siccome questa specie non si forma subito dopo la riduzione ma in tempi successivi, è possibile che si formi dopo la solvatazione del cisplatino a cui segue una sostituzione acqua/amidato, data l'affinità del Pt^{II} verso i leganti amminici.

Come si può vedere negli esempi in figura 5.7, i complessi in queste condizioni di lavoro non vengono completamente ridotti a Pt^{II} dall'acido ascorbico nelle 18 ore di analisi. Questi dati mostrano come l'acido ascorbico riduca lentamente questa classe di composti, ma in ambiente cellulare la presenza di altre specie riducenti può velocizzare questo processo. Tuttavia, lo studio effettuato con acido ascorbico permette di paragonare i vari complessi tra loro in modo da determinare come la struttura (leganti assiali) influiscano sull'inerzia del complesso.

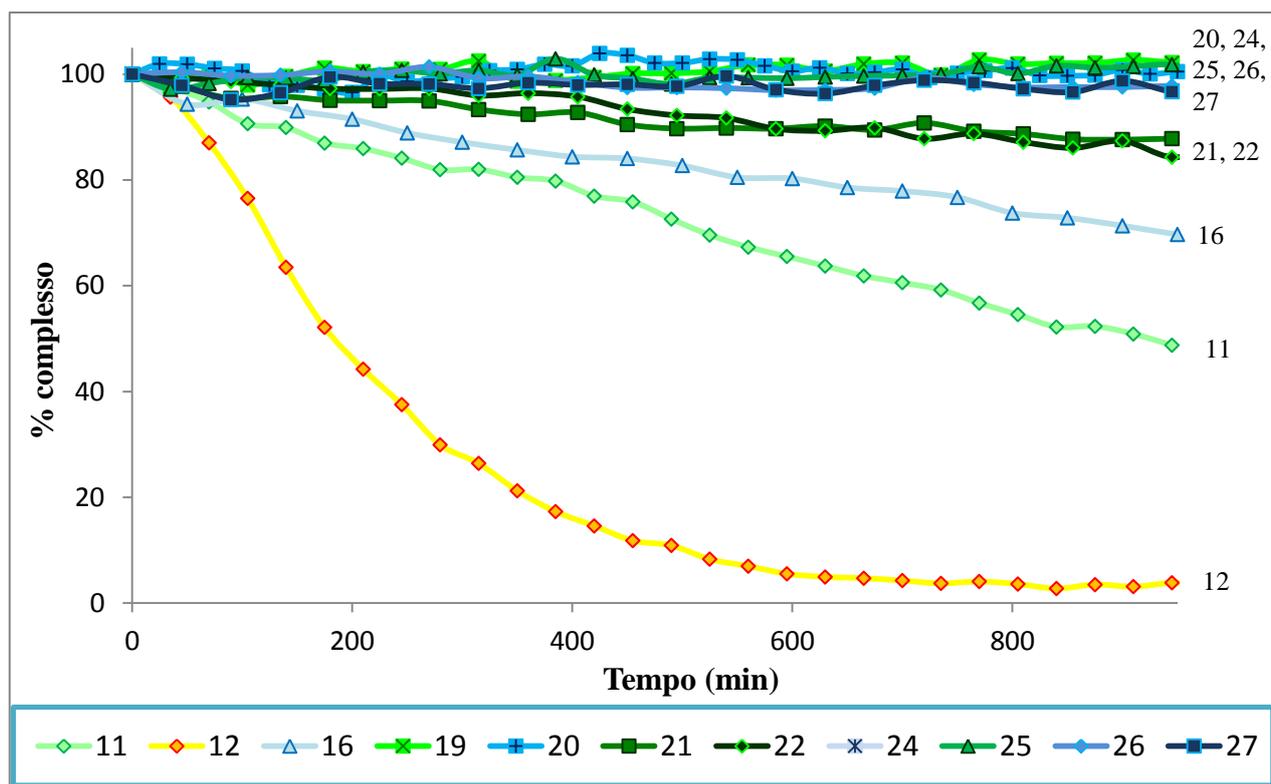


Figura 5.8: Profilo di riduzione dei complessi acetati/acetamidati

Analizzando i profili di riduzione è possibile determinare solo il $t_{1/2}$ dei complessi **11** e **12**, rispettivamente 920 min e 185 min, mentre gli altri complessi hanno mostrato un $t_{1/2}$ maggiore delle 18 ore di analisi. Tuttavia si può vedere come la sostituzione di un gruppo OH con un legante carbossilato aumenti il tempo della riduzione e come il gruppo acetamidato renda più inerte il complesso, anche se in modo meno marcato, rispetto al legante acetato.

Per verificare i prodotti formati nella riduzione con acido ascorbico sono state effettuate analisi NMR nel tempo utilizzando i complessi omologhi marcati con ^{15}N , **17** e **18**, in presenza di acido ascorbico.

Procedura: I complessi **17** e **18** sono stati sciolti in tampone HEPES 80 mM (concentrazione di complesso = 20 mM) con acido ascorbico 40 mM in presenza di cloruri alla concentrazione di 150 mM in modo da evitare la formazione di specie idrolizzate, successive alla riduzione, in modo da semplificare lo spettro e l'interpretazione dei segnali. Ogni campione è stato analizzato nell'arco di 15h e di seguito vengono riportati alcuni spettri.

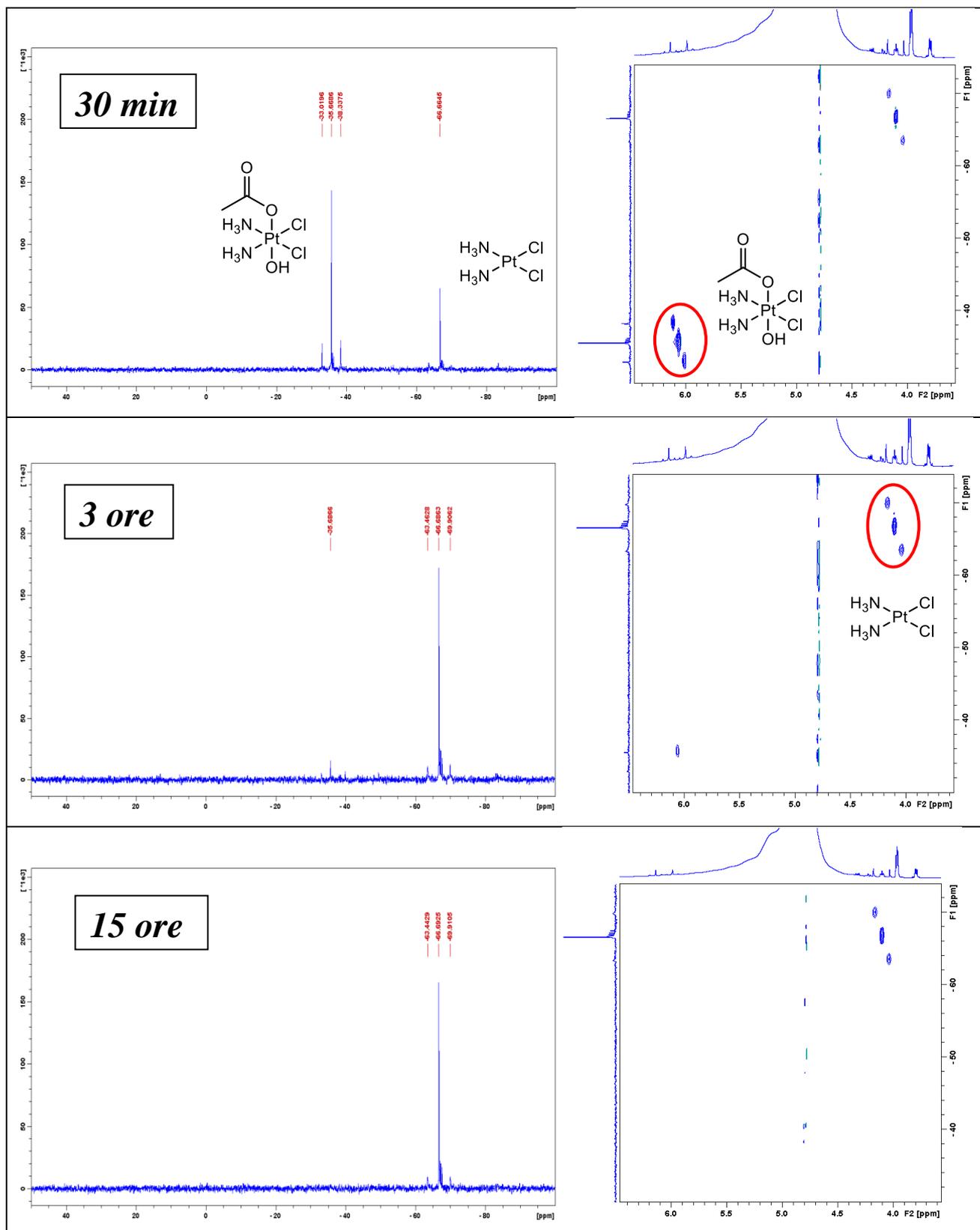


Figura 5.9: Variazione dei segnali ^{15}N DEPT e ^1H - ^{15}N HSQC NMR del complesso 17

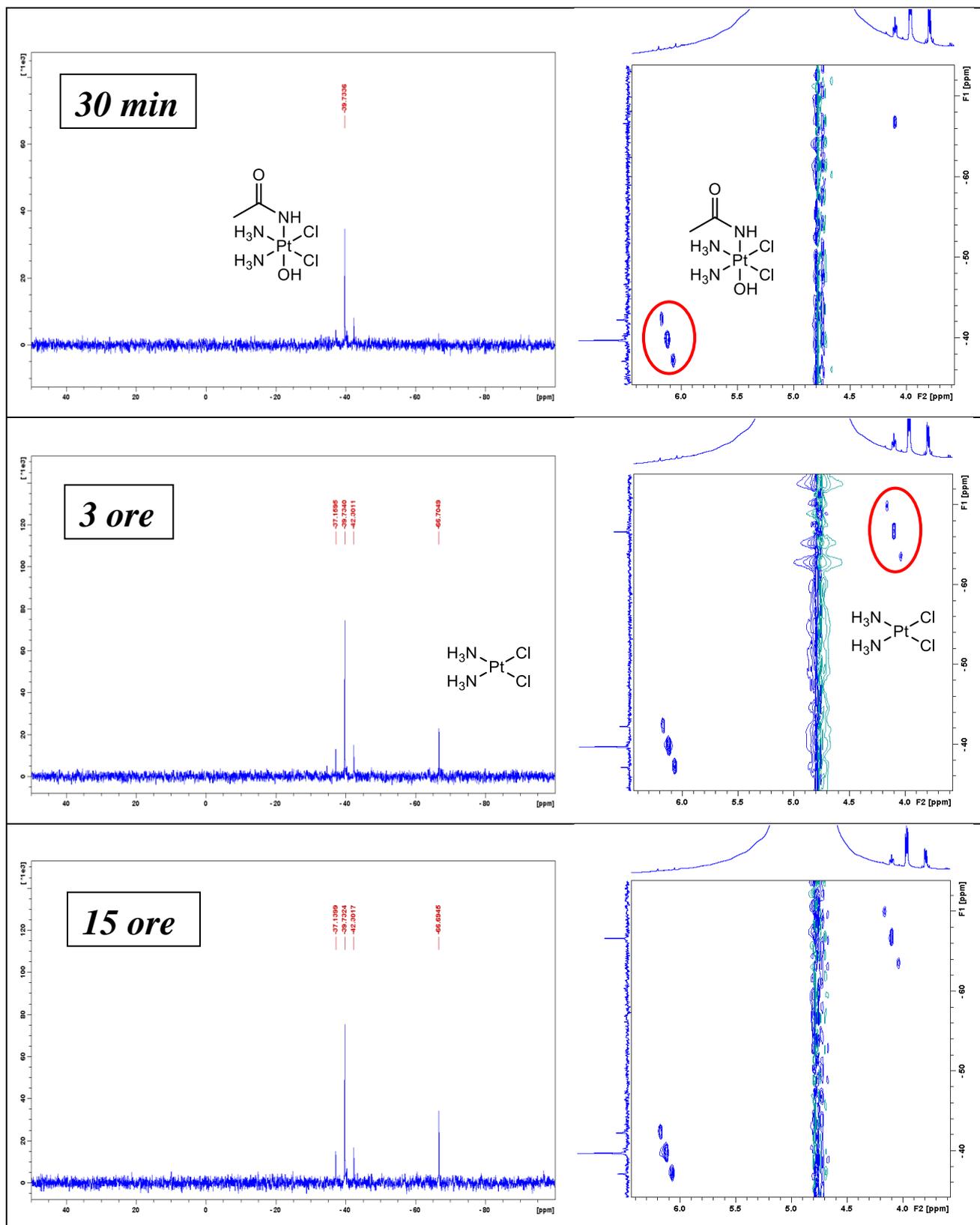


Figura 5.9: Variazione dei segnali ^{15}N DEPT e ^1H - ^{15}N HSQC NMR del complesso 18

Come si può vedere dagli spettri sopra riportati, entrambi i complessi si riducono in presenza di acido ascorbico (**17** più velocemente rispetto a **18**). La riduzione conferma la perdita dei due leganti assiali e la formazione di cisplatino. Se si opera in assenza di cloruri o in bassa concentrazione si osserva anche l'idrolisi del cisplatino e, nel caso del complesso **18** la formazione di una nuova specie, i cui segnali sono compatibili con il complesso osservato tramite HPLC-MS: una specie di Pt^{II} contenente due molecole di ammoniaca, un acetamidato ed cloruro (fig. 5.10).

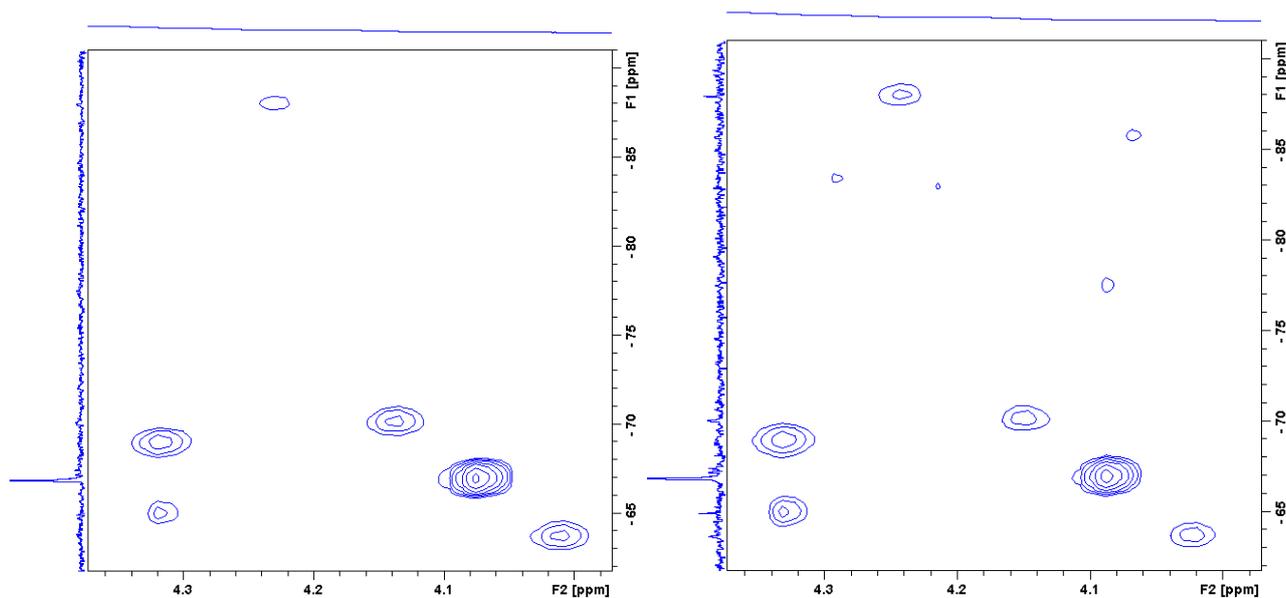


Figura 5.10: Variazione dei segnali del complesso **18** dopo 1h (sx) e 4h (dx) con $[Cl^-] = 5mM$

5.5 *Attività biologica*

La ricerca di nuovi potenziali farmaci antitumorali ha come obiettivo finale la determinazione dell'effettiva efficienza di tali composti sui tessuti tumorali, attraverso specifici test biologici condotti in vitro e, successivamente, in vivo.

Questi studi vengono effettuati su opportuni modelli cellulari (tumorali e non), al fine di individuare la relativa attività di azione. Un farmaco può possedere attività:

- Citostatica: blocco della proliferazione cellulare;
- Citotossica: morte cellulare causata da un meccanismo che può portare al blocco della proliferazione;
- anti-metastatica: 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 la successiva 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. Le condizioni di sperimentazione in vitro ed in vivo spesso influenzano la determinazione di citotossicità e citostaticità.

- a) 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;
 - 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.

b) 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.

In questo lavoro si è voluto paragonare l'attività dei complessi **11**, **16**, **19-28** a quella del cisplatino (il farmaco più usato nel campo antitumorale). A questo scopo si è studiato l'attività dei farmaci su un'unica linea cellulare: A2780 (carcinoma ovarico), acquistata dalla ECACC (European Collection of Cell Cultures, UK), le cui cellule sono state coltivate in RPMI1640 (Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium).

Al terreno sono stati aggiunti L-glutammina (2 mM), penicillina 100 IU/ml, streptomina (100 mg/l) 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).

Il cisplatino è stato sciolto in una soluzione di NaCl 0,9% (pH 3 corretto con HCl, concentrazione soluzione standard 1 mM). Tutti i complessi **11**, **16**, **19-28** sono stati sciolti in etanolo (concentrazione della soluzione madre 5 mM) e conservati a -66°C. Le soluzioni concentrate vengono diluite nel terreno fino alla concentrazione richiesta. La concentrazione di etanolo, usato come co-solvente, non supera lo 0,2% finale, concentrazione non tossica per le cellule testate.

La determinazione della vitalità cellulare in risposta all'impiego di farmaci, alimenti, agenti chimici o ambientali può essere misurata attraverso il saggio della resazurina⁴.

In caso di danno alla cellula, l'enzima intracellulare lattato deidrogenasi (LDH) viene rilasciato nel terreno cellulare e per questo motivo la vitalità cellulare risulta inversamente proporzionale alla quantità di LDH rilasciato. La quantità di LDH viene determinata grazie all'utilizzo della resazurina che attraverso una reazione enzimatica accoppiata ad opera di una diaforasi viene trasformata in resorufina (molecola fluorescente) (Fig. 5.10). In contemporanea al rilascio di LDH si avrà l'ossidazione di NADH in NAD⁺ accoppiata con la riduzione del piruvato a lattato.

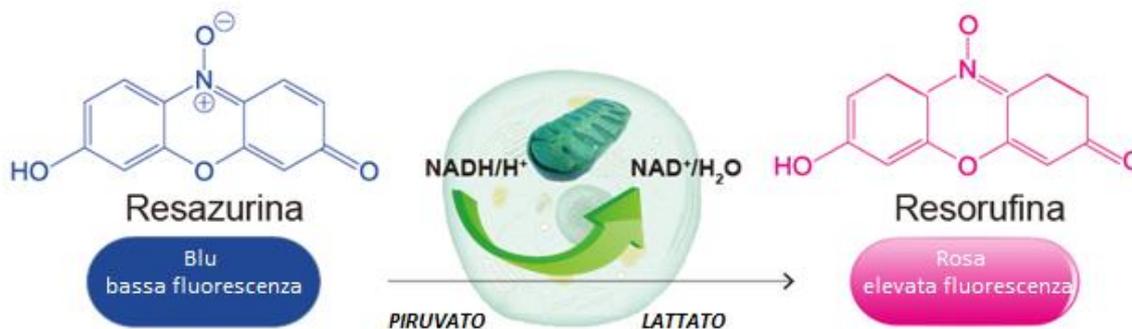


Figura 5.10: Schema di reazione della resazurina in presenza di riducenti

Per paragonare l'attività di più farmaci, viene espresso un valore di IC₅₀ (half inhibiting concentration): definito come concentrazione di farmaco in grado di ridurre del 50% la vitalità cellulare. L'IC₅₀ viene ricavato mettendo in relazione la risposta farmacologica con il logaritmo della concentrazione del farmaco, ottenendo così una curva con andamento sigmoide (curva dose-risposta graduale).

Per determinare l'attività, vengono seminate le cellule in una piastra da 96 pozzetti. Alla fine di ogni trattamento vengono aggiunti 10 µg/ml di resazurina nel terreno e la soluzione mantenuta per 1h a 37°C. La quantità di prodotto ridotto, la resofurina, viene misurata per fluorescenza (eccitazione a 535 nm ed emissione a 595 nm) con un lettore di piastre Tecan Infinite F200Pro.

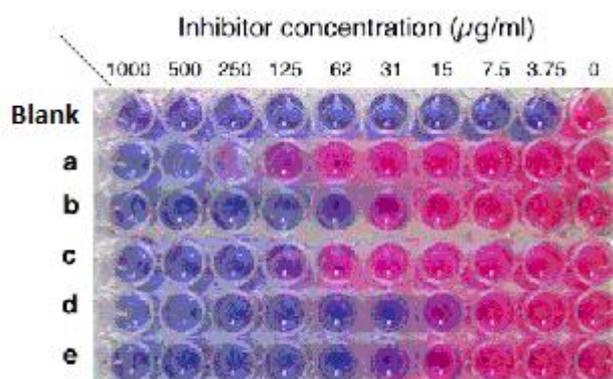


Figura 5.11: Piastra da 96 pozzetti

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

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

Di seguito sono elencati i valori di IC_{50} dei complessi in esame.

Tabella 5.3: valori di IC_{50} dei complessi in esame

IC_{50} (μM)			
cisplatino		$0,5 \pm 0,1$	
11	$0,16 \pm 0,05$	16	23 ± 9
19	12 ± 5	24	33 ± 4
20	$2,8 \pm 0,3$	25	12 ± 2
21	$0,21 \pm 0,05$	26	$0,20 \pm 0,02$
22	$0,11 \pm 0,05$	27	$0,043 \pm 0,002$
23	$5,9 \pm 0,7$	28	20 ± 2

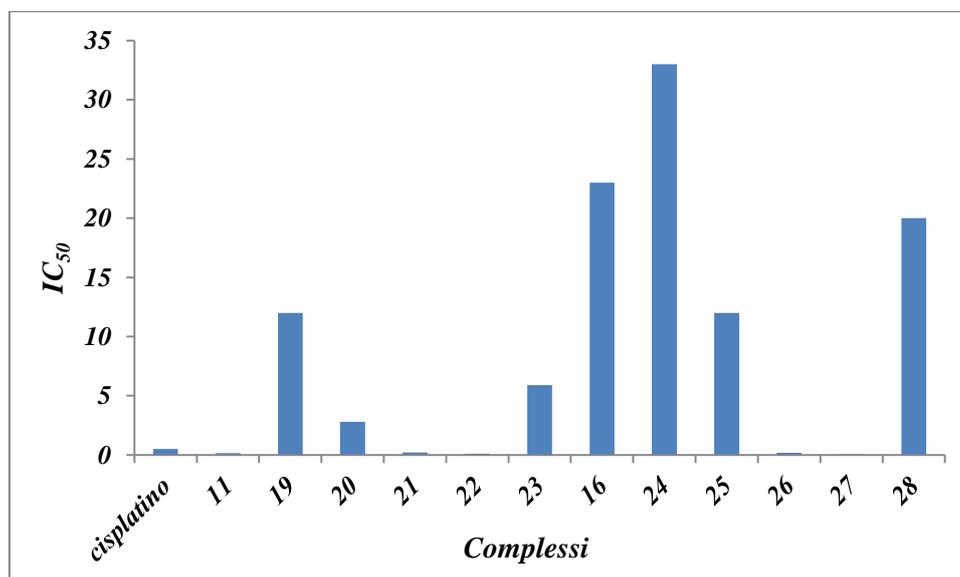


Figura 5.12: IC_{50} dei complessi in esame

Come si può vedere dai valori di IC_{50} , l'attività citotossica aumenta (più è basso il valore più è efficace il farmaco) con l'aumentare della catena lineare dell'acido carbossilico: ogni 2 carboni l'attività aumenta di un fattore 5. Per ottenere un'attività migliore del cisplatino è necessaria la presenza di acidi carbossilici con catena superiore a 4 atomi di carbonio.

Un valore molto interessante è dato dall'attività del complesso **11**. Questo valore infatti risulta essere inaspettatamente più basso del complesso cisplatino ed ha suscitato largo interesse. Sono attualmente in corso ulteriori studi per tentare di spiegare il comportamento anomalo di questo composto rispetto a complessi analoghi.

5.6 Bibliografia:

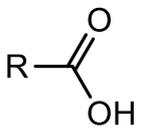
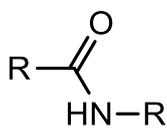
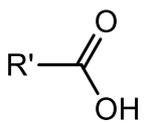
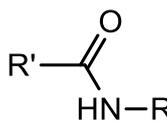
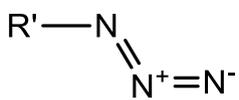
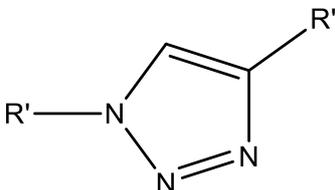
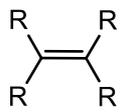
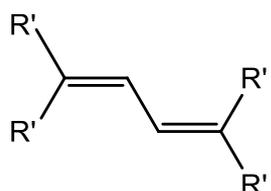
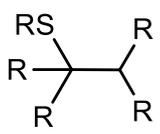
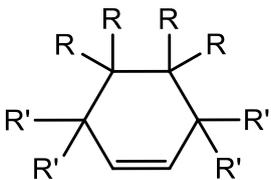
1. 4. Ravera, M.; Gabano, E.; Zanellato, I.; Fregonese, F.; Pelosi, G.; Platts, J.; Osella, D.; Antiproliferative activity of a series of cisplatin-based Pt(IV)-acetylamido/carboxylato prodrugs; Dalton Trans., 2016
2. M X. Liu, B. Testa and A. Fahr, *Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation*, Pharm. Res., 2011, 28, 962.
3. James Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, Vol. 2 of Wiley Series in Solution Chemistry, John Wiley, 1997.
4. E. Magnani, E. Bettini, *Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect*, Brain Res. Protoc. 5, 2000, 266–272.

6. Vettori per DTD: il legame covalente

Come visto per i candidati profarmaci **23** e **28**, è possibile sintetizzare complessi contenenti leganti assiali bifunzionali in grado di reagire, attraverso il gruppo funzionale “libero”, con gruppi complementari presenti su macromolecole o nanostrutture, mediante la formazione di legami covalenti complesso-molecola. Tali complessi possono quindi essere sfruttati per strategie di DTD (*Drug Targeting and Delivery*).

In questa parte del lavoro di tesi si è incentrato l’interesse sulla sintesi di complessi con differenti funzionalità “libere” e sulla rispettiva reattività verso specifici gruppi funzionali presenti nella maggior parte di macromolecole o nanostrutture. A questo scopo, sono stati impiegati delle molecole modello contenenti i gruppi funzionali complementari in modo da simulare il possibile legame complesso-vettore (Tab. 6.1).

Tabella 6.1: Combinazioni gruppo del complesso-modello

<i>Gruppo funzionale del complesso</i>	<i>Gruppo funzionale complementare</i>	<i>Prodotto finale</i>
	$R'-NH_2$	
$R-NH_2$		
$R\equiv$		
	RSH o 	 o 

A questo scopo, a partire dal complesso **11** sono stati sintetizzati, per sostituzione del legante OH, i complessi mostrati in fig. 6.1 che contengono quattro differenti funzionalità libere quali:

- acido carbossilico: ottenuto utilizzando anidride succinica (complesso **23**, par. 4.1)
- ammina: ottenuta per sostituzione con β -alanina
- maleimide: ottenuto coordinando acido 2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)acetico.
- Alchino terminale: utilizzando l'acido 4-pentinoico come legante assiale

Queste funzionalità sono state successivamente sfruttate in reazioni di *coupling* con le molecole-modello complementari (fig. 6.2).

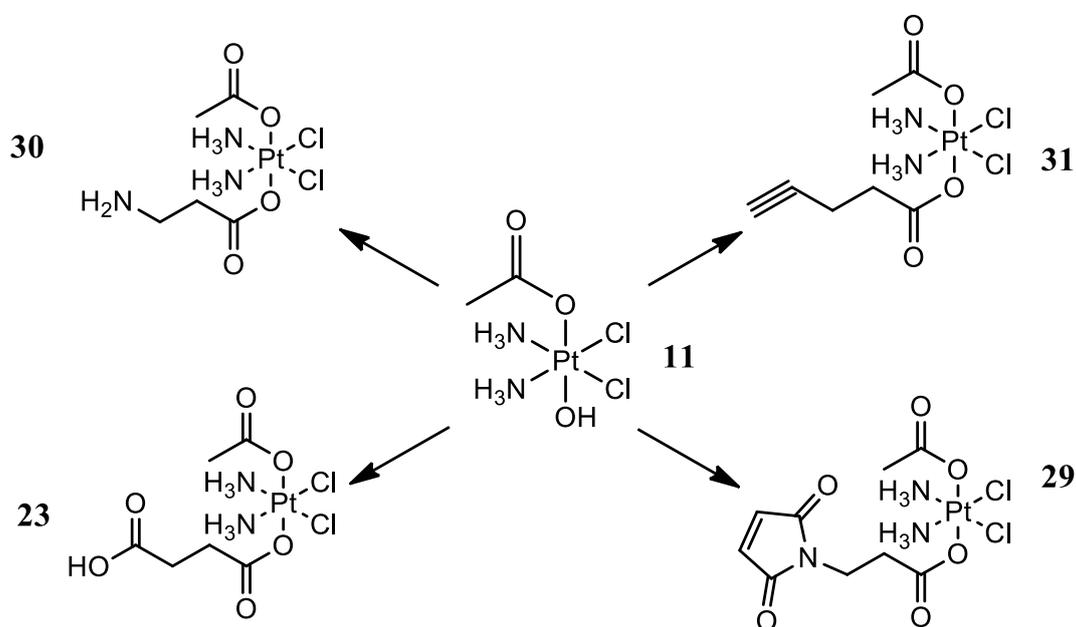


Figura 6.1: Sintesi dei complessi asimmetrici con leganti assiali bifunzionali

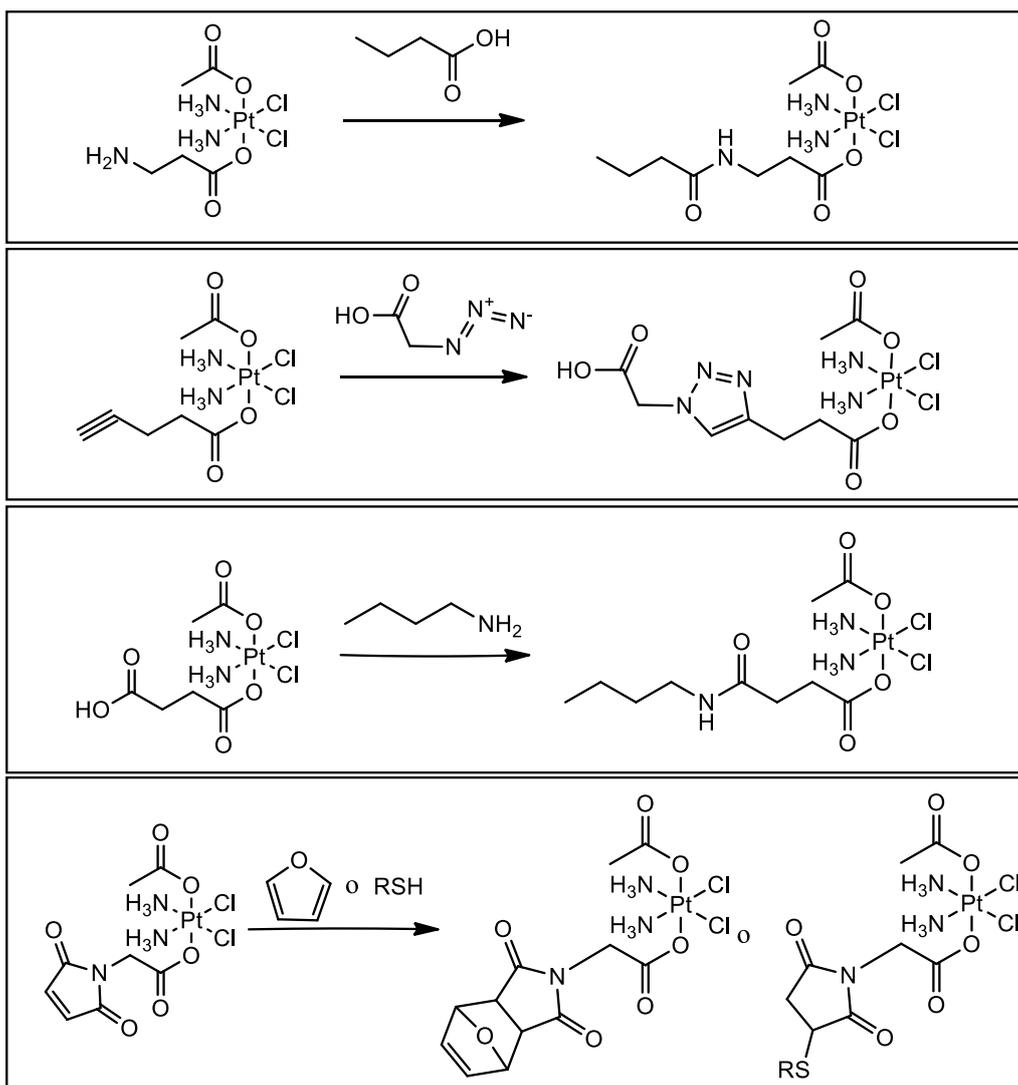


Figura 6.2: Possibili reazioni di accoppiamento complesso-modello

6.1 Sintesi dei complessi con leganti bifunzionali

I complessi in fig. 6.1 sono stati sintetizzati partendo dal complesso asimmetrico **11**, per sostituzione del legante OH con il legante di interesse. Come visto per le sintesi dei complessi **19-28**, nella reazione di sostituzione vengono utilizzate le rispettive anidridi o acidi carbossilici attivati.

- le reazioni di sostituzione del gruppo OH con acido 2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)acetico e acido 4-pentinoico vengono effettuate mediante attivazione dell'acido con DCC e ultrasuoni (par. 3.2)
- la reazione con la β -alanina viene effettuata attivando l'acido con HBTU (N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio esafluorofosfato). Per evitare la reazione di polimerizzazione tra due o più molecole di β -alanina è necessario utilizzare la forma protetta β -alanina-Fmoc (Fmoc = fluorenilmetilossicarbonile).

[Pt(acetato)Cl₂(acido 2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)acetico)(NH₃)₂] (**29**)

Per la sintesi del complesso [Pt(acetato)Cl₂(acido 2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)acetico)(NH₃)₂] (**29**), è necessario preparare il legante carbossilato, partendo da glicina ed anidride maleica^[1]. In quattro *steps* di reazione è possibile ottenere il complesso desiderato (fig. 6.3).

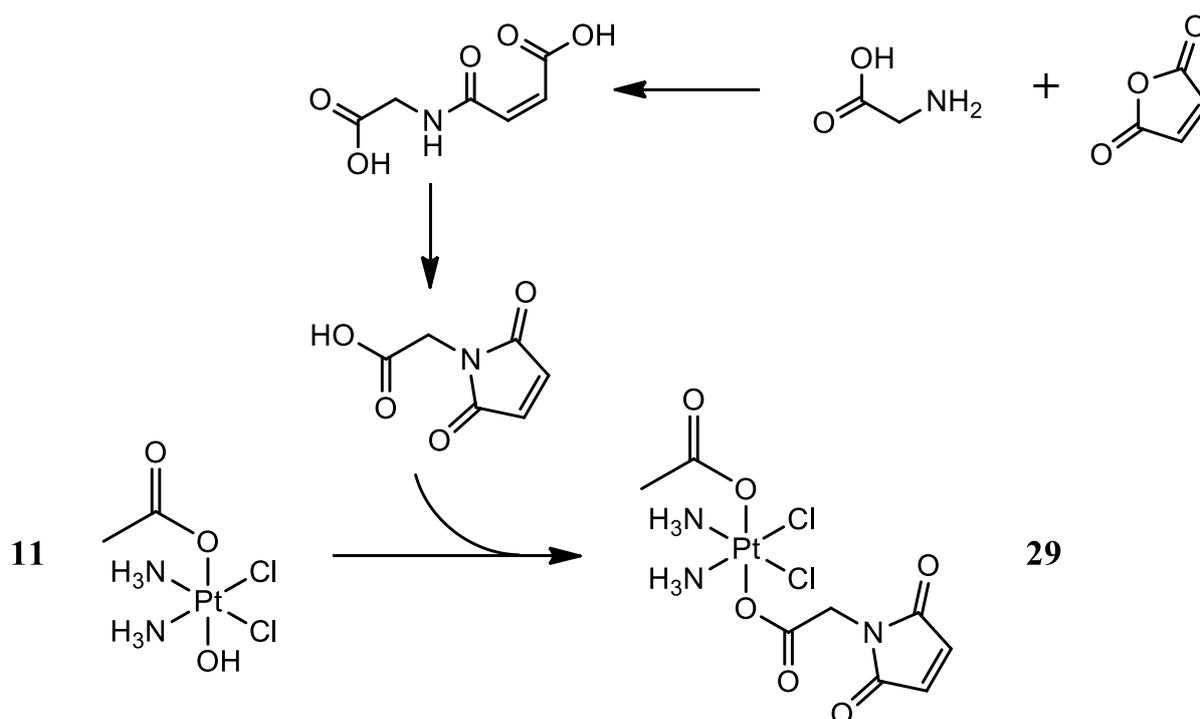


Figura 6.3: Schema di sintesi del complesso 33

SINTESI DELL'ACIDO 4-((CARBOSSIMETIL)AMINO)-4-OSSOBUT-2-ENOICO (GMA)

Procedura: 0.83 g di glicina (1.11 mmol) vengono sospesi in una soluzione di anidride maleica (1.08 g, 11.1 mmol) e acido acetico glaciale (14 ml) e la sospensione viene lasciata in agitazione per 5 ore a temperatura ambiente. Successivamente il solido (prodotto) viene separato per centrifugazione, lavato con acqua fredda e metanolo ed essiccato sotto flusso di azoto.

Resa: 1.7 g (90%)

SINTESI DELL'ACIDO 2-(2,5-DIOSSO-2,5-DIIDRO-1H-PIRROL-1-IL)ACETICO (GMI)

Procedura: 0.50 g di GMA (2.9 mmol) vengono sospesi in 75 mL di toluene e 1.4 mL di trietilammina e la reazione mantenuta in agitazione a 80°C fino a completa dissoluzione dei reagenti (circa 2 ore). Ad avvenuta reazione, l'olio presente sul fondo viene rimosso e la soluzione portata a secco mediante evaporatore rotante. Il residuo incolore viene ripreso con acqua (50 mL) e la soluzione portata a pH 2 con HCl concentrato. Il prodotto viene estratto con due aliquote da 40 ml di etilacetato e la fase organica anidrificata con solfato di sodio. Il solvente viene rimosso mediante evaporatore rotante ed il prodotto viene asciugato in corrente d'azoto.

Resa: 0.31 g (70%)

ATTIVAZIONE DELL'ACIDO 2-(2,5-DIOSSO-2,5-DIIDRO-1H-PIRROL-1-IL)ACETICO

Procedura: 6 equivalenti di DCC (185 mg) e 1 equivalente di acido (114.1 mg di acido 2-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)acetico, 0.74 mmol) vengono disciolti in 1 ml di DMF e la soluzione mantenuta per 15 min in bagno ad ultrasuoni a temperatura ambiente. Il precipitato (DCU) viene rimosso e la soluzione usata tal quale per lo *step* successivo.

SINTESI DEL COMPLESSO [Pt(ACETATO)Cl₂(GMI)(NH₃)₂] (29)

Procedura: Alla soluzione di acido attivato vengono aggiunti 56.0 mg di **11** (0.15 mmol) sospesi in 1 ml di DMF e la miscela fatta reagire per 24 ore a temperatura ambiente. Al termine, il precipitato viene scartato ed il solvente rimosso mediante evaporatore rotante. Il prodotto viene disciolto in 200 µl di metanolo e precipitato mediante aggiunta di 25 ml di etere dietilico. Il solido cristallino viene lavato con etere dietilico.

Resa: 43 mg (56%)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecniche NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e 30% di metanolo e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 5.6 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa corrispondente (fig. 6.4), dove è possibile riscontrare il picco dello ione pseudo molecolare $[M+H]^+$ con valore di $m/z = 514.3$. Sono inoltre presenti altri picchi a $m/z = 323.2$, 359.2 , 454.3 e 536.3 rispettivamente degli ioni $[M-GMI]^+$, $[M-acetato]^+$ e $[M+Na]^+$.

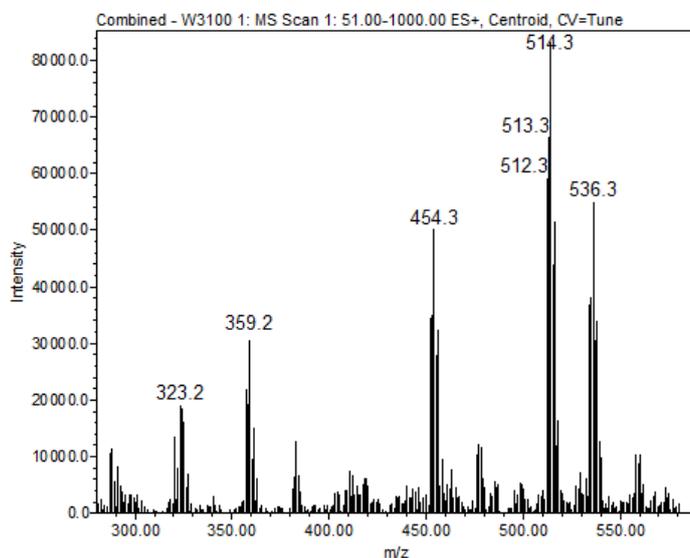
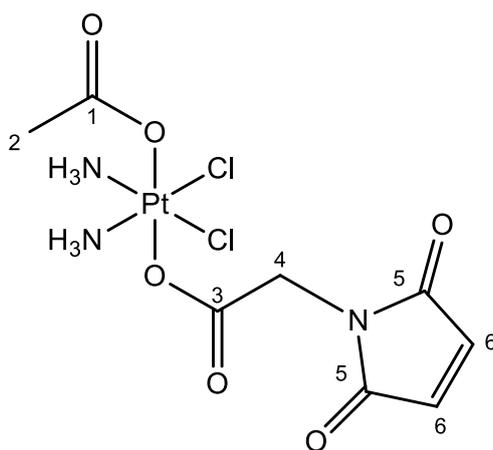


Figura 6.4: Spettro di massa del complesso **29**

NMR

Gli spettri del complesso **29** sono stati registrati in d_6 -DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

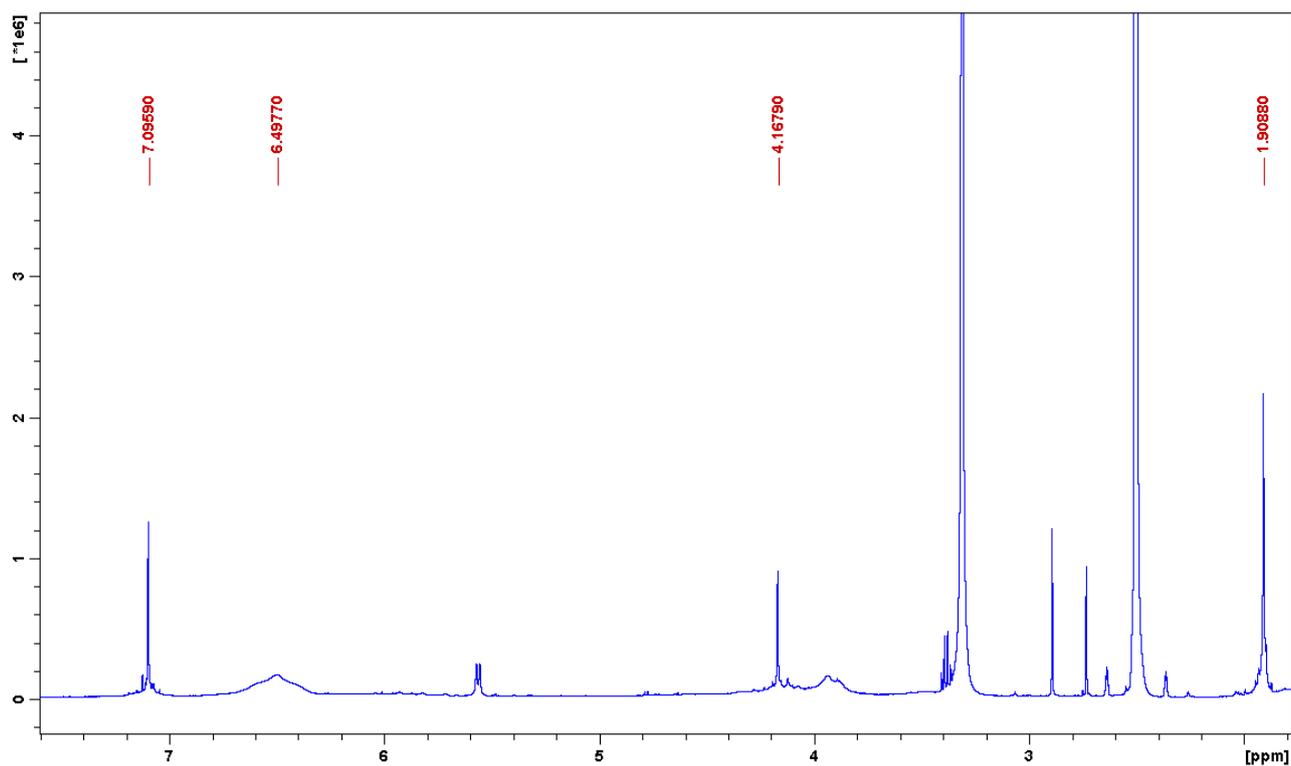


Figura 6.5: Spettro ^1H del complesso **29**

Lo spettro presenta tracce di etanolo (1.06, 3.34 e 5.56 ppm) e DMF (2.73 e 2.89 ppm).

Tabella 6.1: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **29**

<i>Chemical Shift</i> δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	Integrazione
1.90	2	s	3
4.17	4	s	2
6.50	NH_3	m	6
7.09	6	s	2

- Spettro ^{13}C NMR

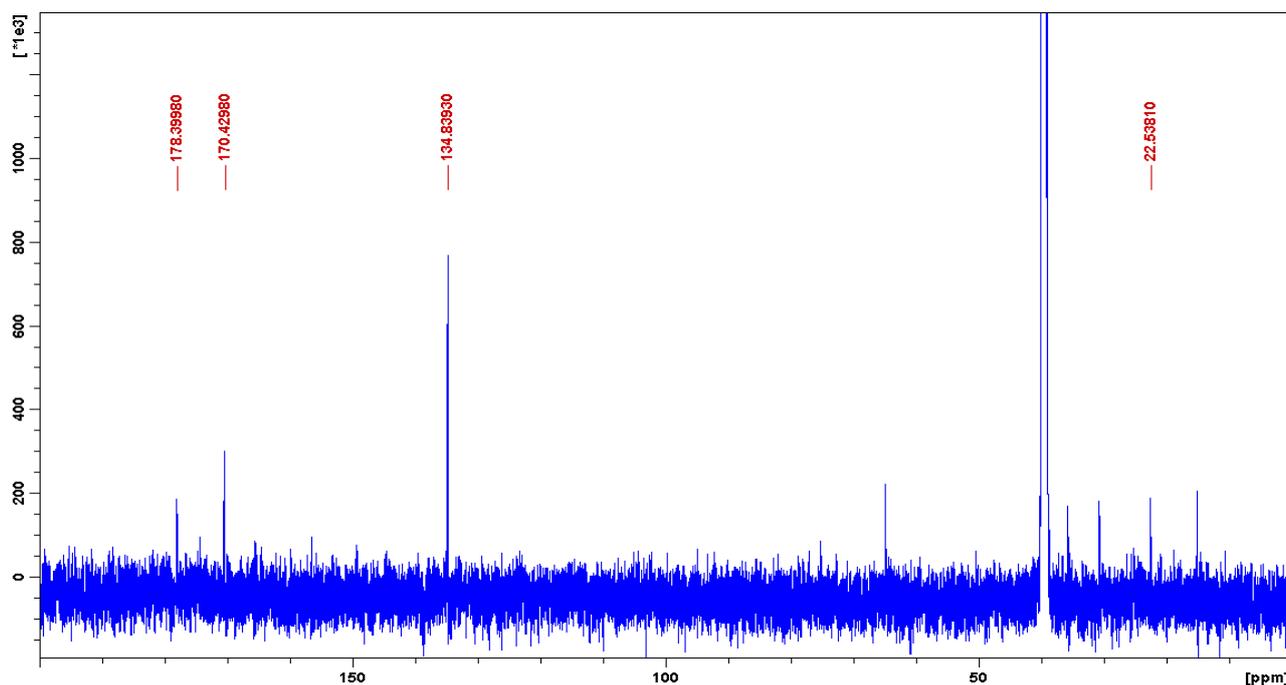


Figura 6.6: Spettro ^{13}C del complesso **29**

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (15.12 e 62.05 ppm) e DMF (30.73, 35.73 e 162.29 ppm).

Tabella 6.2: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **29**

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>
22.5	2
39.5*	4
134.8	6
170.4	5
178.4	1-3

* il segnale a 39.5 ppm è attribuibile grazie all'analisi HSQC nonostante cada sotto il segnale del solvente.

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

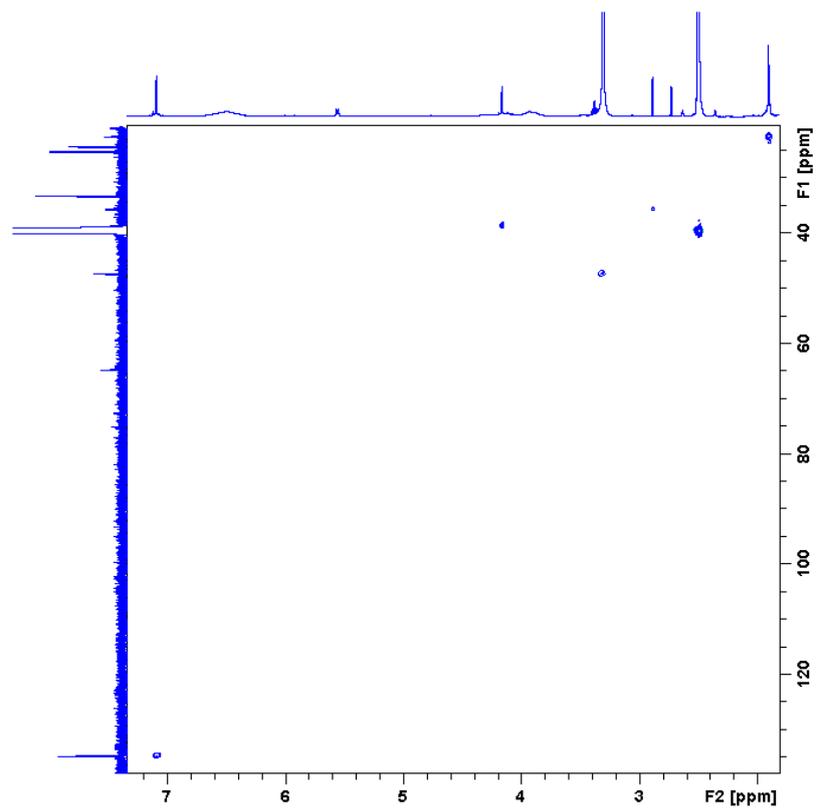


Figura 6.7: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 29

- Spettro ^{195}Pt NMR

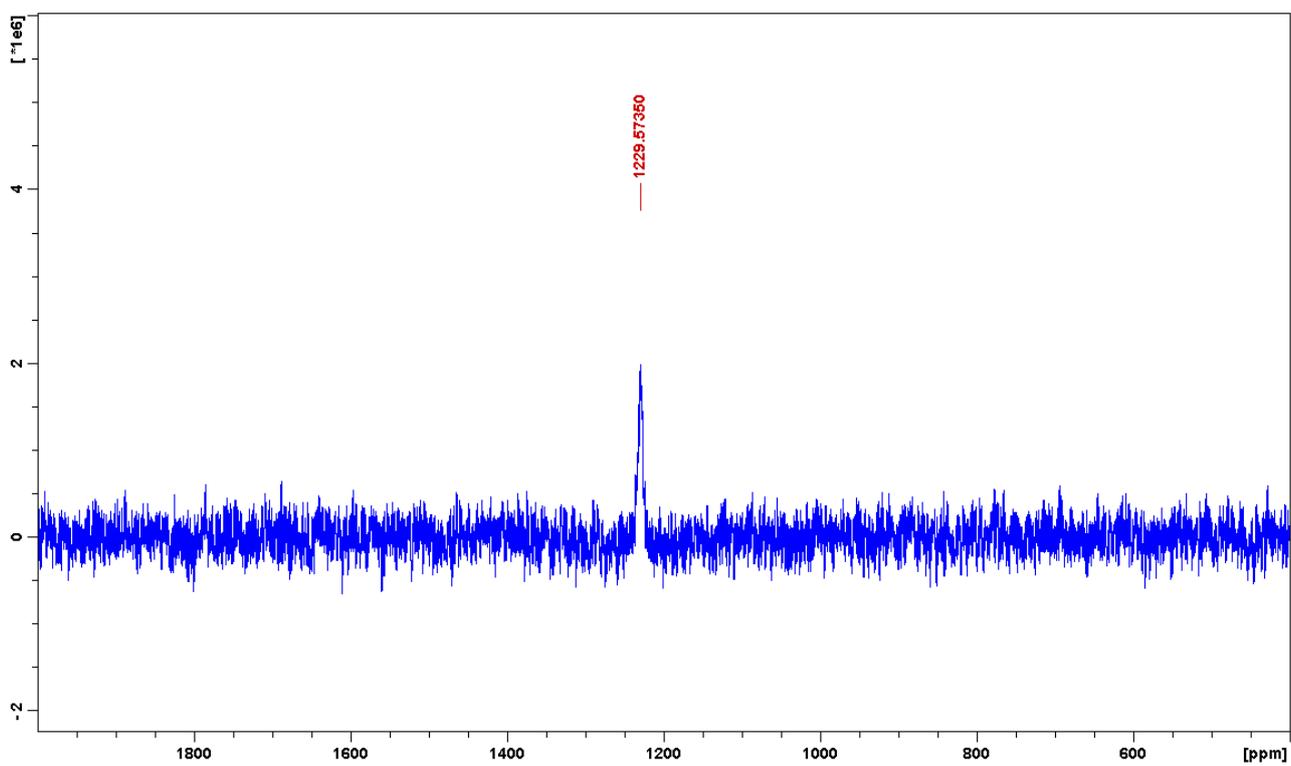


Figura 6.8: Spettro ^{195}Pt del complesso 29

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 1230 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* compatibile con complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

[Pt(acetato)(β -Ala)Cl $_2$ (NH $_3$) $_2$] (**30**)

La reazione di formazione del complesso asimmetrico **30** prevede la sostituzione del legante OH del complesso iniziale **11** con il legante β -alanina. Tuttavia è necessario proteggere il gruppo amminico (non impiegato nella coordinazione al centro metallico) per evitare la possibile reazione di formazione di ammidi tra le molecole di β -alanina. A questo scopo è stato utilizzato il gruppo protettore Fmoc (fluorenilmetilossicarbonile) come gruppo protettore, la cui deprotezione avviene in condizioni compatibili con il complesso di platino utilizzato.

Il primo *step* di sintesi prevede la sostituzione del legante OH con il legante protetto Fmoc (fig. 6.9); in questo passaggio si usano HBTU (*N,N,N',N'*-Tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)uronio esafluorofosfato) come agente accoppiante (esso è spesso utilizzato per l'attivazione degli acidi carbossilici nelle reazioni di esterificazione) e DIPEA (*N,N*-Diisopropiletilammina) come base utilizzata per la deprotonazione.

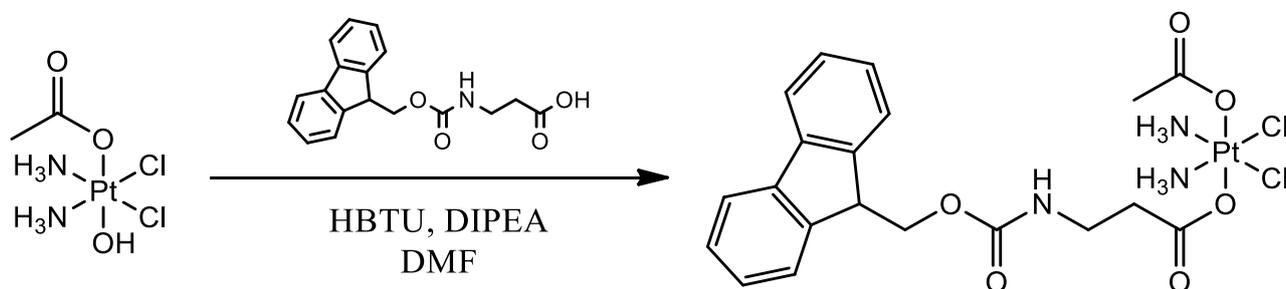


Figura 6.9: Primo step di sintesi del complesso **30**

Il prodotto di questa reazione sarà poi deproteizzato in un secondo step di reazione mediante l'utilizzo di piperidina (fig 6.10).

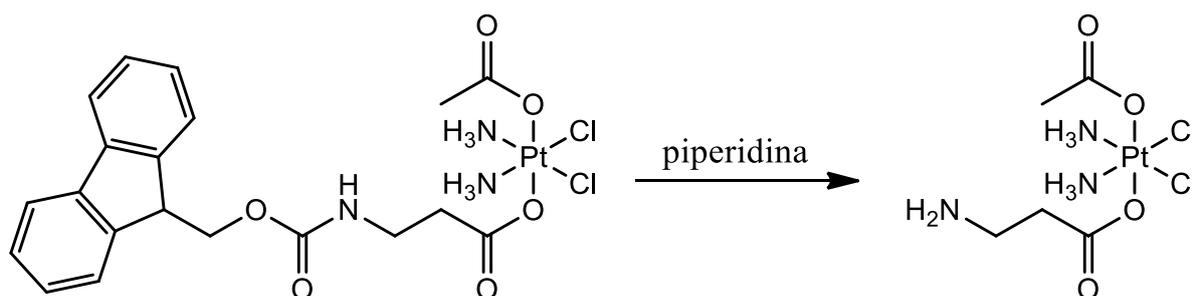


Figura 6.10: Secondo step di sintesi del complesso **30**

SINTESI DI [Pt(ACETATO)(β-ALANINA-FMOC)Cl₂(NH₃)₂]

Procedura: 100 mg di **11** (0.265 mmol), 55,2 mg di Fmoc-β-alanina (0.178 mmol, 0.67 eqv), 116 μl di DIPEA (0.265 mmol, 1 eqv) e 100 mg di HBTU (0.265 mmol, 1 eqv) vengono sospesi in 1,5 ml di DMF e la miscela viene lasciata a reagire per 18 ore a temperatura ambiente al buio. Al termine della reazione, il complesso non reagito (in eccesso) viene rimosso per centrifugazione ed il solvente rimosso mediante evaporatore rotante, ottenendo così un olio di colore arancione. All'olio viene aggiunta acqua e la miscela risultante viene agitata per 10 min quindi la soluzione surnatante viene scartata. L'olio residuo viene disciolto in 0.5 ml di diclorometano ed il prodotto viene precipitato mediante aggiunta di 25 ml di etere dietilico. Il prodotto viene lavato con etere, seccato sotto flusso di azoto e rilavato con acido formico 1% ed acqua. Il prodotto viene asciugato sotto atmosfera di azoto.

Resa: 67 mg (56%)

DEPROTEZIONE DI CIS-[Pt(ACETATO)(β-ALANINA)Cl₂(NH₃)₂FMOC]

Procedura: 50 mg del complesso protetto (0.075 mmol) e 100 μl di piperidina (1.00 mmol) vengono disciolti in 1,4 ml di DMF e la soluzione viene fatta reagire per un ora a temperatura ambiente sotto agitazione. Terminata la reazione, il solvente viene rimosso mediante evaporatore rotante, il prodotto sciolto in 0.5 ml di acetone e precipitato con 5 ml di etere dietilico. Il solido ottenuto viene lavato con etere dietilico, cloroformio e seccato sotto azoto.

Resa: 20 mg (60%)

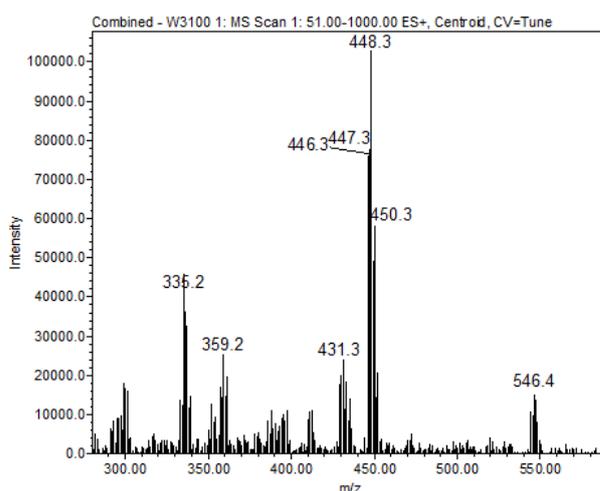
CARATTERIZZAZIONE:

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecniche NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e 30% di MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

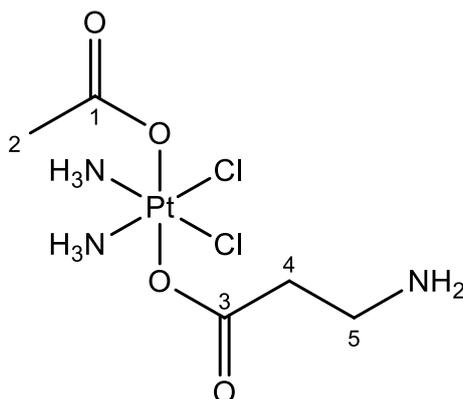
Il cromatogramma mostra un unico picco a 3.7 min relativo a complesso in esame, come



confermato dallo spettro di massa corrispondente (fig. 6.11). Lo spettro di massa ESI mostra un picco principale relativo alla specie pseudo-molecolare $[M+H]^+$ a m/z 448.3 oltre ai picchi meno intensi a m/z 359.2 e 431.3 relativi alle specie $[M-\beta\text{-alanina}]^+$ e $[M-\text{NH}_3]^+$

NMR

Gli spettri del complesso **30** sono stati registrati in d_6 -DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

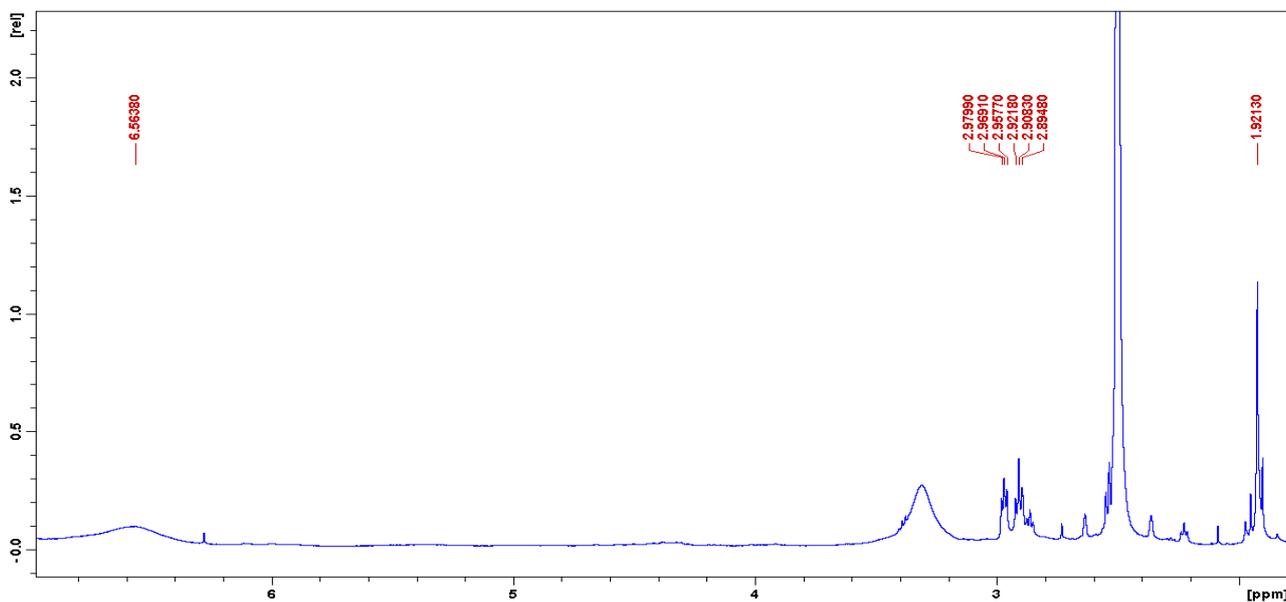


Figura 6.12: Spettro ^1H del complesso **30**

Tabella 6.3: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **30**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	Integrazione
1.92	2	S	3
2.91	4	M	2
2.97	5	M	2
6.56	NH_3	M	6

- Spettro ^{13}C NMR

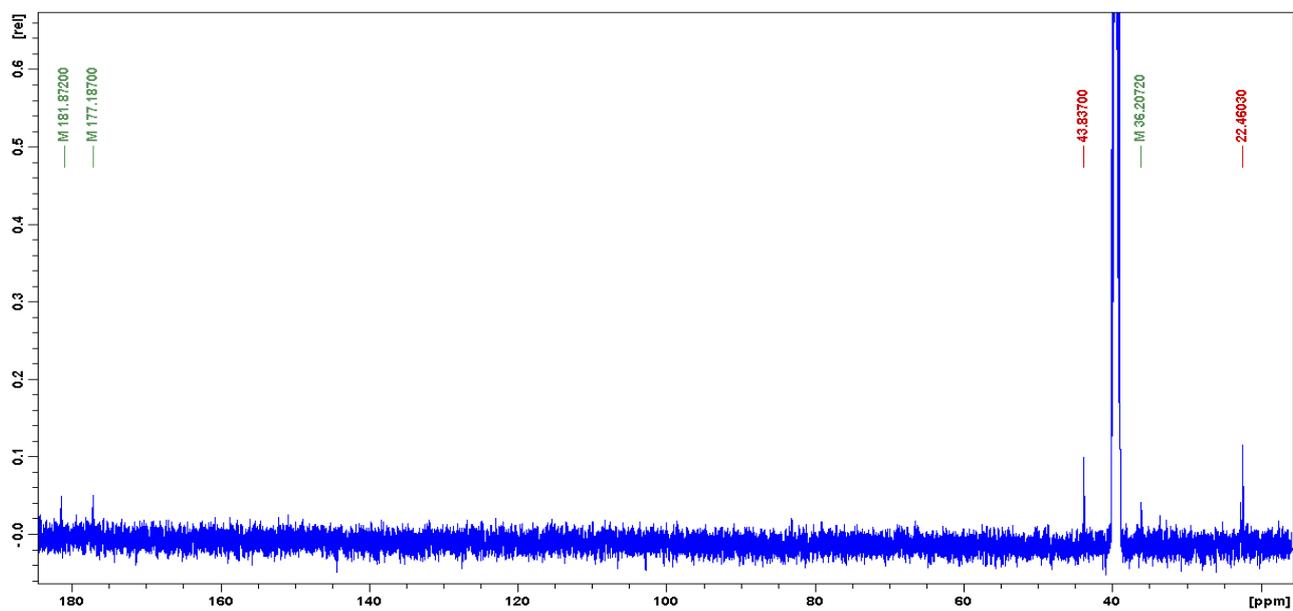


Figura 6.13: Spettro ^{13}C del complesso **30**

Tabella 6.4: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **30**

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>
22.5	2
36.2	5
43.8	4
177.2	1
181.9	3

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

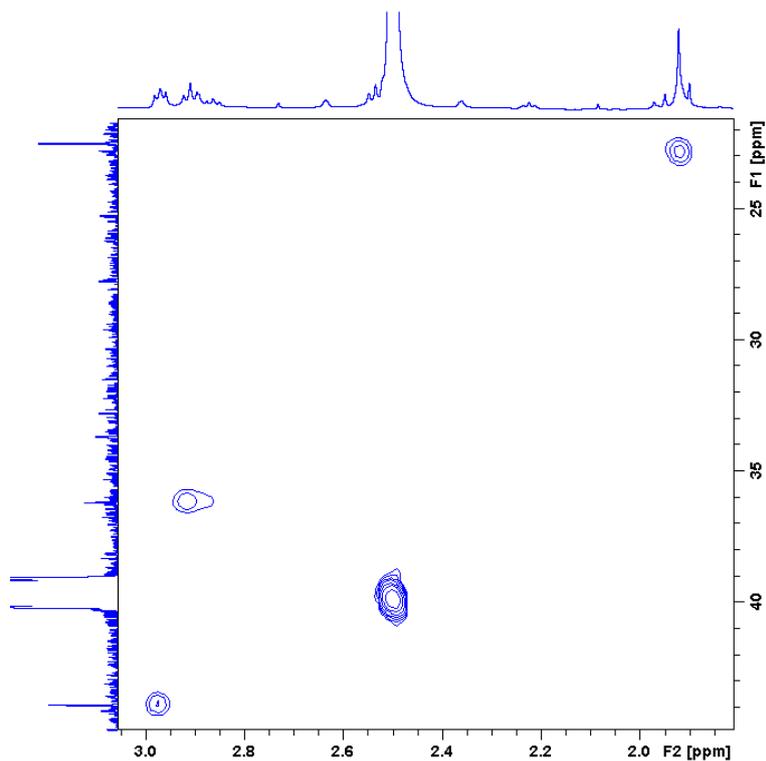


Figura 6.14: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 30

- Spettro ^{195}Pt NMR

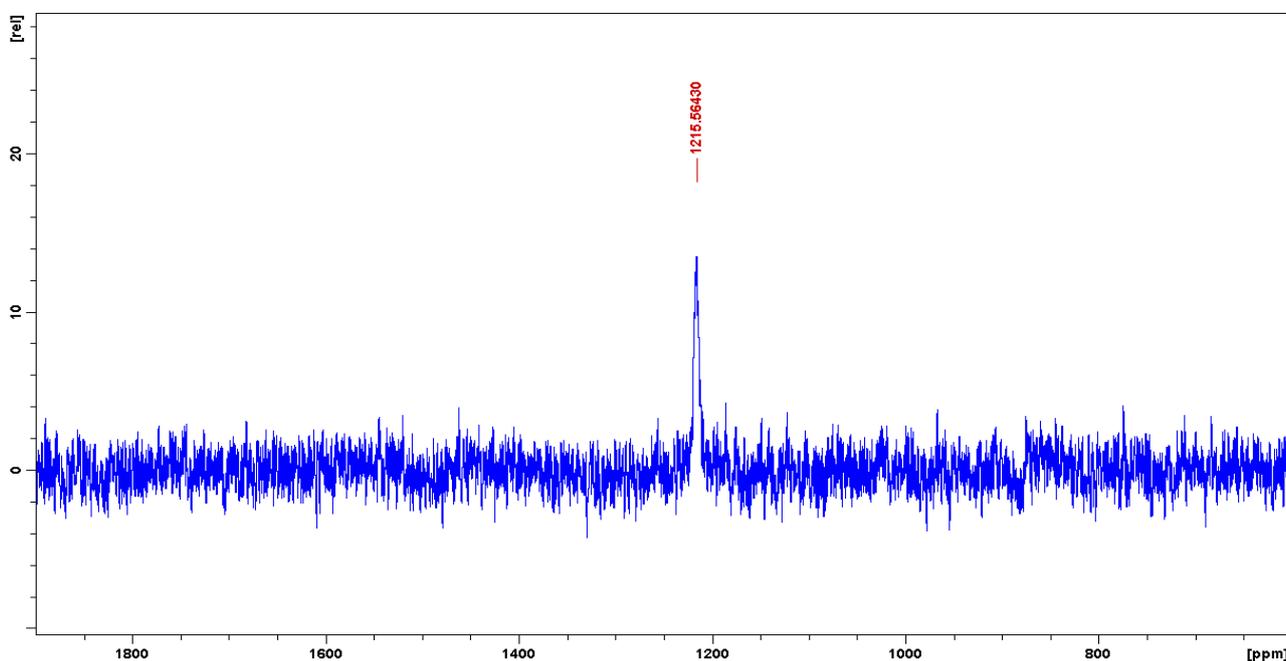


Figura 6.15: Spettro ^{195}Pt del complesso 30

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 1216 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

[Pt(acetato)Cl₂(NH₃)₂(4-pentinoico)] (31)

SINTESI DEL COMPLESSO [Pt(ACETATO)Cl₂(NH₃)₂(4-PENTINOATO)] (31)

Procedura: 6 equivalenti di DCC (185.3 mg, 0.90 mmol) e 5 equivalenti di acido 4-pentinoico (72.1 mg, 0.74 mmol) vengono disciolti in 1 ml di DMF e la soluzione mantenuta per 15 min in bagno ad ultrasuoni a temperatura ambiente. Il precipitato viene rimosso e la soluzione usata tal quale per lo *step* successivo.

Alla soluzione di acido attivato vengono aggiunti 56.0 mg di **11** (0.15 mmol) sospesi in 1 ml di DMF e la miscela fatta reagire per 24 ore a temperatura ambiente. Al termine, il precipitato viene scartato mediante centrifugazione ed il solvente rimosso mediante evaporatore rotante. Il prodotto viene precipitato mediante aggiunta di 10 ml di etere dietilico ed il solido cristallino lavato con etere dietilico (3x5 ml).

Resa: 40 mg (58%)

CARATTERIZZAZIONE:

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecniche NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

ESI-MS e RP-HPLC

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e 50% di MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 6.2 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro ESI-MS (fig. 6.16), dove è possibile osservare il picco relativo allo ione molecolare $[M+H]^+$ con valore di $m/z = 457.3$ e *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt.

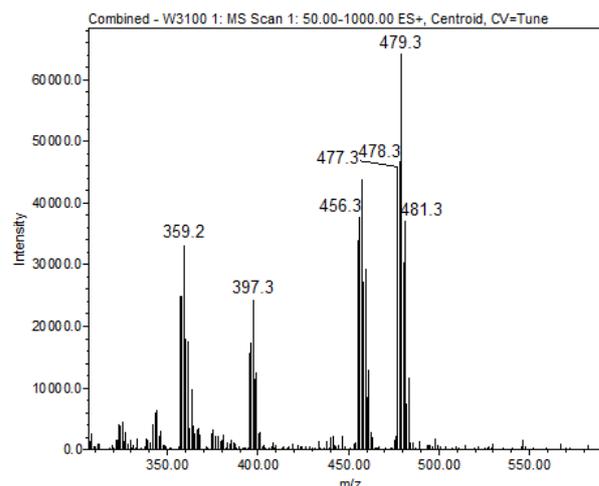
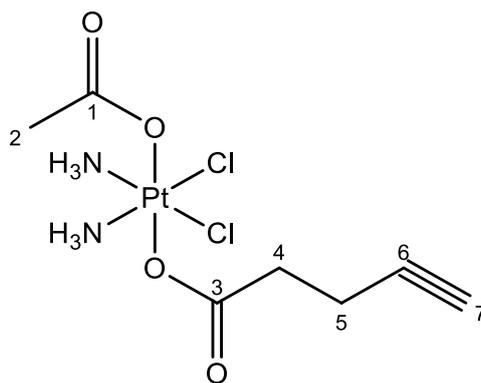


Figura 6.16: Spettro di massa del complesso **31**

NMR

Gli spettri del complesso **31** sono stati registrati in d₆-DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

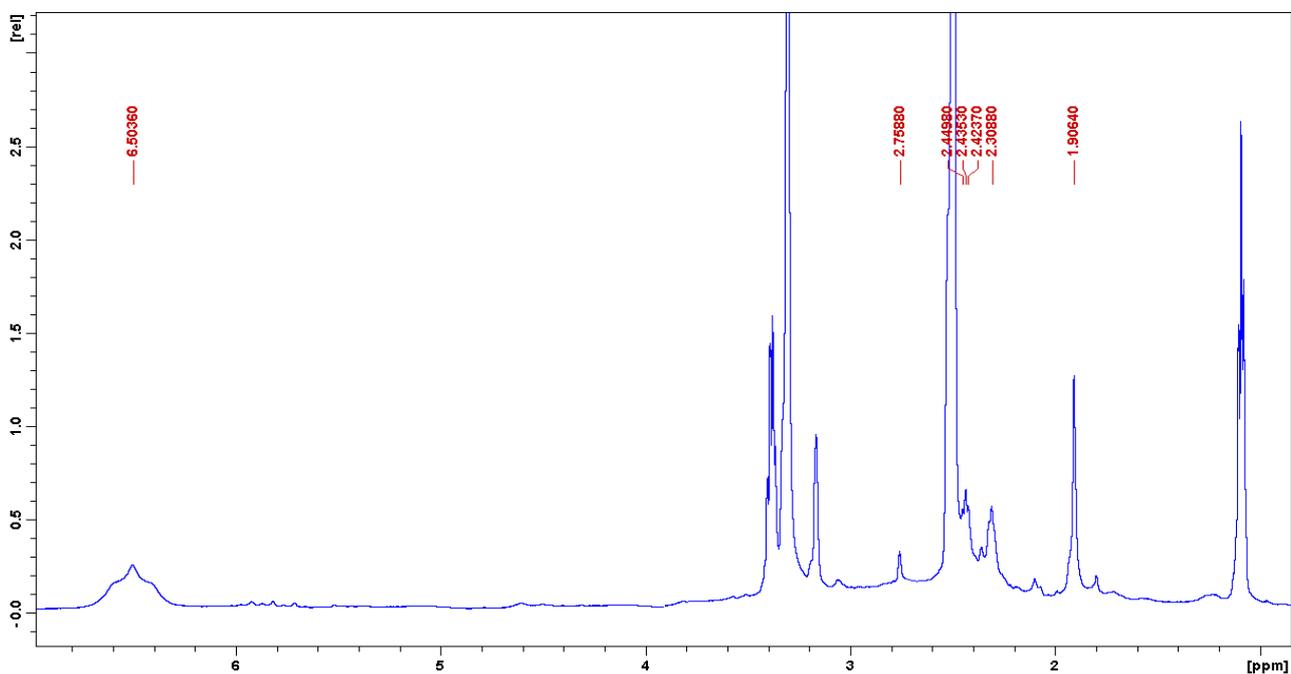


Figura 6.17: Spettro ^1H del complesso **31**

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (1.09 e 3.38 ppm) e metanolo (3.16 ppm)

Tabella 6.5: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **31**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	Integrazione
1.91	2	s	3
2.31	5	m	2
2.44	4	m	2
2.76	7	s	1
6.50	NH_3	m	6

- Spettro ^{13}C NMR

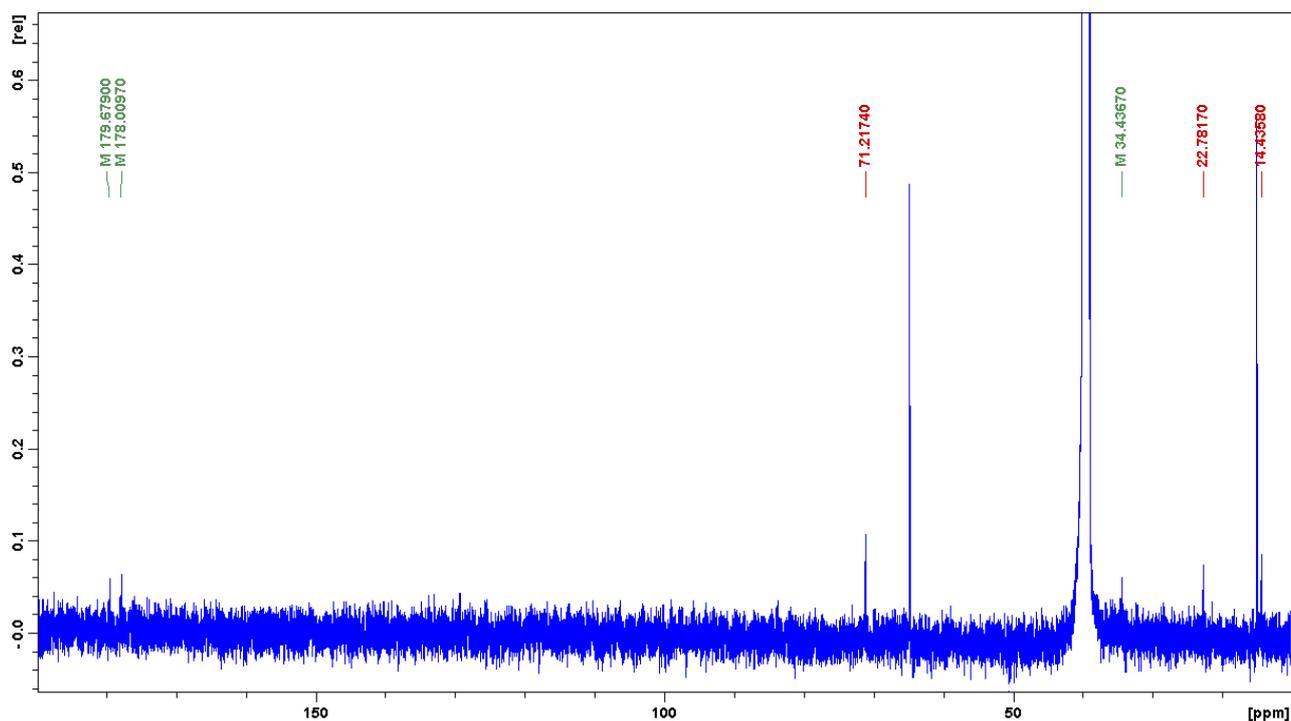


Figura 6.18: Spettro ^{13}C del complesso **31**

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (15.12 e 62.05 ppm).

Tabella 6.6: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **31**

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	Assegnazione
14.4	5
22.8	2
34.4	4
71.2	7
178.0	1
179.7	3

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

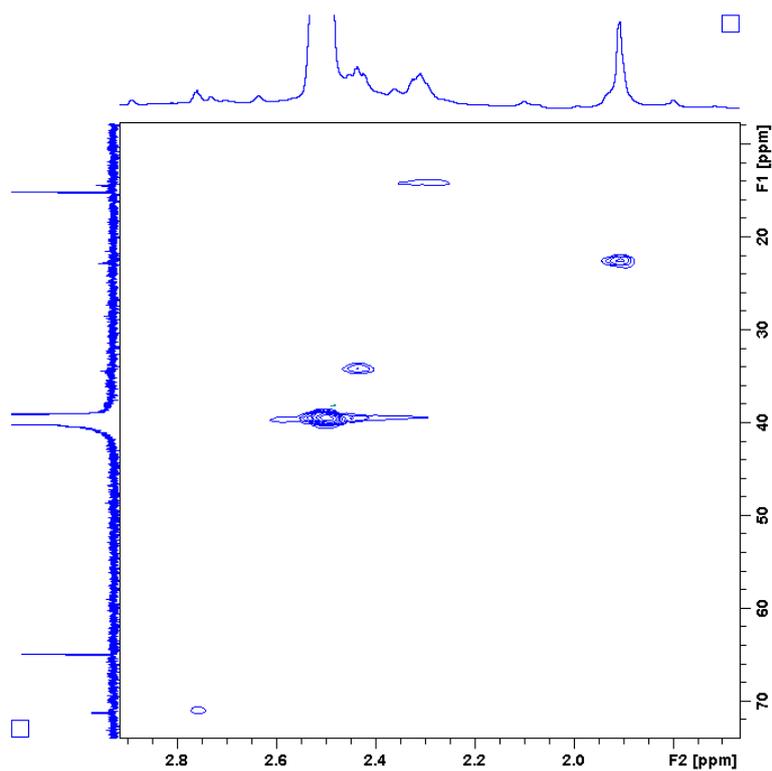


Figura 6.19: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso **31**

- Spettro ^{195}Pt NMR

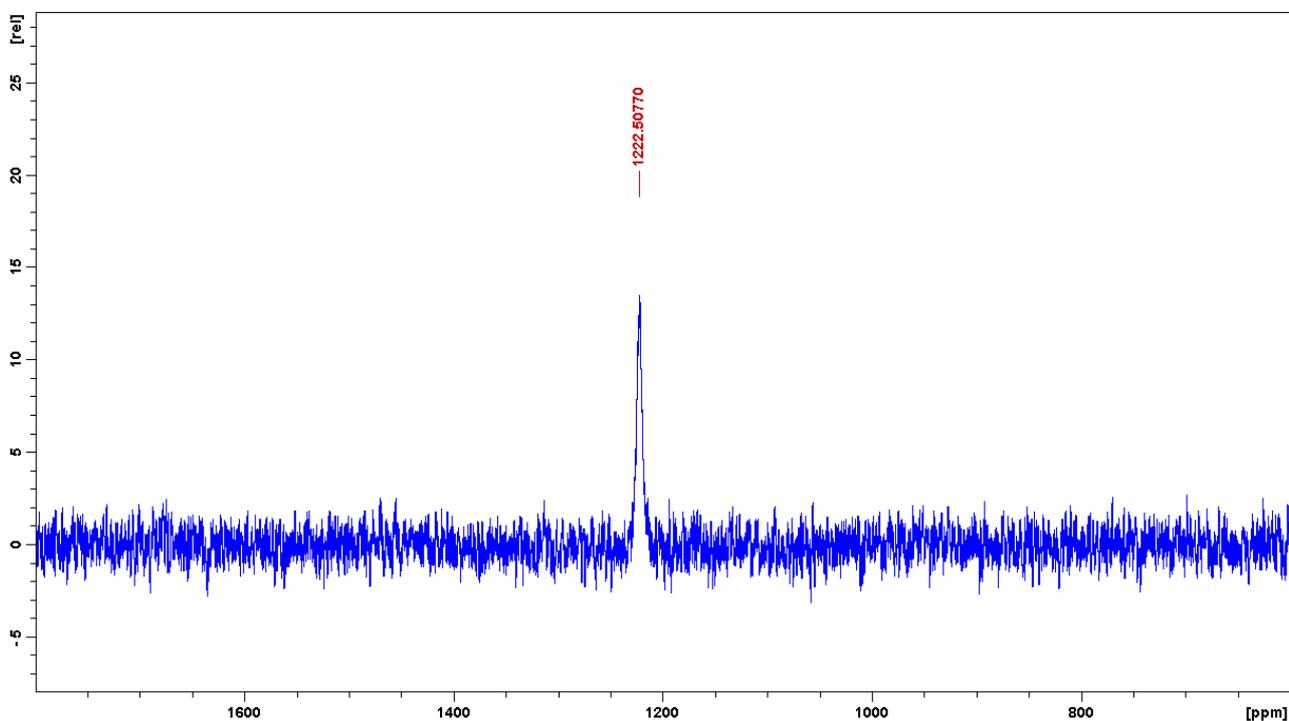


Figura 6.20: Spettro ^{195}Pt del complesso **31**

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 1223 ppm, zona di *chemical shift* compatibile con complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

6.2 Reazioni di accoppiamento con modelli

Dei quattro complessi con leganti bifunzionali (**23**, **29**, **30** e **31**) è stata studiata la formazione di un legame (*coupling*) con molecole-modello di vettori per DTD.

In particolare sono stati impiegati come modelli:

- 1.** Butilammina per il complesso **23**
- 2.** Furano per il complesso **29**
- 3.** Acido butanoico per il complesso **30**
- 4.** 11-Azido-3,6,9-triossaundecan-1-ammina per il complesso **31**

6.2.1 Accoppiamento acido carbossilico-ammina modello

La reazione di *coupling* prevede la formazione di un legame ammidico per reazione tra il gruppo carbossilico libero del complesso **23** e l'ammina modello (butilammina) (fig 6.21).

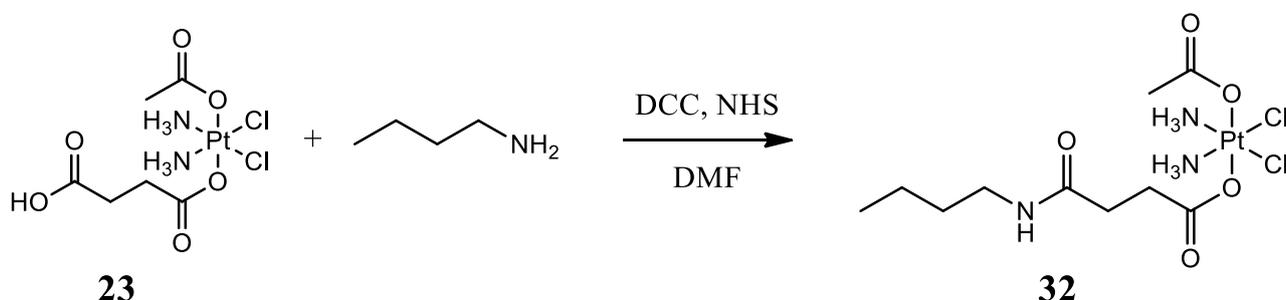


Figura 6.21: Reazione del complesso **23** con gruppi amminici

Per effettuare la reazione di accoppiamento è necessario attivare l'acido con DCC e NHS (N-idrossisuccinimide) (fig. 6.22).

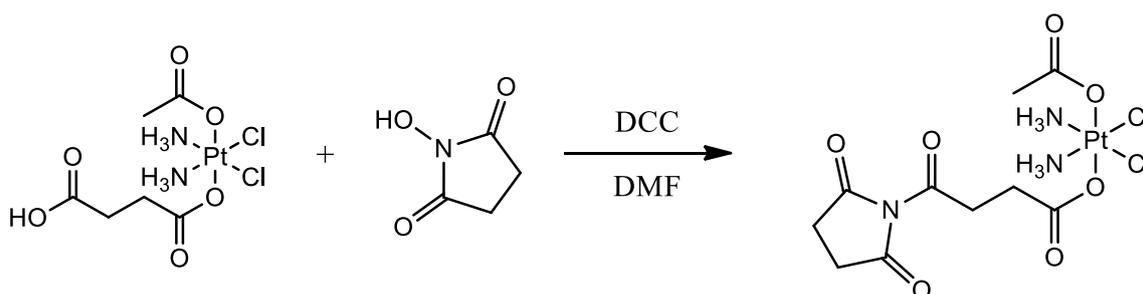


Figura 6.22: Reazione di attivazione del gruppo carbossilico

ATTIVAZIONE DEL GRUPPO CARBOSSILICO

Procedura: 64 mg (0.170 mmol) del complesso **23** e 42 mg (0.204 mmol) di DCC vengono sospesi in 3 ml di DMF e la sospensione viene lasciata in agitazione a 0°C per un'ora. Alla sospensione vengono poi aggiunti 23.5 mg (0.204 mmol) di NHS e la reazione lasciata per un'ulteriore ora a 0°C prima di essere portata a temperatura ambiente per ulteriori 18 ore. Terminata la reazione, si pone il pallone nel congelatore per 15 minuti, per favorire la precipitazione della DCU. Successivamente si rimuove il precipitato centrifugando la miscela. Il volume della miscela viene ridotto mediante evaporatore rotante ed il prodotto, ridisciolto con qualche goccia di etanolo, viene precipitato aggiungendo etere dietilico. Il solido così ottenuto viene lavato con etere dietilico.

Resa: 50 mg (62%)

REAZIONE DI FORMAZIONE DELL'AMIDATO

Procedura: 50 mg (0.087 mmol, 1 eqv) di complesso “attivato” vengono fatti reagire con 18.00 μ l (0.174 mmol, 2 eqv) di butilammina in 2 ml di DMF per 18 ore a temperatura ambiente al buio. Il precipitato formatosi (DCU) viene rimosso per centrifugazione ed il solvente rimosso mediante evaporatore rotante. Il residuo viene disciolto in 2 ml di metanolo ed il prodotto precipitato con 25 ml di etere dietilico e lavato 4 volte con una soluzione metanolo:etere 1:4.

Resa: 30 mg (66%)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecniche NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

HPLC-MS

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 50% acido formico 1% e 50% di MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 9.1 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa corrispondente (fig. 6.23). Lo spettro di massa mostra segnali a m/z 532.4 corrisponde a $[M+H]^+$, m/z 359.2 $[M-(succammina)]^+$, m/z 554.4 $[M+Na]^+$ e m/z 472.3 $[M-acetato]^+$.

NMR

Gli spettri del complesso **32** sono stati registrati in d_6 -DMSO a 300K.

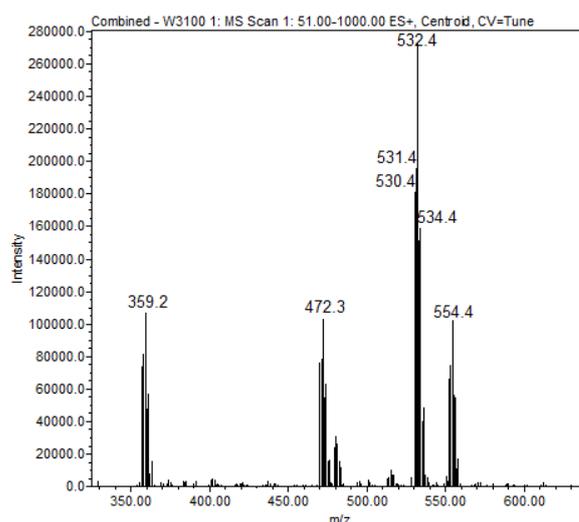
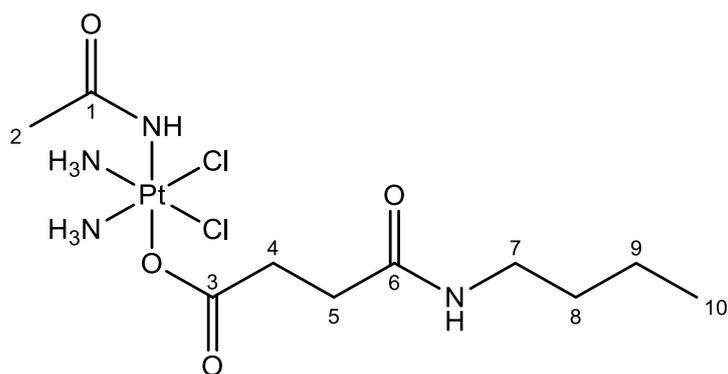


Figura 6.23: Spettro di massa del complesso **32**



• Spettro ^1H NMR

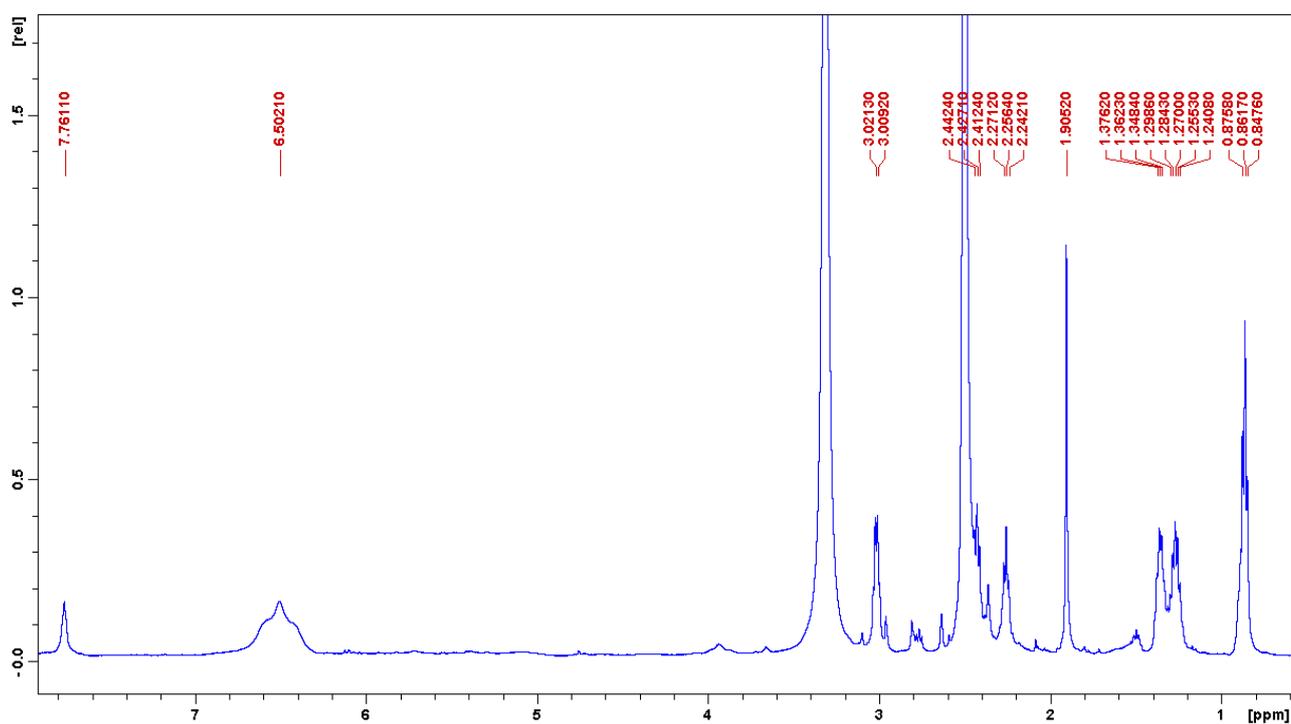


Figura 6.24: Spettro ^1H del complesso 32

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (1.09 e 3.38 ppm) e metanolo (3.16 ppm)

Tabella 6.7: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 32

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
0.86	10	t	7	3
1.27	9	m		2
1.36	8	m		2
1.91	2	s		3

2.26	5	m		2
2.43	4	m		2
3.01	7	d	6	2
6.50	NH ₃	m		6
7.76	NH	s		1

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^1H è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).

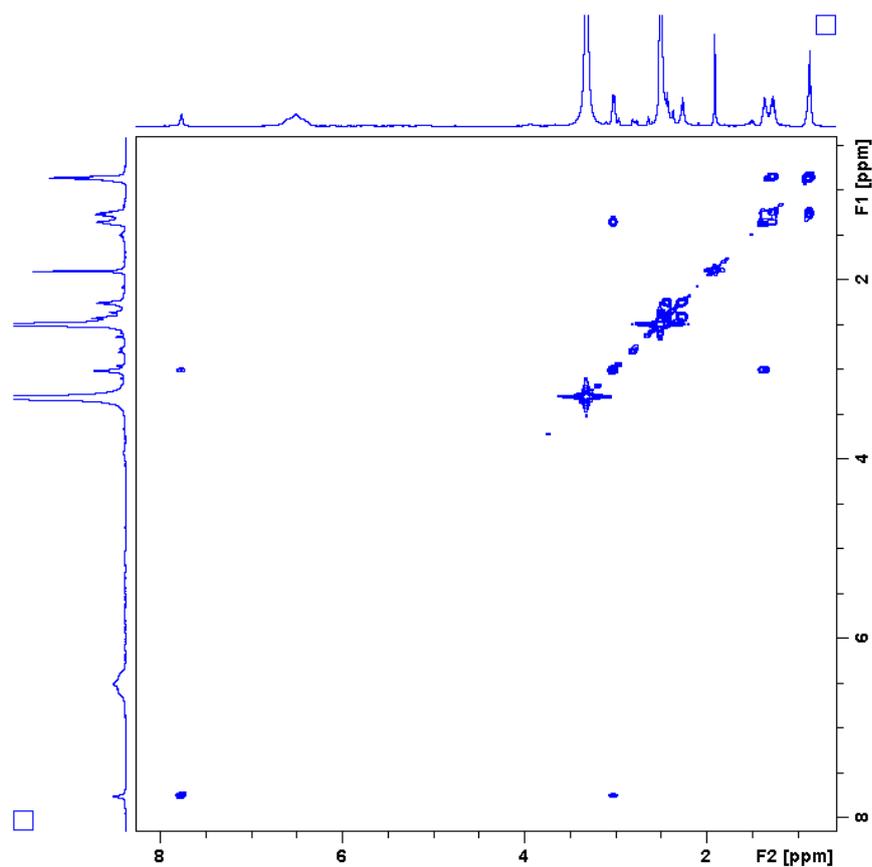


Figura 6.25: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 32

- Spettro ^{13}C NMR

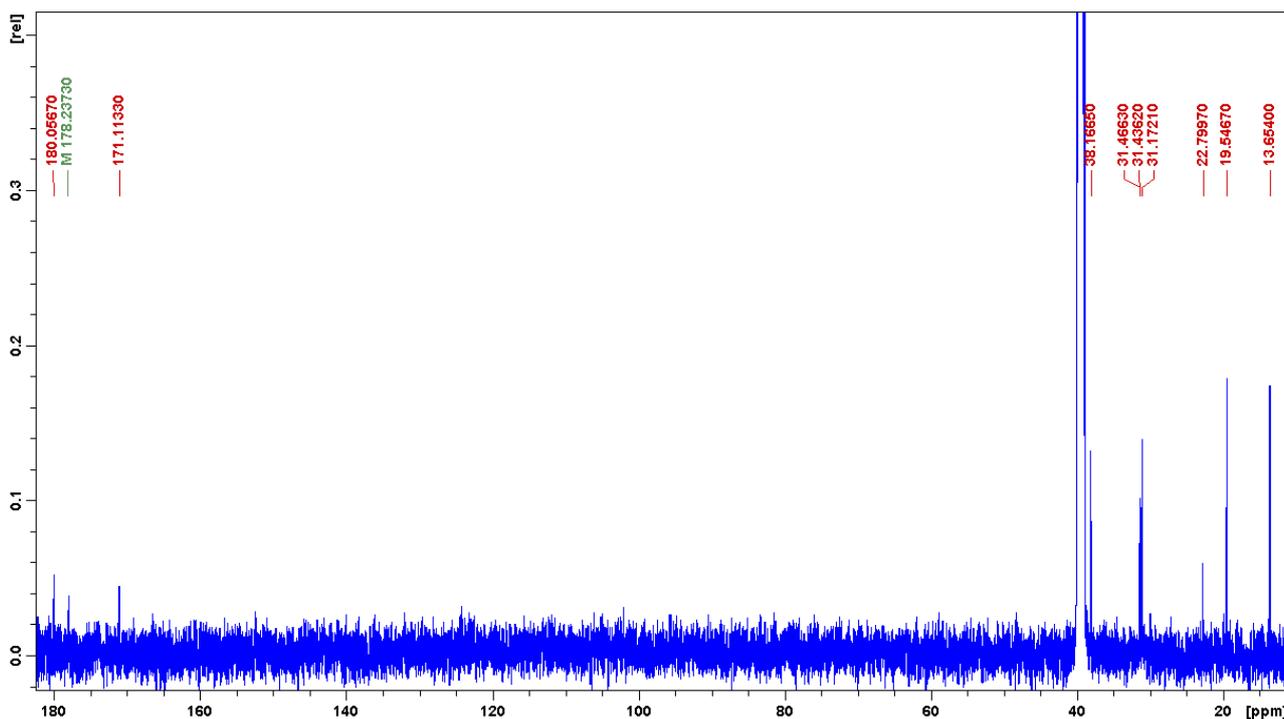


Figura 6.26: Spettro ^{13}C del complesso **32**

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (15.12 e 62.05 ppm).

Tabella 6.8: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **32**

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>
13.7	10
19.6	9
22.8	2
31.2	8
31.4	5
31.5	4
38.2	7
171.1	6
178.2	1
180.1	3

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

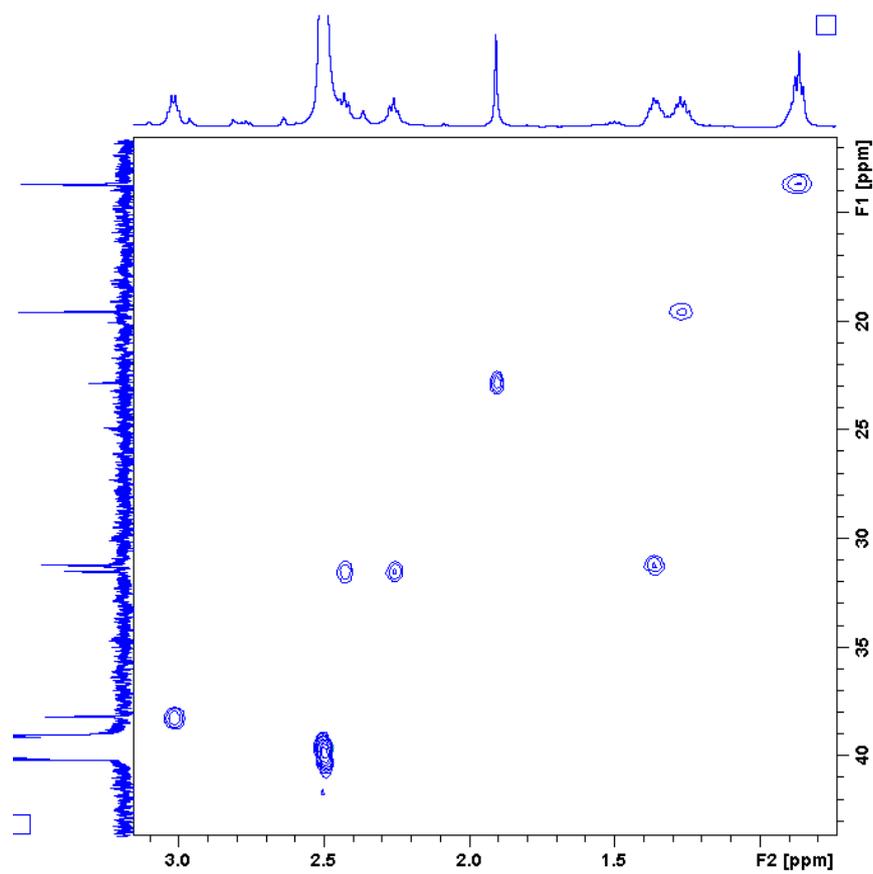


Figura 6.27: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 32

- Spettro ^{195}Pt NMR

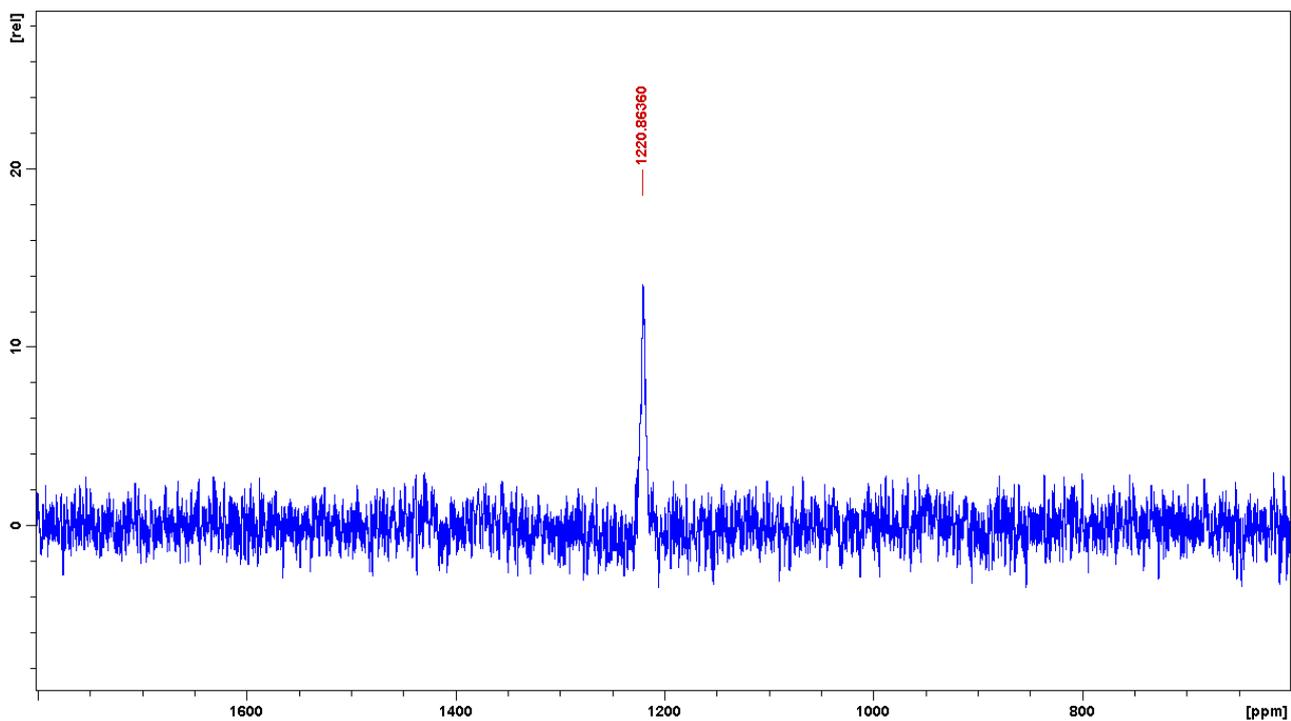


Figura 6.28: Spettro ^{195}Pt del complesso 32

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 1221 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

6.2.2 Accoppiamento maleimide-furano

La seconda tipologia di accoppiamento complesso-macromolecola si basa sulla reazione tra il legante assiale contenente maleimide del complesso **29** ed una molecola modello. La maleimide possiede un doppio legame in grado di dare:

- Addizione di un tiolo, in presenza di una molecola contenente un gruppo SH poco ingombrato (fig. 6.29)

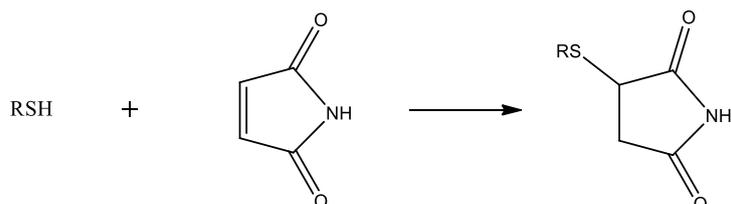


Figura 6.29: Reazione di addizione tra maleimide e tiolo

- Cicloaddizione [4+2], in presenza di una molecola che possiede due doppi legami coniugati stericamente poco ingombrati: reazione di Diels-Alder (fig. 6.30)

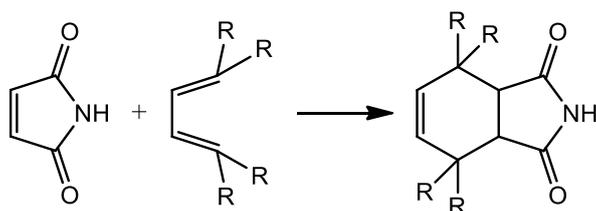


Figura 6.30: Reazione di Diels-Alder tra maleimide e furano

A questo scopo è stato utilizzato il furano come molecola modello per effettuare la reazione di cicloaddizione [4+2] (fig. 6.31). La reazione è stata seguita via NMR per verificare la formazione del legame senza isolare il complesso finale.

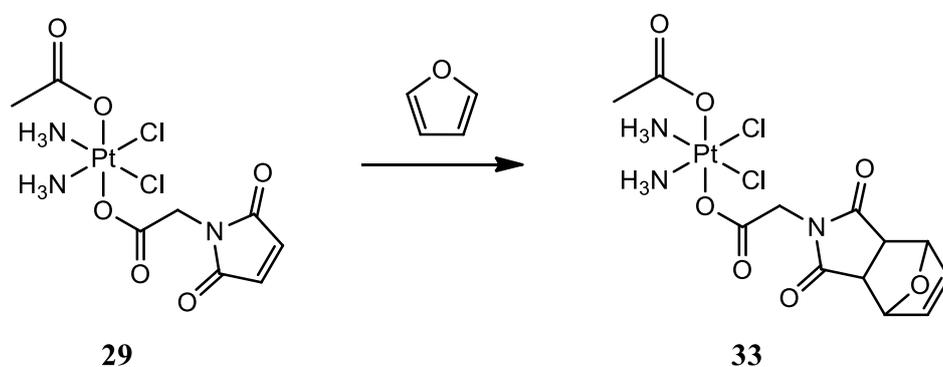


Figura 6.31: Reazione di cicloaddizione del complesso **29** in presenza di furano

Procedura: Il complesso **29** è stato sciolto in D₂O (concentrazione finale 20 mM) in presenza di furano alla concentrazione 40 mM. La reazione è stata seguita per 18 ore mantenendo la temperatura a 300K (fig 6.32).

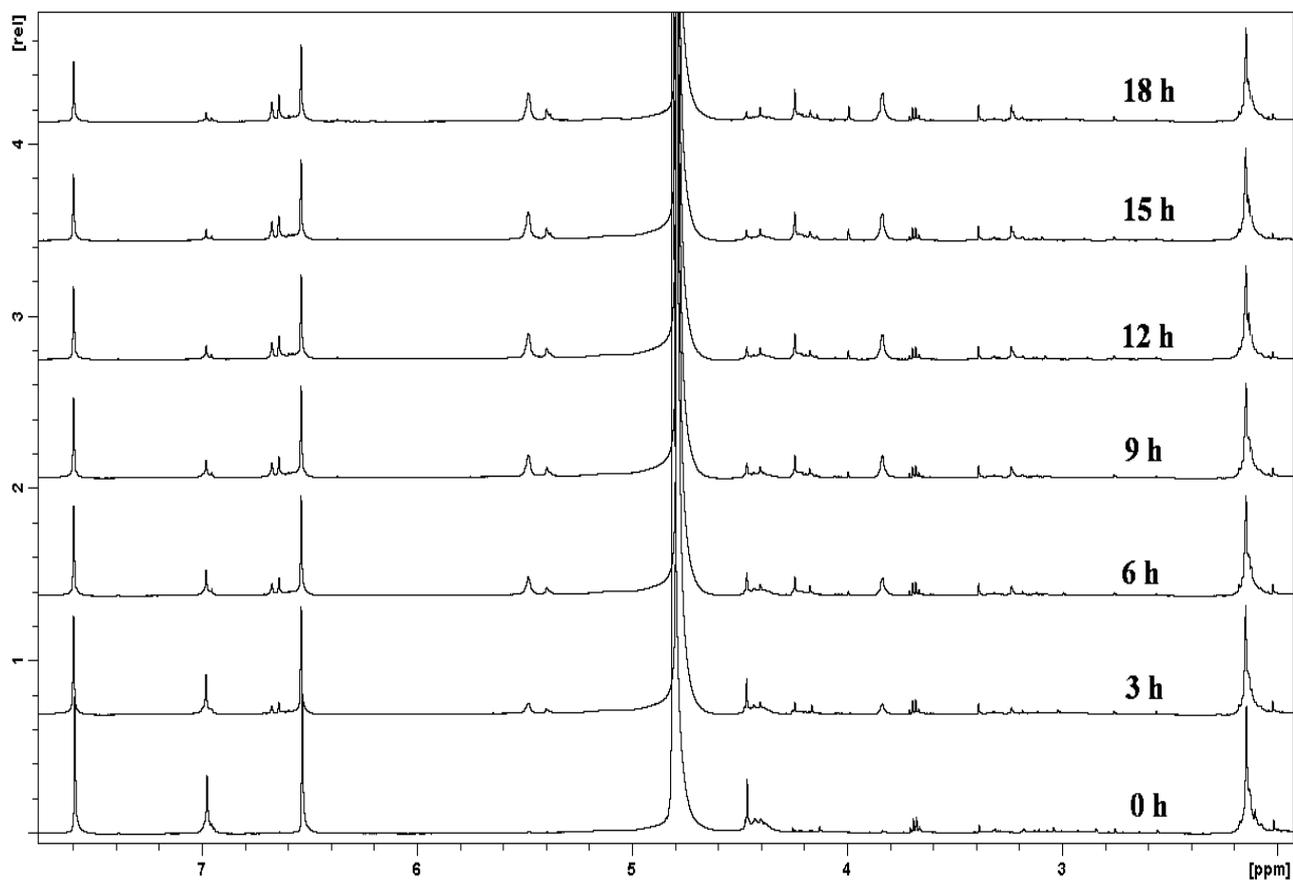


Figura 6.32: Reazione Diels-Alder lungo 18h

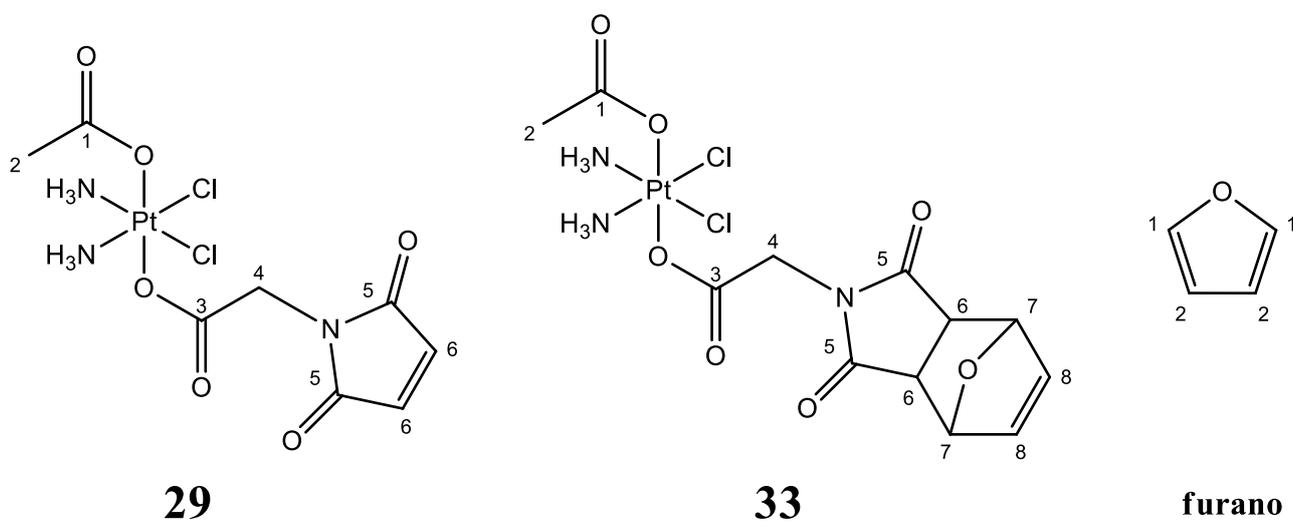


Figura 6.33: Struttura dei reagenti e del prodotto di reazione

Tabella 6.9: Assegnazione dei segnali $^1\text{H-NMR}$

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
2.12	$2_{(29)}-2_{(33)}$	6.51	2_{furano}
3.83	$6_{(33)}$	6.64	$8_{(33)}$
3.99		6.67	
4.24	$4_{(33)}$	6.96	$6_{(29)}$
4.45	$4_{(29)}$	7.60	1_{furano}
5.39	$7_{(33)}$		
5.48			

Come si può vedere dalla variazione dei segnali $^1\text{H-NMR}$ (fig.6.32), nelle 18 ore di analisi il complesso iniziale reagisce quasi completamente con il furano mediante cicloadizione [4+2].

Gli spettri della reazione dopo 18h (fig. 6.34) mostrano lo sdoppiamento dei segnali (nella zone tra 3.8 e 6.7 ppm) relativi al prodotto a causa della formazione di due isomeri (exo e endo) essendo la reazione non enantioselettiva in queste condizioni^{[2][3]} (fig. 6.35).

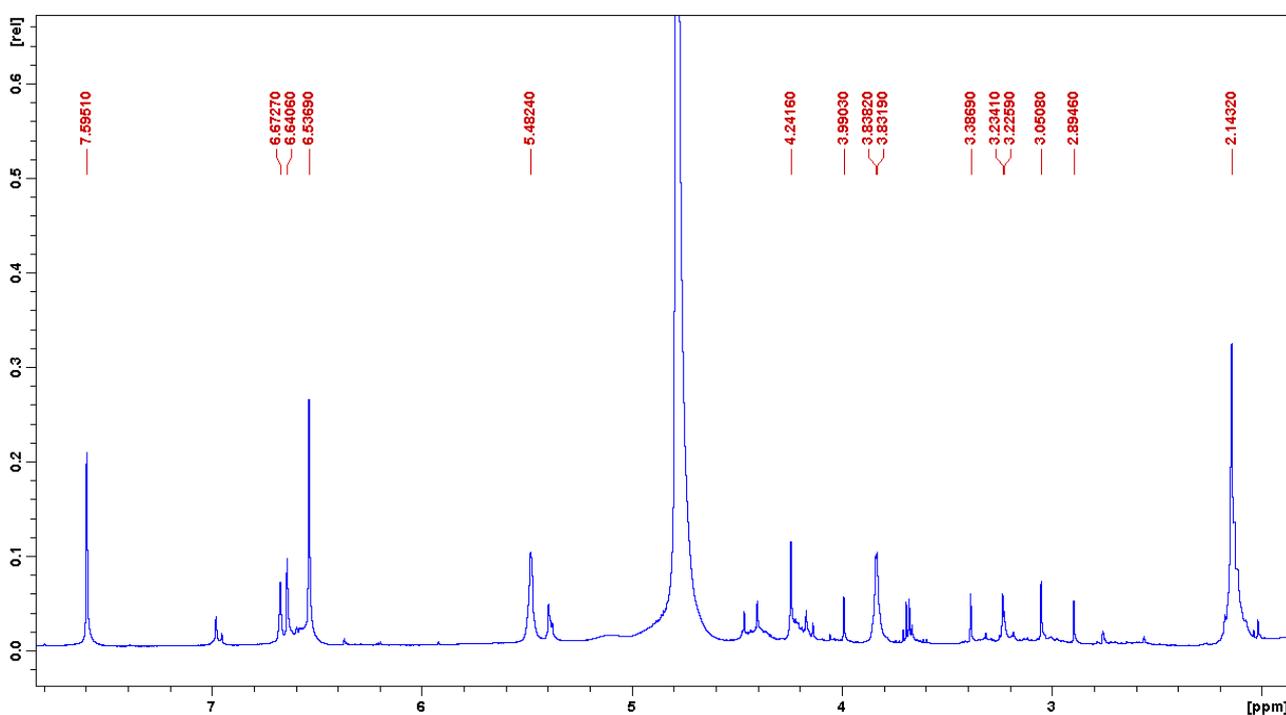


Figura 6.34: Spettro $^1\text{H-NMR}$ dopo 18h

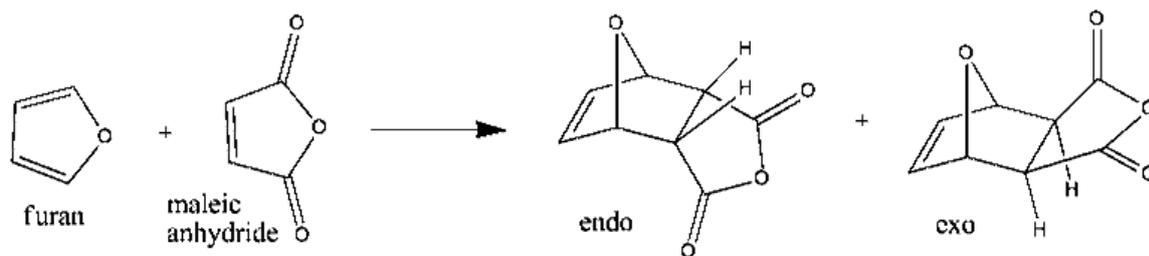


Figura 6.35: Isomeri prodotti dalla cicloaddizione tra maleimide e furano

La reazione ha mostrato come entro le 18 ore di analisi il complesso possa essere legato a vettori contenenti molecole di furano (o sui derivati), mediante la reazione di Diels-Alder, con ottime rese.

6.2.3 Accoppiamento β -alanina-acido carbossilico

La terza tipologia di accoppiamento studiato prevede la reazione tra gruppi carbossilici presenti sul vettore e gruppi amminici presenti sul complesso di Pt^{IV} d'interesse.

A questo scopo è stato utilizzato un acido carbossilico alifatico a catena corta (acido n-butanoico o butirico) come molecola modello da far reagire con il gruppo amminico del complesso **30**.

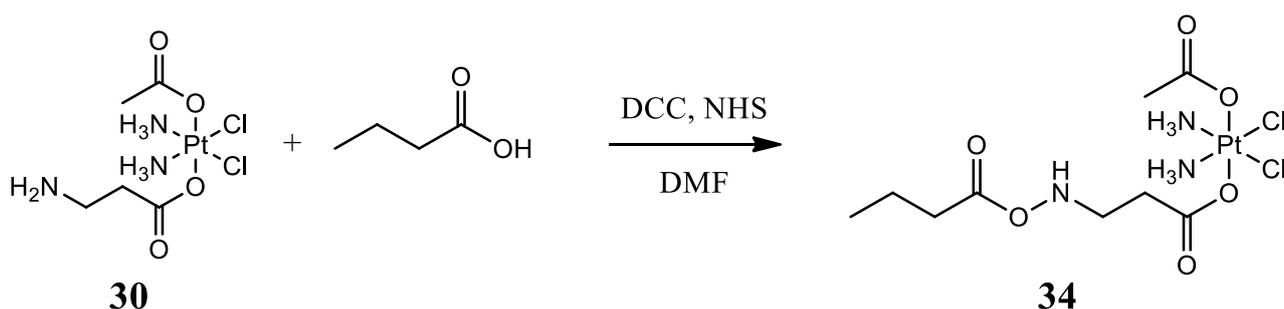


Figura 6.36: schema di reazione del complesso 30 con l'acido butirico

Procedura: 38 mg di DCC (0,180 mmol, 4 eqv) vengono fatti reagire in 1 ml di DMF con 8.2 μ l (0.090 mmol, 2 eqv) di acido butanoico in bagno di ghiaccio per un'ora. Alla reazione vengono quindi aggiunti 21 mg (0,180 mmol, 4 eqv) di NHS e la miscela viene mantenuta per un'altra ora a 0°C; la temperatura viene quindi fatta tornare a temperatura ambiente e la reazione viene condotta in queste condizioni per altre 16h. Il precipitato (DCU) viene rimosso mediante centrifugazione ed alla soluzione vengono aggiunti 20 mg di **30** (0.045 mmol, 1 eqv). La miscela di reazione viene agitata a temperatura ambiente per 24 ore. Al termine della reazione il solvente viene rimosso mediante evaporatore rotante ed il prodotto viene precipitato e lavato con etere dietilico.

Resa: 11 mg (45%)

Il complesso è stato caratterizzato mediante tecniche NMR, ESI-MS e RP-HPLC.

HPLC-MS

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e 30% di MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 3.8 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro di massa corrispondente (fig. 6.37) dove è possibile riscontrare i picchi a m/z 519.3, 359.2, 448.3 e 299.2 rispettivamente corrispondenti a $[M+H]^+$, $[M-(\beta\text{-alanina-acido})]^+$, $[M\text{-acido}]^+$ e $[M\text{-acetato-(}\beta\text{-alanina-acido)}]^+$.

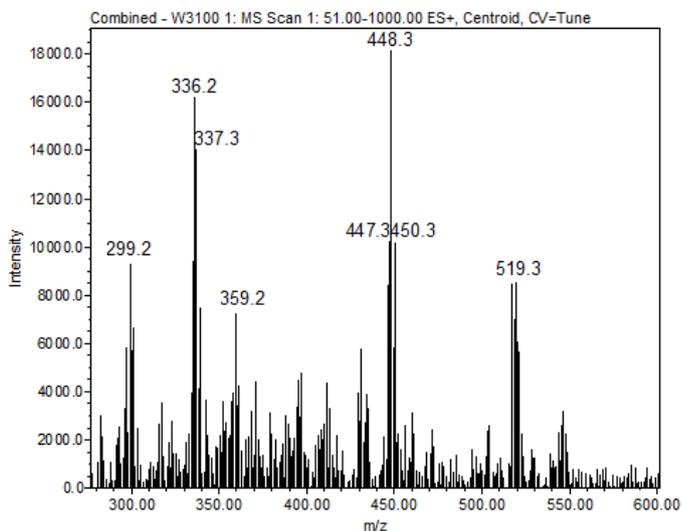
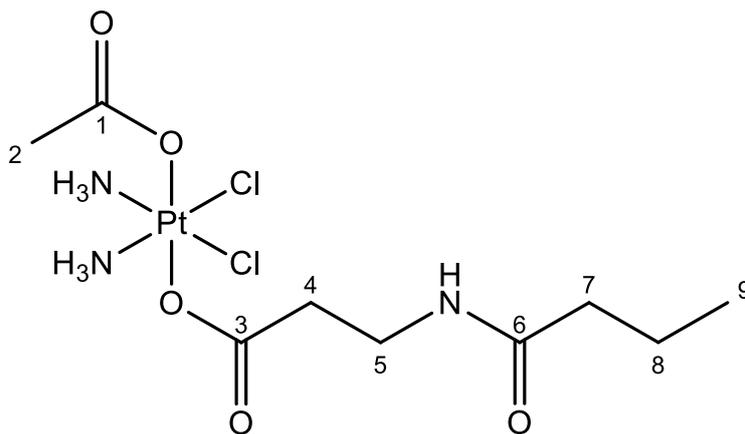


Figura 6.37: Spettro di massa del complesso 34

NMR

Gli spettri del complesso **34** sono stati registrati in d_6 -DMSO a 300K.



- Spettro ^1H NMR

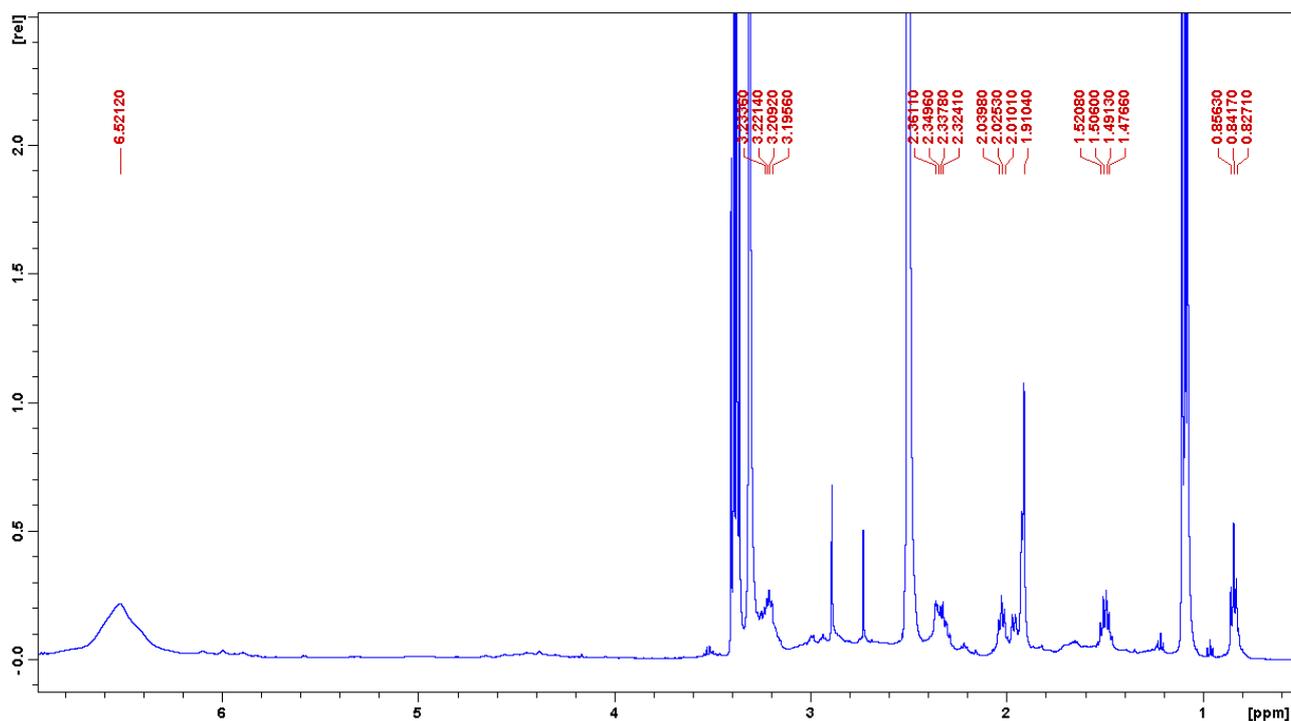


Figura 6.38: Spettro ^1H del complesso 34

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (1.09 e 3.38 ppm) e DMF (2.73, 2.89 e 7.95 ppm)

Tabella 6.10: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 34

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>	<i>Molteplicità</i>	<i>J (Hz)</i>	<i>Integrazione</i>
0.84	9	t	7.3	3
1.50	8	q	7.3	2
1.91	2	s		3
2.02	7	t	7.6	2
2.35	4	m		2
3.22	5	m		2
6.52	NH_3	m		6

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^1H è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy).

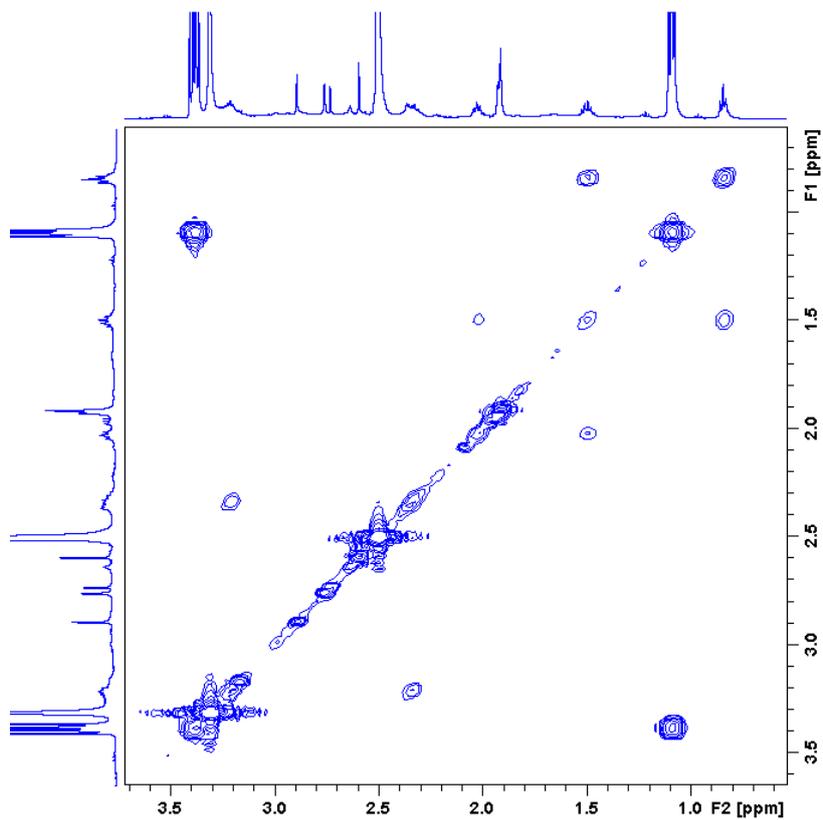


Figura 6.39: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso 34

- Spettro ^{13}C NMR

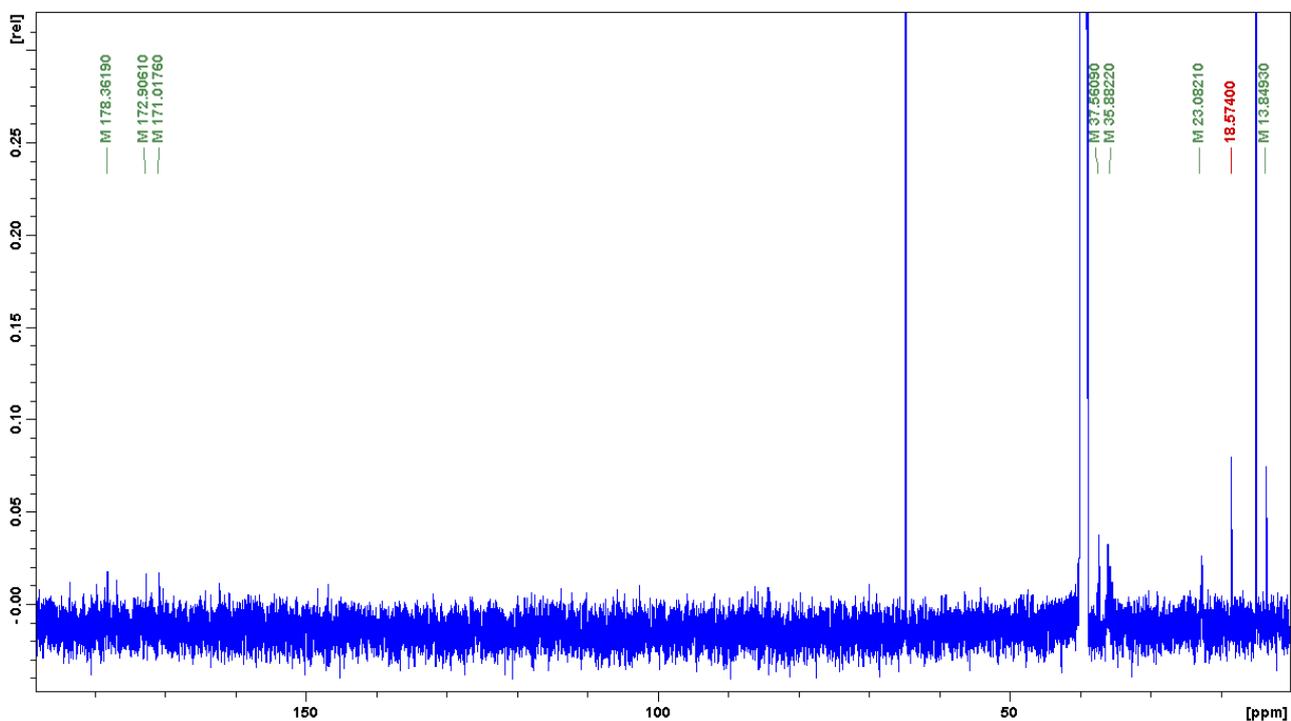


Figura 6.40: Spettro ^{13}C del complesso 34

Lo spettro presenta tracce di etere dietilico (15.12 e 62.05 ppm).

Tabella 6.11: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **34**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
13.8	9	37.6	7
18.6	8	171.0	6
23.0	2	172.9	3
35.9	4-5	178.4	1

L'attribuzione dei segnali dello spettro ^{13}C è stata confermata analizzando lo spettro bidimensionale ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

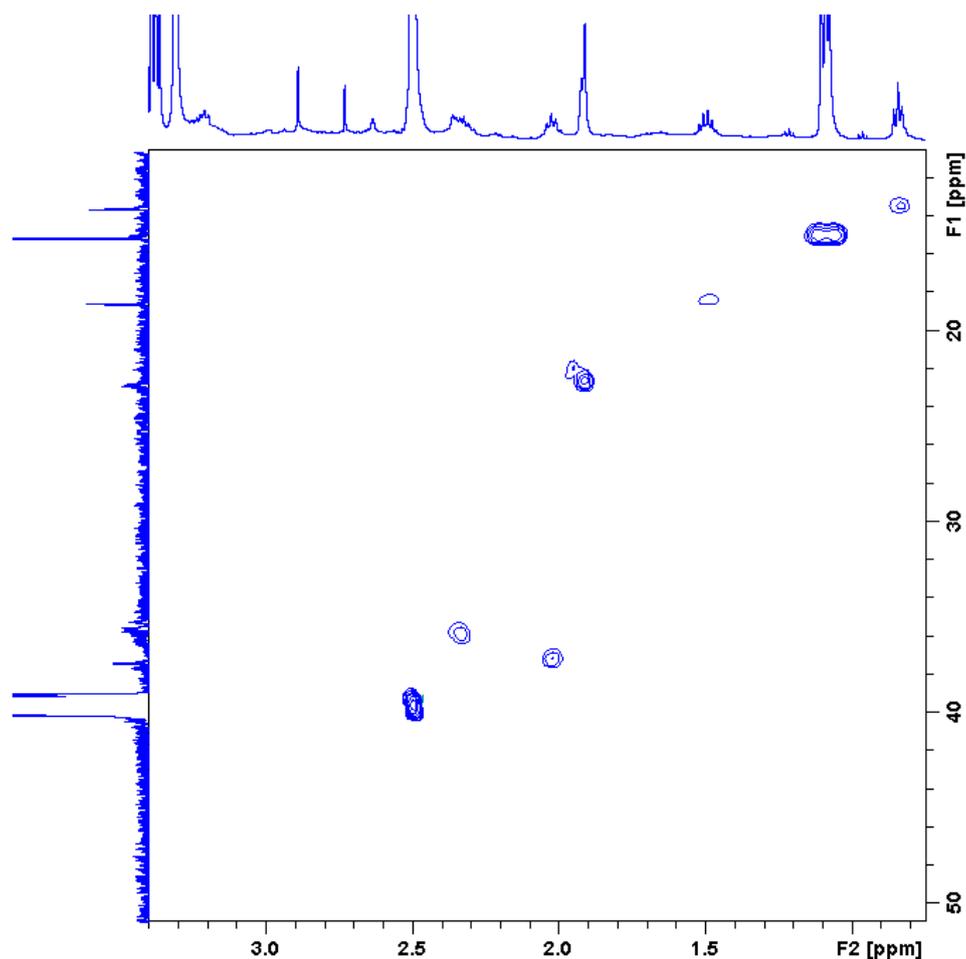


Figura 6.41: Spettro ^1H - ^{13}C HSQC del complesso **34**

- Spettro ^{195}Pt NMR

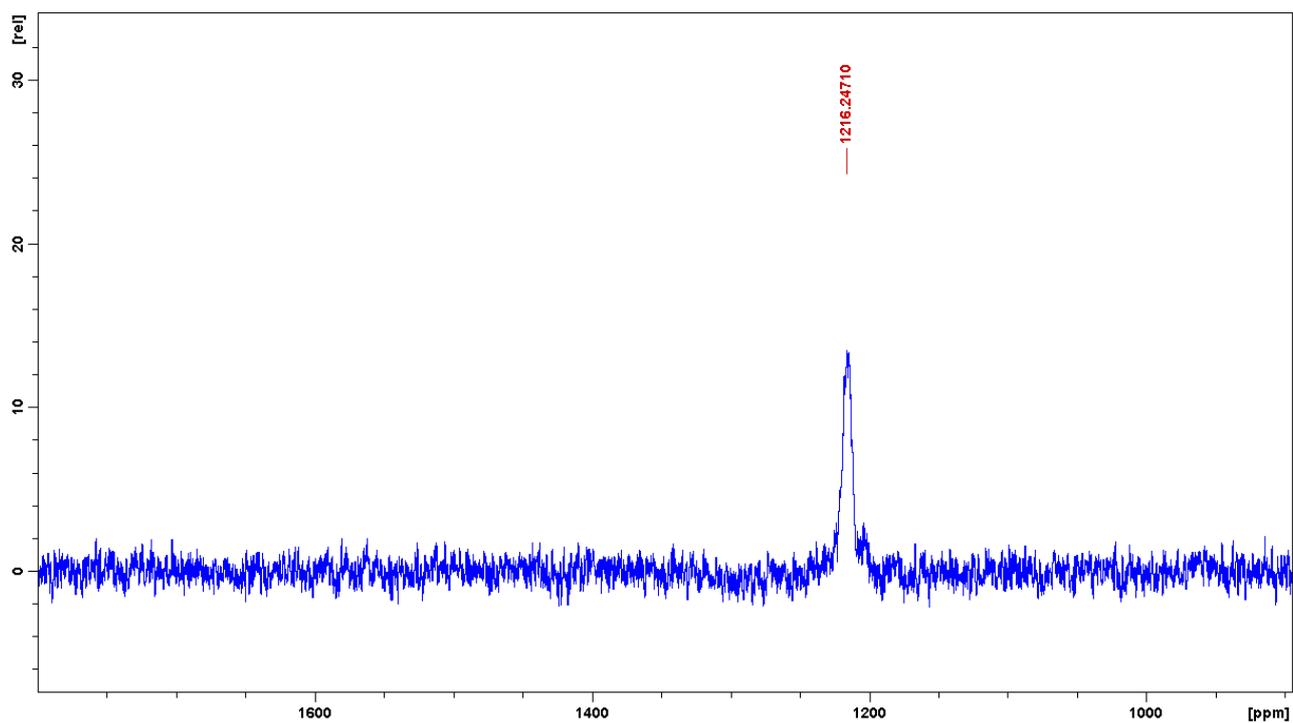


Figura 6.42: Spettro ^{195}Pt del complesso **34**

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a 1216 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{IV} con intorno chimico $\text{PtN}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$.

6.2.4 Accoppiamento alchino-azide modello

L'ultima tipologia di accoppiamento prevede la reazione tra l'alchino terminale del complesso **31** ed un azide modello attraverso una reazione di cicloaddizione (reazione 1,3-dipolare di Huisgen, chiamata anche "Click Reaction") (fig. 6.43).

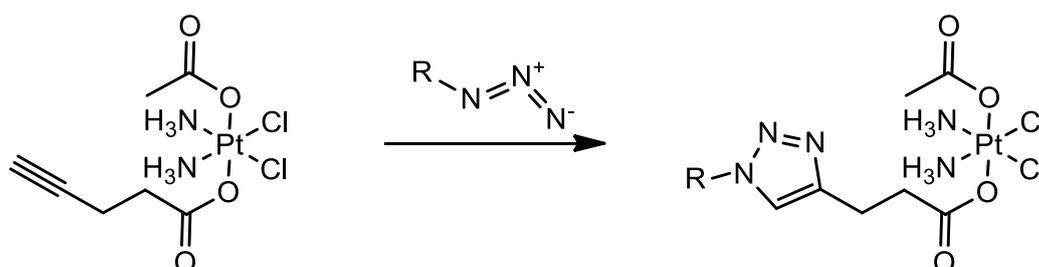


Figura 6.43: Reazione tra il complesso **30** ed un azide generica

Questa tipologia di reazione viene catalizzata in maniera ottimale dal Cu^I. Il catalizzatore può venire aggiunto sia nella sua forma ossidata (Cu^{II}) sia nella forma ridotta (Cu^I), tuttavia la forma ossidata necessiterebbe della presenza di un riducente (spesso ascorbato), che non è compatibile con la sintesi di complessi di Pt^{IV}.

La reazione può essere condotta in svariati tipi di solvente polare aprotico come THF, DMSO, CH₃CN e DMF oppure solventi apolari aprotici come il toluene.

Il meccanismo del ciclo catalitico (fig. 6.44) ha inizio con la formazione dell'addotto tra l'alchino ed il Cu^I (reazione esotermica ΔH di -11,7 kcal/mol). In questo primo stadio la reazione sembra passare attraverso un intermedio con complesso π -alchino-rame. Nel secondo passaggio l'azide viene attivata mediante coordinazione al rame formando l'intermedio azide-rame-alchino. Una volta formato il complesso azide-rame, si forma un "ciclo" a 6 atomi. L'ultimo passaggio consiste nella rimozione dell'atomo di rame dal ciclo a 6, portando così alla formazione di un ciclo a 5 atomi. Quest'ultima fase (reazione endotermica; ΔH 12,6 kcal/mol) possiede un'energia di attivazione di 18,7 kcal/mol, considerevolmente più bassa rispetto alla reazione non catalizzata da rame (energia di attivazione 26,0 kcal/mol). Si spiega così l'enorme apporto, alla velocità di reazione fornito dal Cu^I[4].

Il riarrangiamento del "ciclo" da 6 a 5 atomi e la conseguente perdita del rame portano alla formazione del prodotto finale ed al ripristino del catalizzatore.

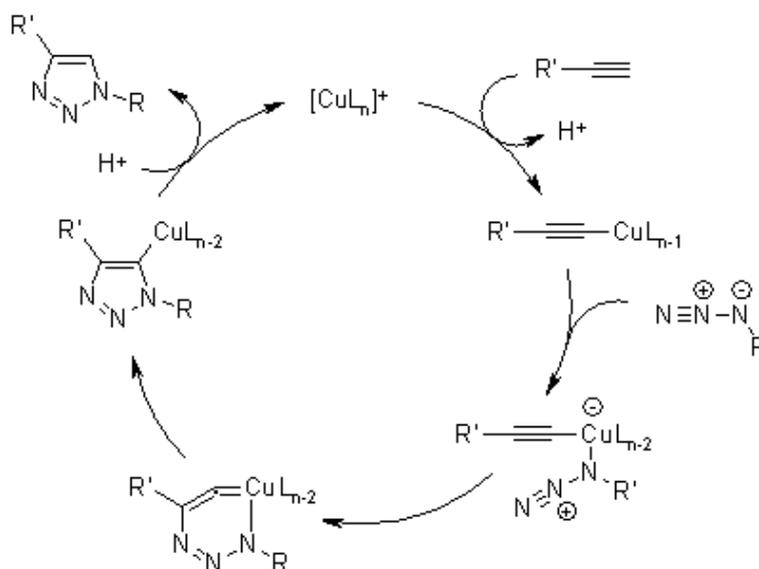


Figura 6.44: Meccanismo di reazione della Click Reaction

In questo lavoro è stato utilizzato la 11-azido-3,6,9-triossaundecan-1-ammina (PEG-azide) come azide modello per effettuare la cicloadizione e simulare l'accoppiamento ad un vettore per farmaci (fig. 6.45).

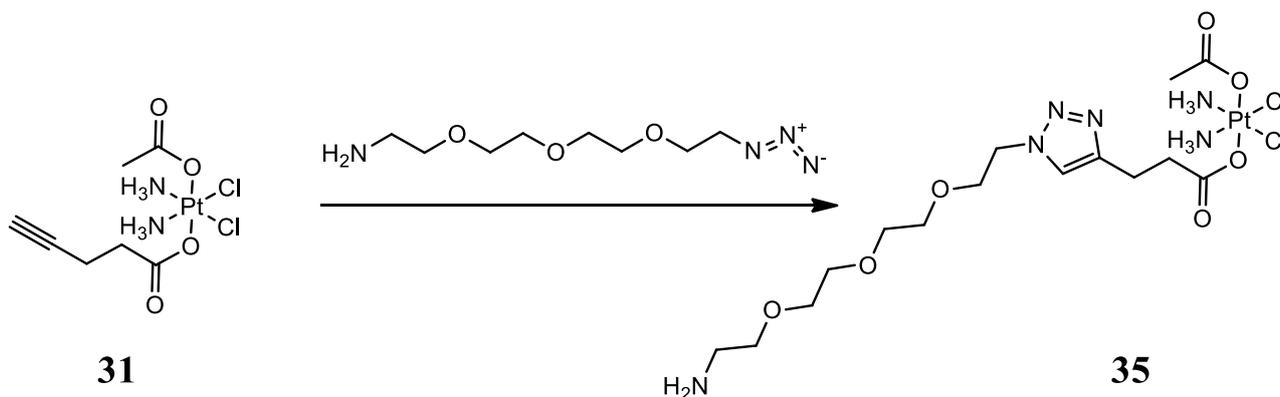


Figura 6.45: Click Reaction tra **31** e l'azide modello

Procedura: In un pallone mantenuto in atmosfera di azoto vengono posti 4 ml di DMF in cui vengono sciolti 44.5 mg (0.098 mmol, 1 eqv) di **31** e 23 μ l di PEG-azide (0.118 mmol, 1.2 eqv) e la soluzione viene mantenuta in agitazione per 1 min. Alla miscela vengono poi addizionati 9.3 mg di Cu^I (0.049 mmol, 0.5 eqv) e la reazione viene condotta sotto un flusso costante di azoto ed in agitazione a temperatura ambiente per 4 ore. Al termine della reazione, il solido presente (catalizzatore) viene rimosso per centrifugazione ed il solvente rimosso mediante evaporatore rotante fino ad ottenere un olio denso. Per precipitare il prodotto l'olio viene sciolto in 0.5 ml di metanolo e a cui vengono aggiunti 20 ml di etere dietilico. Il solido ottenuto viene lavato con etere e seccato sotto corrente di azoto.

Il solido finale, come mostrato dalla caratterizzazione mediante HPLC-MS, non contiene solo il prodotto desiderato ma presenta in quantità elevata anche il composto in cui uno ioduro si lega covalentemente all'anello a 5 atomi mediante sostituzione dell'atomo di idrogeno sul carbonio terminale dell'alchino (fig 6.46).

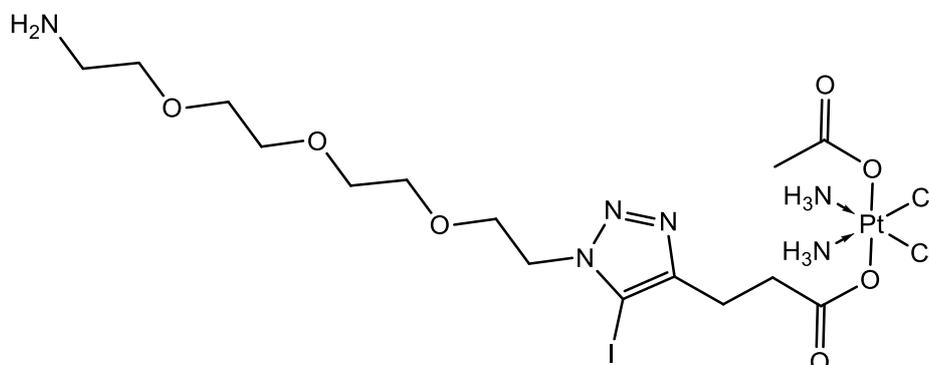


Figura 6.46: Sottoprodotto contenente iodio legato covalentemente all'anello a 5 atomi

Questo prodotto possiede una solubilità paragonabile col prodotto desiderato e per questo non è stato possibile separare i due composti.

Il solido ottenuto è stato analizzato mediante tecnica RP-HPLC-MS per confermare la formazione del prodotto desiderato e del sottoprodotto contenente l'atomo di iodio legato.

HPLC-MS

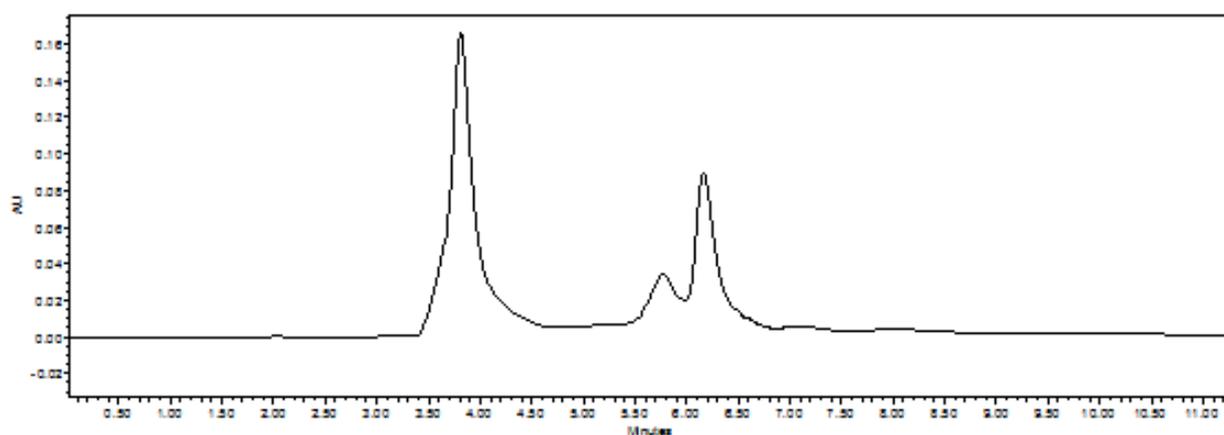


Figura 6.47: Cromatogramma del composto 11

Il cromatogramma (fig. 3.44) è stato registrato utilizzando come eluente una miscela composta da 50% acido formico 1% e 50% di MeOH e gli spettri di massa registrati in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra la presenza di più picchi riconducibili a diverse specie di Pt.

Il primo picco cromatografico visibile a 3,6 minuti corrisponde al sottoprodotto (A) in cui l'atomo di iodio viene legato nell'anello triazolico.

Lo spettro di massa corrispondente (fig. 6.48) mostra i picchi a m/z 675.4 e 801.3 rispettivamente corrispondenti a $[A-I^+ + 2H^+]^+$ e $[A+H^+]^+$.

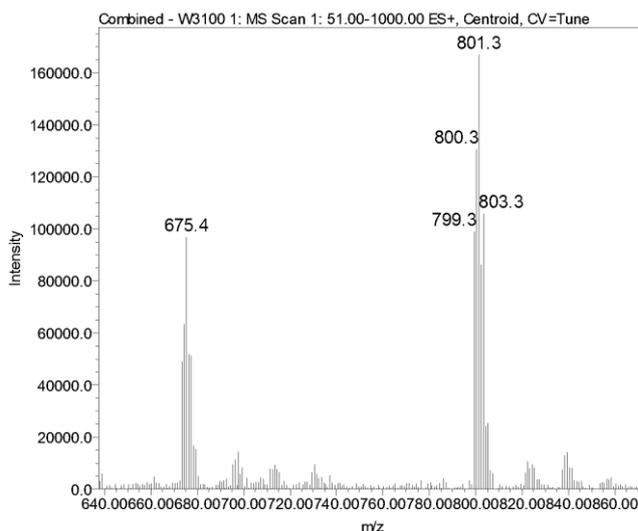


Figura 6.48: Spettro di massa del picco a 3.6 min

Il secondo picco cromatografico, visibile a 5,6 minuti corrisponde al complesso **31**, come confermato dallo spettro di massa ESI (fig. 6.49) dove si possono riscontrare i segnali a m/z 676.4 corrisponde a $[M+H^+]^+$ e m/z 698.4 corrispondente a $[M+Na^+]^+$.

Il terzo picco cromatografico corrispondente a 6.2 minuti, corrisponde ad un residuo di idrossocomplesso non reagito.

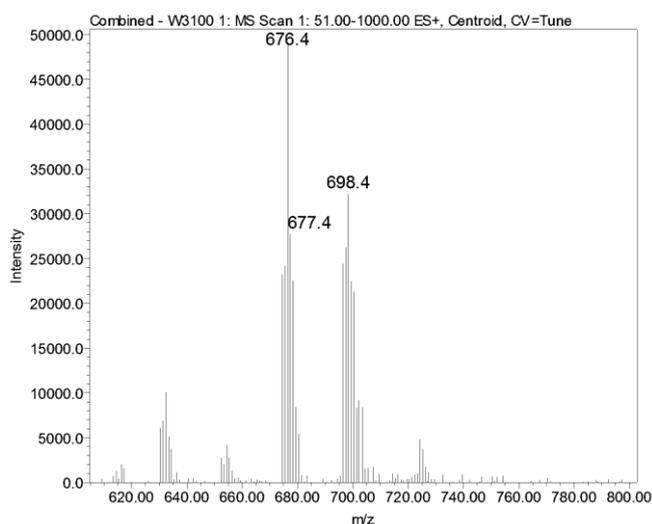


Figura 6.49: Spettro di massa del picco a 5.6 min

6.3 Conclusioni

Il legame covalente tra i leganti assiali dei complessi di Pt^{IV} studiati ed i gruppi funzionali disponibili sui vettori per DTD risulta applicabile alla maggior parte dei gruppi funzionali considerati (carbossilati, ammine, tioli o doppi legami coniugati) con ottime rese e purezze. Solo la *click reaction* ha portato alla formazione di sottoprodotti non separabili e non si è quindi dimostrata facilmente applicabile al complesso studiato.

6.4 Bibliografia

1. T. Oishi, K. Kagawa, M. Fujimoto; Synthesis and Polymerization of N-[[[N'-(α -Methylbenzyl)amino]carbonyl]methyl]maleimide; *Macromolecules*, (1993), 26 24-29.
2. L. Rulíšek, P. Šebek, Z. Havlas, R. Hrabal, P. Čapek, A. Svatoš, *An Experimental and Theoretical Study of Stereoselectivity of Furan–Maleic Anhydride and Furan–Maleimide Diels–Alder Reactions*, *J. Org. Chem.*, 2005, 70 (16), pp 6295–6302.
3. A. Xawkat, K. Ablajan, S. Hiraku, *Furans-Maleimides Diels-Alder Reactions in Protic Ionic Liquid*, *Chem. Res. Chinese Universities*, 2009, 25(2), 161—168
4. M. Meldal, C. Wenzel Tornøe, *Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*, *Chem. Rev.*, 2008, 108, 2952–3015

7. Vettori per DTD: Destrano

Quando un farmaco presenta cariche positive o negative nella struttura, oltre al suo legame diretto su un vettore, è possibile sfruttare un'interazione elettrostatica con un vettore contenente gruppi con carica di segno opposto cioè farmaci con cariche positive possono interagire con vettori carichi negativamente o viceversa.

Per sfruttare questo tipo d'interazione è quindi necessario l'utilizzo di complessi di platino carichi (positivamente o negativamente). Tuttavia tradizionalmente, le regole di relazione struttura-attività definite da Cleare e Hoeschele^{1,2} hanno indicato come composti attivi i complessi neutri di Pt^{II} contenenti due ammine (meglio se poco ingombrate) come *carrier groups* e due cloruri o carbossilati come *leaving groups*. I complessi carichi (spesso complessi triamminici) sono sempre stati considerati poco attivi e per questo poco studiati e sintetizzati.

Tuttavia alcuni studi recenti hanno dimostrato come nei complessi di formula generale $[\text{Pt}(\text{Am})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$, con Am=ammina, l'utilizzo di un'ammina di elevato ingombro sterico aumenti il potere antitumorale dei complessi cationici di Pt^{II}. In particolare, in base ai risultati ottenuti su diverse linee tumorali, Lippard³ ha mostrato come su vari complessi con leganti amminici aromatici diversi (fig. 7.1), il complesso più attivo e di maggiore interesse risulta essere il fenantriplatino (cis- $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{phet})]\text{NO}_3$, phet = fenantridina).

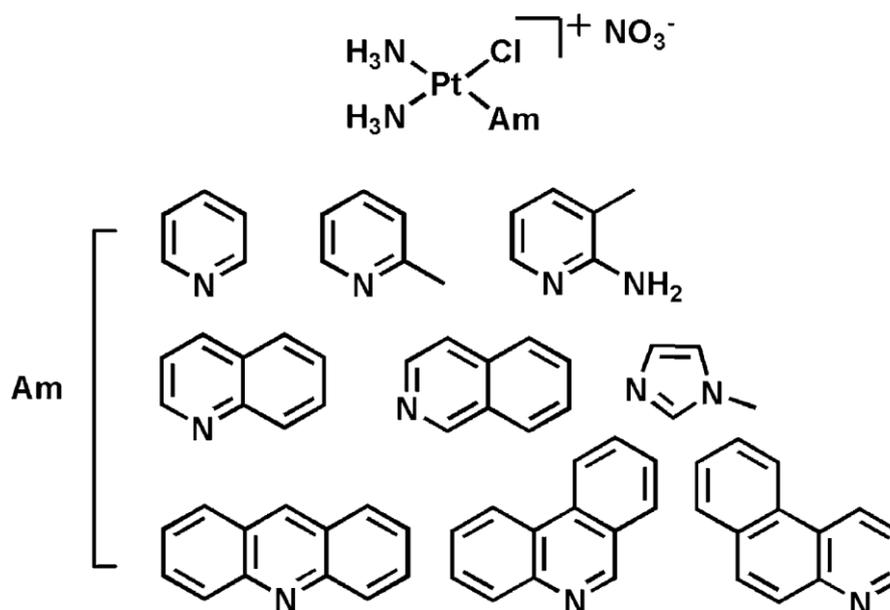


Figura 7.1: Complessi cationici di Pt^{II} con eterocicli studiati da Lippard

Data l'elevata attività di questo complesso si è voluto sfruttare un'interazione elettrostatica con un vettore, contenente gruppi carichi negativamente, in grado di favorire l'accumulo del farmaco in ambiente intracellulare ed aumentare la selettività della cura antitumorale.

A questo scopo è stato utilizzato il destrano (polimero ramificato del glucosio) modificato con gruppi solfato (DXS), che lo rendono carico negativamente, come vettore per i complessi cationici in modo da studiare l'applicabilità dell'interazione elettrostatica in strategie di DTD.

Per verificare gli effetti di questa interazione sono stati sintetizzati gli omologhi del complesso (cis-[PtCl(NH₃)₂(phet)]NO₃, sostituendo la fenantridina (phet, complesso **38**) con leganti meno ingombrati come piridina (py, complesso **36**) e chinolina (qui, complesso **37**) (fig. 7.2).

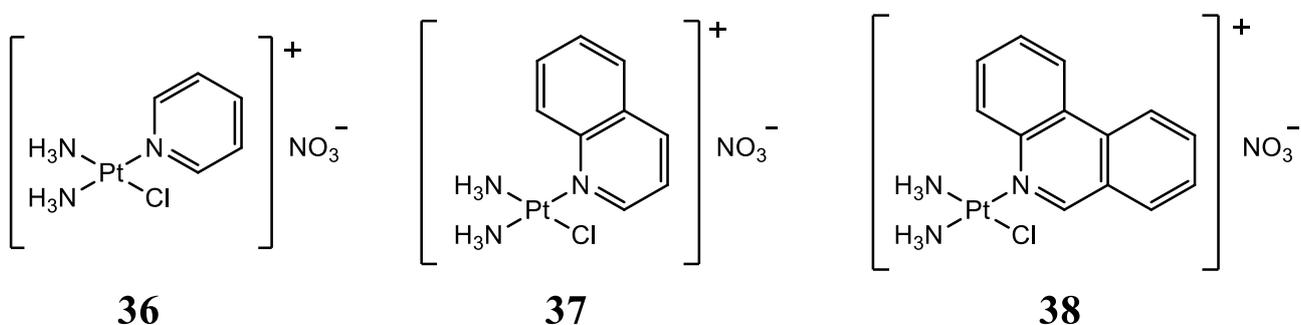


Figura 7.2: Complessi cationici con eterocicli ad elevato ingombro sterico

7.1 Sintesi dei complessi cationici

I complessi cationici **36**, **37** e **38** sono stati sintetizzati con procedura analoga, variando l'eterociclo impiegato nella sintesi.

La sintesi prevede la sostituzione selettiva di un atomo di cloro sul complesso **10** (cisplatino) con l'ammina in esame. La sostituzione viene effettuata rimuovendo selettivamente un legante cloruro, mediante l'utilizzo di AgNO_3 , ed aggiungendo successivamente l'eterociclo (fig. 7.3).

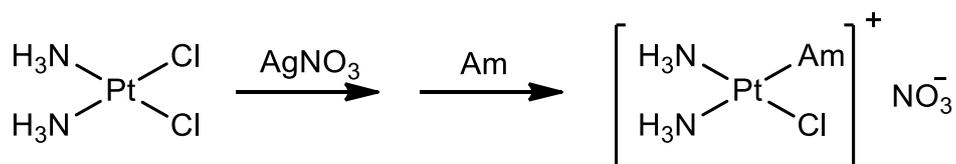


Figura 7.3: Schema di reazione per la formazione dei complessi cationici triamminici

Procedura: A 200 mg (0,67 mmol) di **10** (cisplatino) sospesi in 10 ml di DMF anidra vengono aggiunti 0,11g (0,65 mmol) di AgNO_3 e la miscela mantenuta al buio a 55°C sotto agitazione per 24 ore.

Terminata la reazione, il solido viene rimosso per centrifugazione e la soluzione filtrata per rimuovere i residui di AgCl . Alla soluzione vengono quindi aggiunti 0.9 eqv. di legante (0,60 mmol, 47 μl di piridina, 77 mg di chinolina o 107 mg di fenantridina) e la reazione viene mantenuta nelle condizioni precedenti per ulteriori 24 ore.

Al termine della reazione, la soluzione viene filtrata nuovamente ed il solvente rimosso mediante evaporatore rotante. L'olio ottenuto viene ridissolto in 20 ml di metanolo e l'eventuale solido insolubile (cisplatino) viene rimosso per filtrazione. La soluzione viene ridotta di volume ed il prodotto precipitato mediante l'aggiunta di 30 ml di etere dietilico. Il solido viene separato per centrifugazione e lavato con due aliquote di etere dietilico da 30 ml.

Rese: 183 mg per **36** (68%), 192 mg per **37** (63%) e 205 mg per **38** (61%)

Se il prodotto non risulta puro è possibile ripetere la procedura di dissoluzione in metanolo e riprecipitazione con etere in modo da rimuovere l'eventuale cisplatino residuo.

I prodotti sono stati caratterizzati mediante tecniche RP-HPLC, ESI-MS e NMR per confermare l'identità e la purezza dei complessi.

[PtCl(NH₃)₂(py)] (36)

HPLC-MS

Il complesso è stato eluito utilizzando come eluente una miscela composta da 20% acido formico 1% e 80% MeOH e lo spettro di massa ESI è stato registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 1.9 min relativo al complesso in esame, come confermato dallo spettro ESI-MS corrispondente (fig. 7.4), dove è possibile osservare il picco relativo allo ione molecolare [M-NO₃]⁺ a m/z = 344.2 con *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt oltre ai picchi meno intensi a m/z 355.2, 327.2 e 290.3 rispettivamente relativi a [M-NO₃⁻+formiato]⁺, [M-py+H⁺]⁺ e [M-py-Cl]⁺

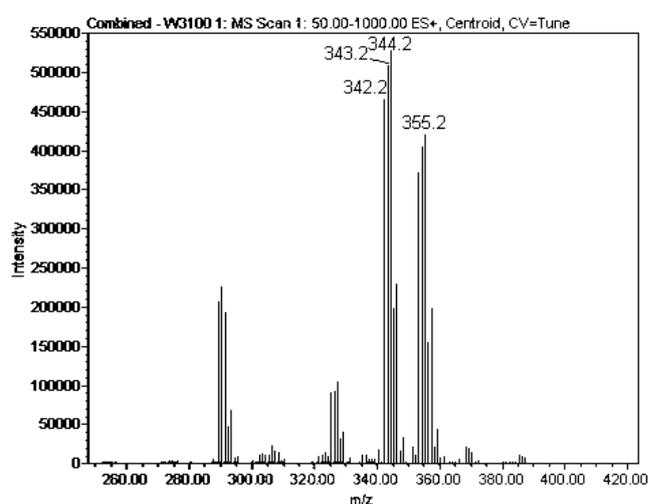
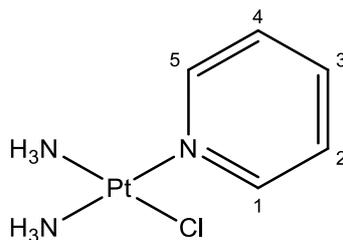


Figura 7.4: Spettro di massa del complesso 36

NMR

Gli spettri NMR del complesso 36 sono stati registrati in d₄-MeOD.



- Spettro ^1H NMR

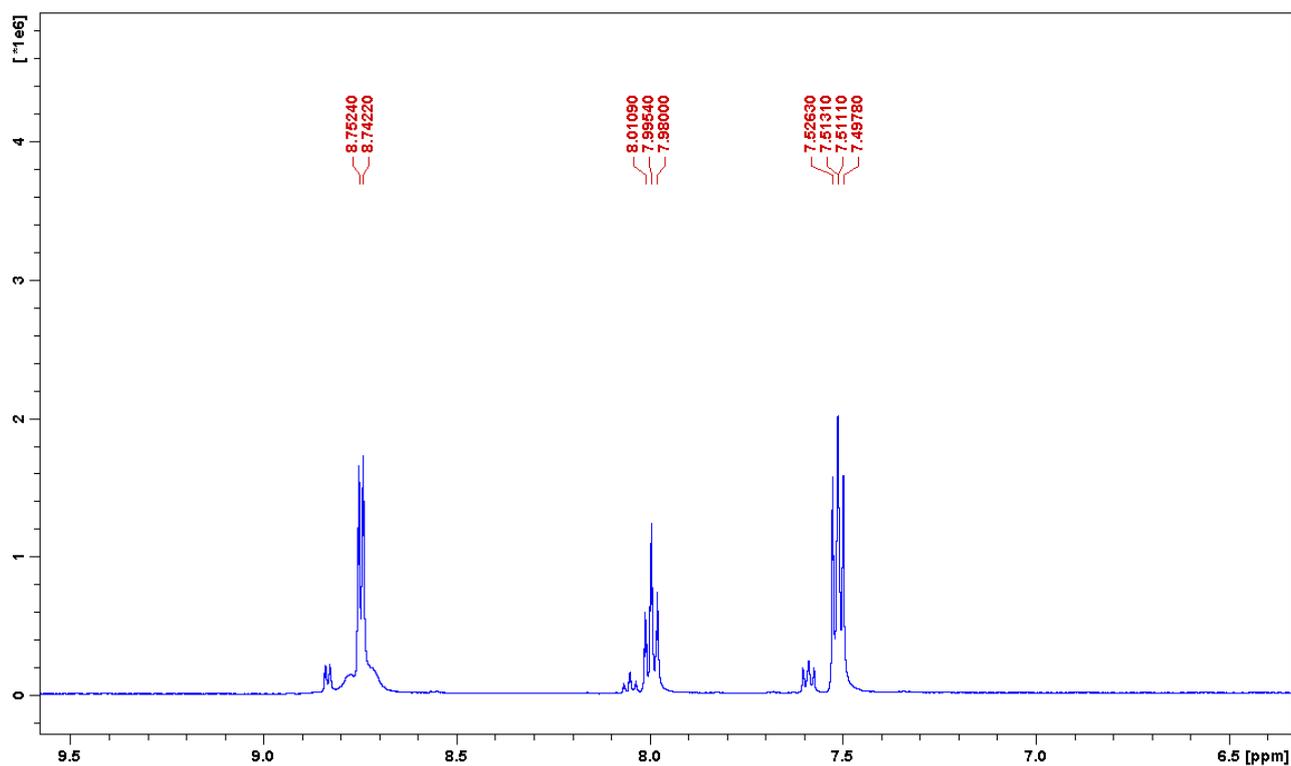


Figura 7.5: Spettro ^1H del complesso **36**

Tabella 7.1: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **36**

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>	<i>Molteplicità</i>	<i>J (Hz)</i>	<i>Integrazione</i>
7.51	2-4	t	7	2
8.00	3	t	8	1
8.75	1-5	d	5	2

Lo sdoppiamento dei picchi presenti nella caratterizzazione in MeOD è dovuta alla presenza di una minima quantità di complesso idrolizzato nel campione in esame (questa specie probabilmente si forma già in fase di sintesi).

- Spettro ^{13}C NMR

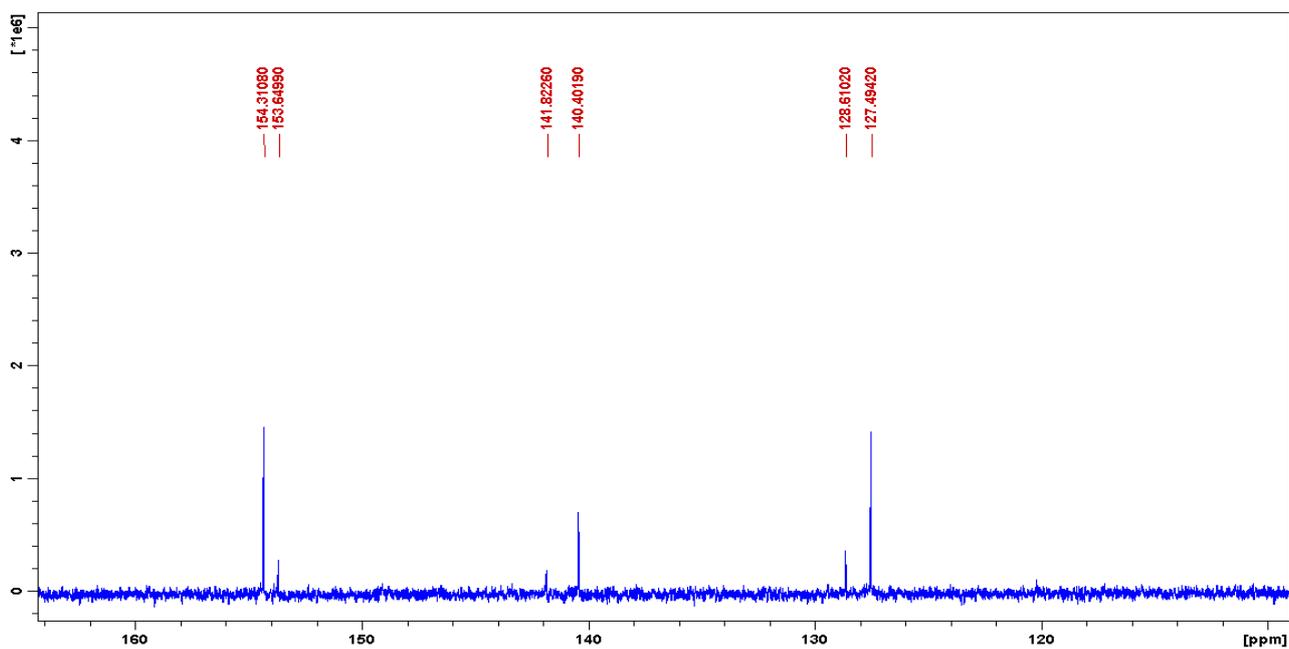


Figura 7.6: Spettro ^{13}C del complesso 36

Tabella 7.2: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso 36

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>
127.5	2-4
140.4	3
154.3	1-5

- Spettro ^{195}Pt NMR

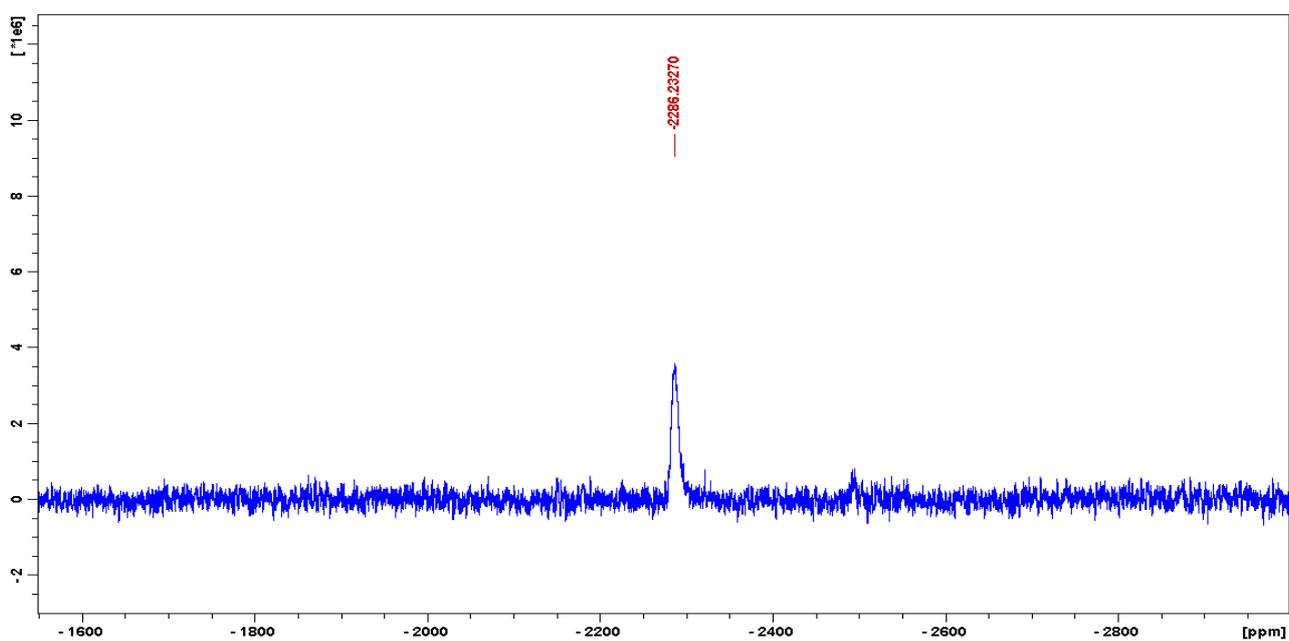


Figura 7.7: Spettro ^{195}Pt del complesso 36

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a -2286 ppm, compreso in una zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{II} con intorno chimico PtN_3Cl .

[PtCl(NH₃)₂(qui)] (37)

HPLC-MS

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 20% acido formico 1% e 80% MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi.

Il cromatogramma mostra un unico picco a 1.8 min, come confermato dal relativo spettro di massa (fig. 7.8), relativo a complesso in esame.

Dallo spettro ESI-MS è possibile osservare il picco relativo allo ione molecolare $[\text{M}-\text{NO}_3^-]^+$ a valore di $m/z = 394.4$ con *pattern* isotopico tipico dei complessi contenenti Pt. Oltre al picco principale sono presenti i picchi a m/z 357.1 e 340.3 relativi alle specie $[\text{M}-\text{NO}_3^--\text{Cl}-\text{H}^+]^+$ e $[\text{M}-\text{NO}_3^--\text{Cl}-\text{NH}_3-\text{H}^+]^+$.

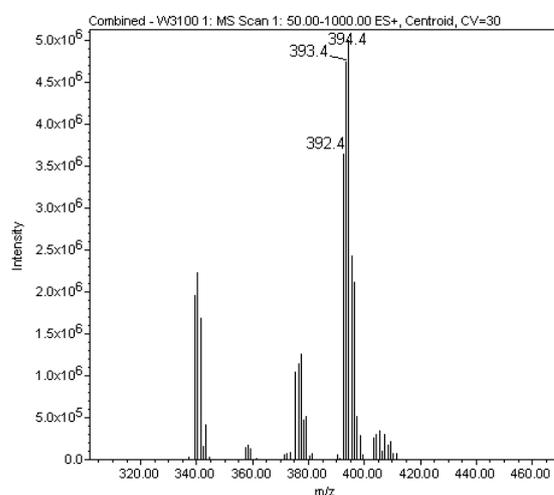
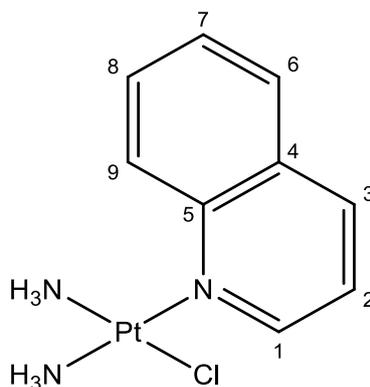


Figura 7.8: Spettro di massa del complesso 37

NMR

Gli spettri NMR del complesso 37 sono stati registrati in d_4 -MeOD.



- Spettro ^1H NMR

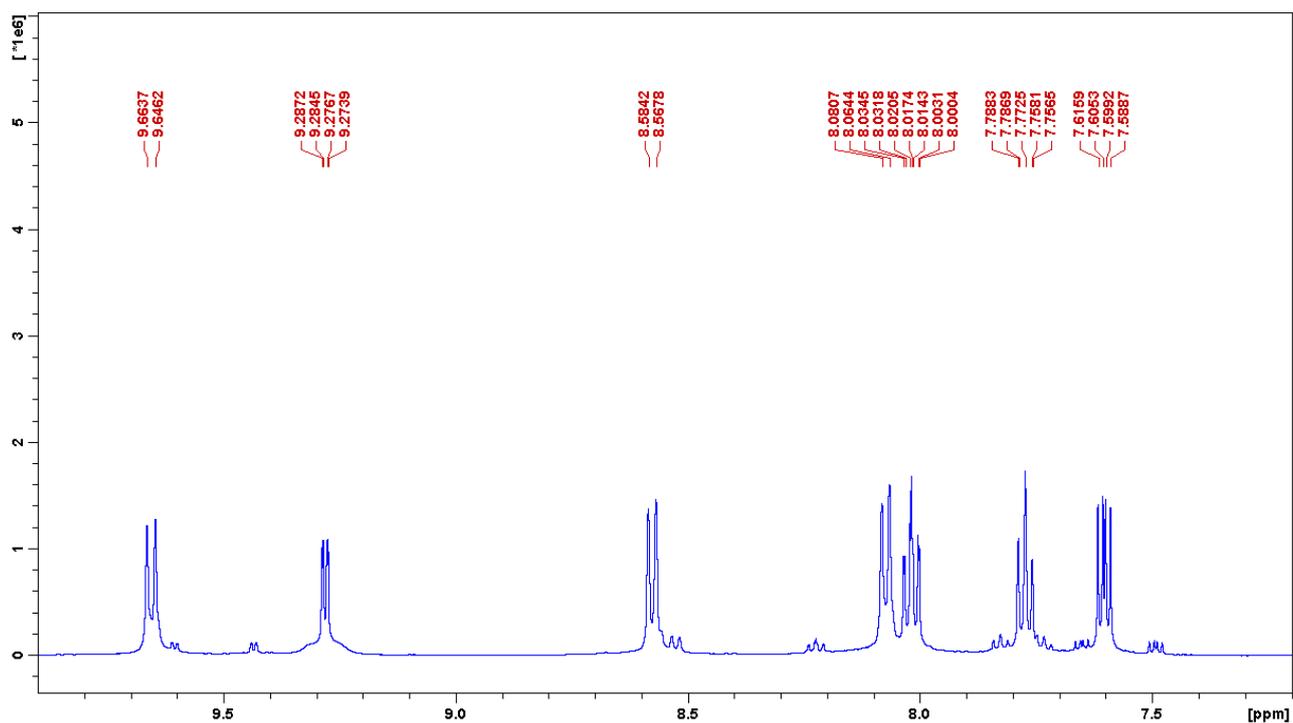


Figura 7.9: Spettro ^1H del complesso 37

Tabella 7.3: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso 37

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
7.60	8	t	5.3	1
7.77	7	t	7.2	1
8.01	2	t	7.2	1
8.07	6	d	8.2	1
8.58	9	d	8.2	1
9.28	3	d	5.3	1
9.66	1	d	8.8	1

- Spettro ^{13}C NMR

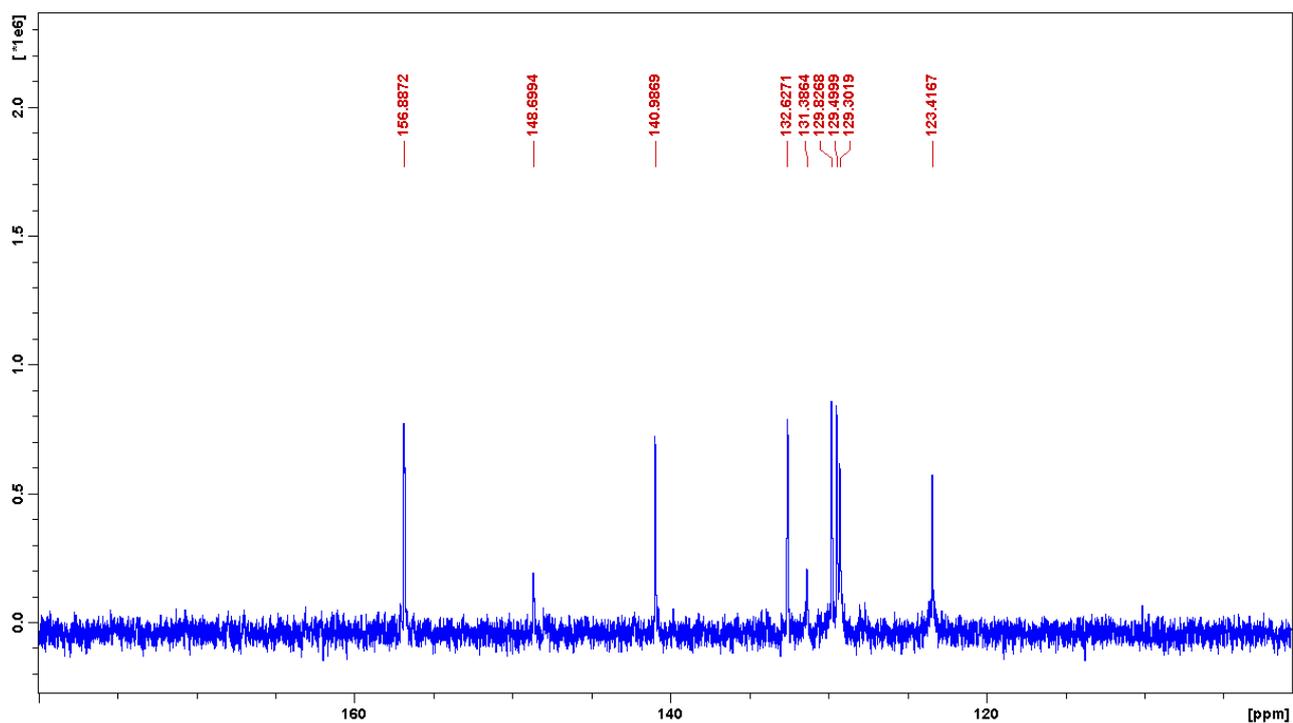


Figura 7.10: Spettro ^{13}C del complesso **36**

Tabella 7.4: Assegnazione dello spettro ^{13}C del complesso **36**

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>
123.4	3
129.3	8
129.5	9
129.8	10
131.4	5

<i>Chemical Shift δ (ppm)</i>	<i>Assegnazione</i>
132.6	7
141.0	4
148.7	6
156.9	2

- Spettro ^{195}Pt NMR

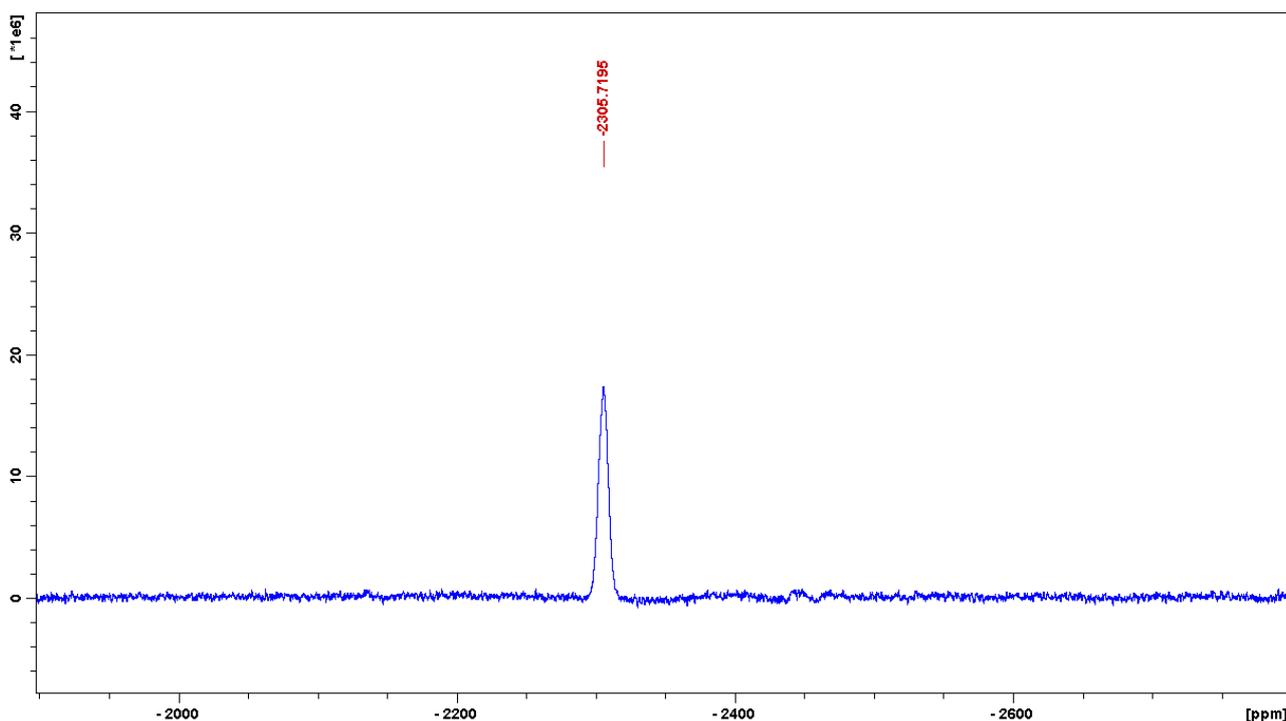


Figura 7.11: Spettro ^{195}Pt del complesso 36

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a -2306 ppm, che cade in una zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{II} con intorno chimico PtN_3Cl .

[PtCl(NH₃)₂(phet)] (38)

HPLC-MS

Il complesso è stato eluito utilizzando una miscela composta da 70% acido formico 1% e 30% MeOH e lo spettro di massa registrato in modalità ioni positivi. Il cromatogramma mostra un unico picco a 2.4 min relativo a complesso in esame, come confermato dallo spettro ESI-MS (fig.7.12) dove sono visibili i picchi relativi allo ione molecolare $[\text{M}-\text{NO}_3^-]^+$ a valore di $m/z = 444.3$ e degli ioni $[\text{M}-\text{NO}_3^--\text{Cl}^--\text{H}^+]^+$ e $[\text{M}-\text{NO}_3^--\text{Cl}^--\text{NH}_3-\text{H}^+]^+$ a m/z 407.2 e 390.3.

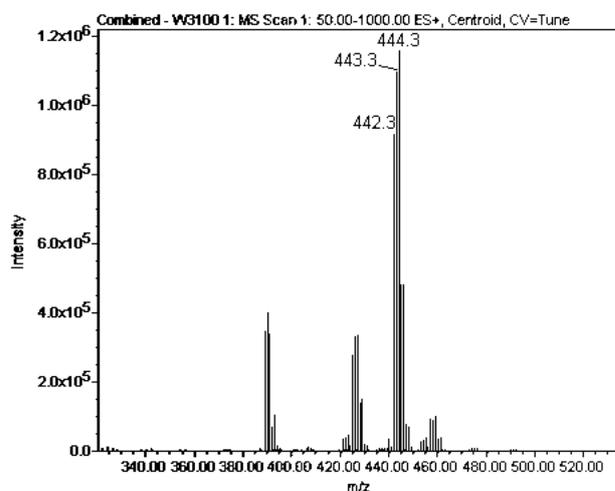
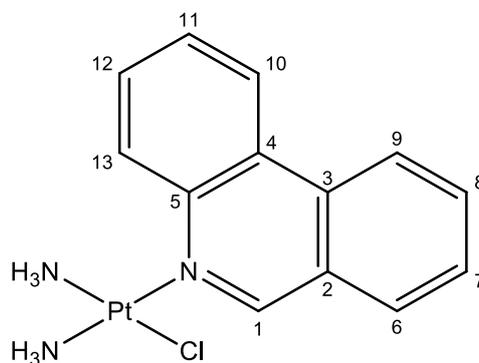


Figura 7.12: Spettro di massa del complesso 38

NMR

Gli spettri NMR del complesso **38** sono stati registrati in d_4 -MeOD.



- Spettro 1H NMR

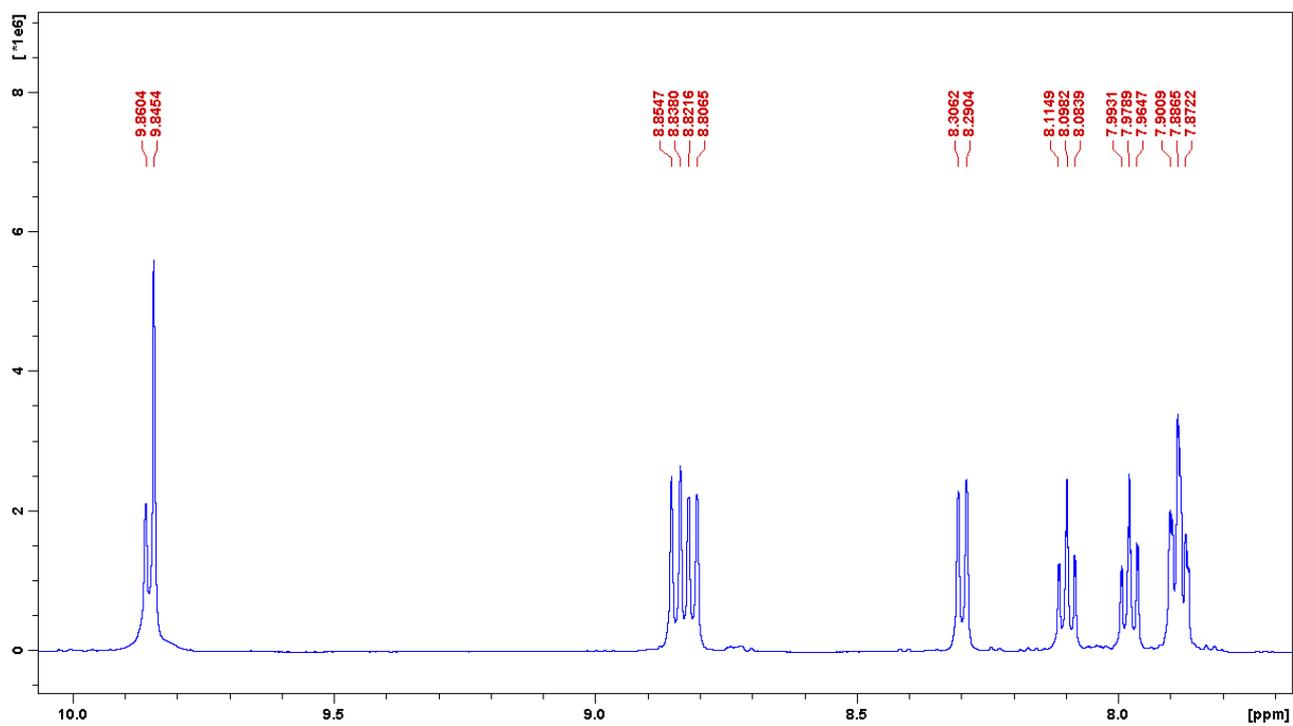


Figura 7.13: Spettro 1H del complesso 38

Tabella 7.5: Assegnazione dei segnali dello spettro ^1H del complesso **38**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione	Molteplicità	J (Hz)	Integrazione
7.89	7, 12	t	7.2	2
7.98	11	t	7.2	1
8.10	8	t	7.2	1
8.30	6	d	7.9	1
8.81	13	d	7.6	1
8.84	9	d	8.4	1
9.84	1	s		1
9.85	10	d	7.5	1

• Spettro ^{13}C NMR

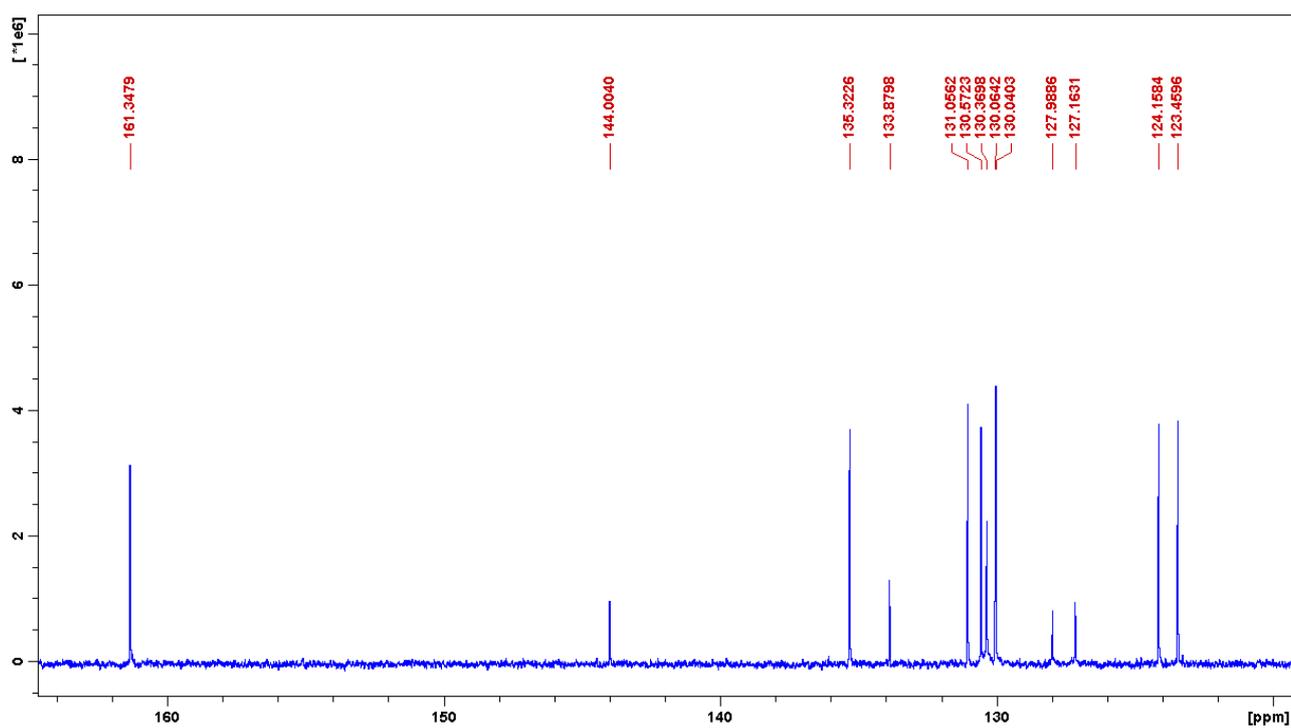


Figura 7.14: Spettro ^{13}C del complesso **38**

Tabella 7.6: Assegnazione dei segnali dello spettro ^{13}C del complesso **38**

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
123.5	9
124.2	10
127.2	4
128.0	2
130.0	6
130.1	7
130.4	11

Chemical Shift δ (ppm)	Assegnazione
130.6	12
131.6	13
133.9	3
135.3	8
144.0	5
161.3	1

- Spettro ^{195}Pt NMR

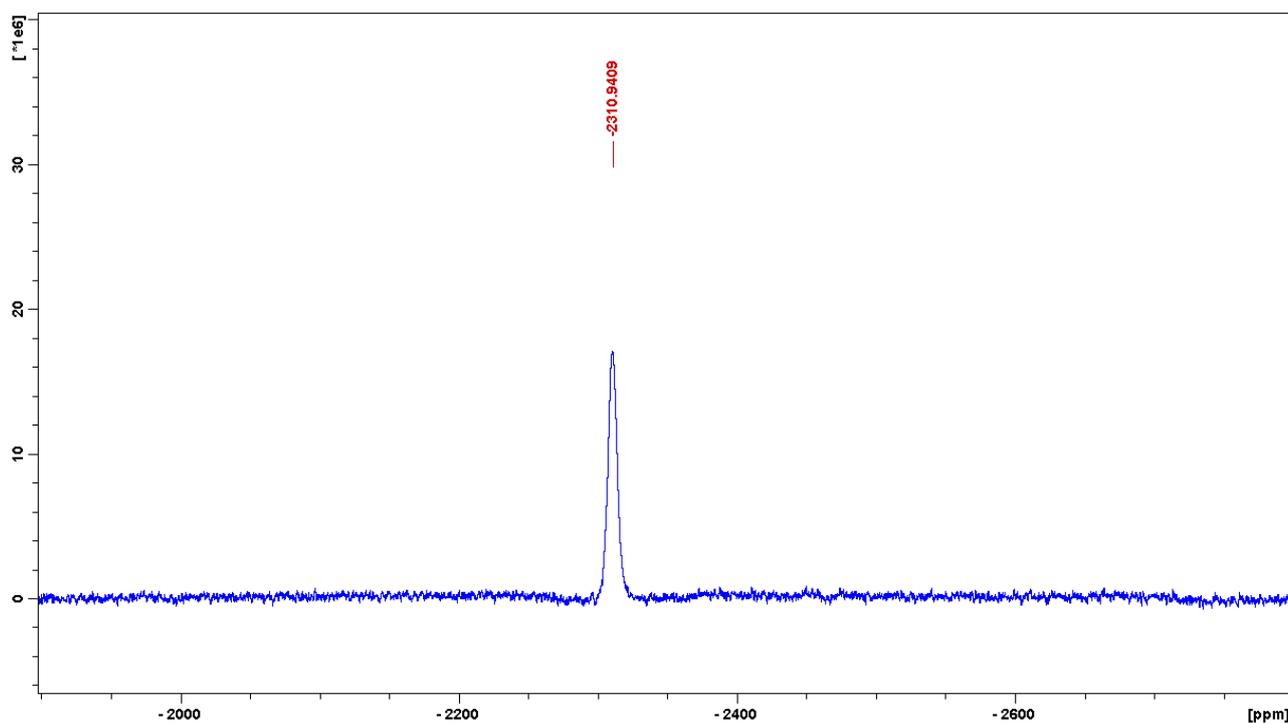


Figura 7.15: Spettro ^{195}Pt del complesso **38**

Lo spettro ^{195}Pt -NMR mostra un unico picco a -2311 ppm, in una zona di *chemical shift* caratteristica dei complessi di Pt^{II} con intorno chimico PtN_3Cl .

7.2 Formazione degli addotti DXS-farmaco

Sintetizzati i complessi cationici, si è voluto utilizzare destrano solfato ad elevato peso molecolare (fig. 7.16) come vettore per favorire il trasporto di questi all'interno della cellula, mediante la formazione di interazioni elettrostatiche.

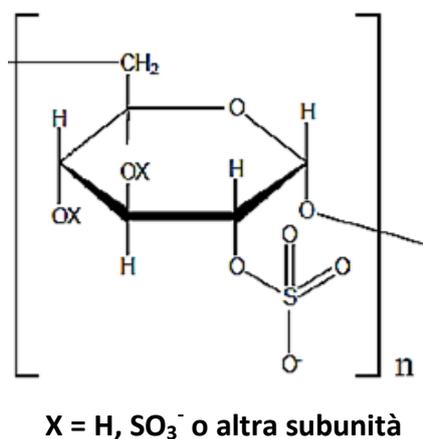


Figura 7.16: Struttura del destrano solfato (DXS)

Nella preparazione di addotti ionici farmaco-vettore è stato utilizzato del destrano solfato di massa molecolare superiore a 500 kDa con un contenuto di gruppi SO₄⁻ pari a 0,332 μmol/g.

Al fine di studiare l'interazione elettrostatica sono state effettuate più sintesi degli addotti variando il rapporto Pt:DXS, in modo da verificare la relazione tra carico effettivo di farmaco e quantità di farmaco impiegato.

La formazione degli addotti si è basata sulla preparazione di due soluzioni indipendenti contenenti rispettivamente i due componenti: DXS e farmaco. Per questioni di solubilità dell'addotto è stata mantenuta una concentrazione finale di platino 1mM, variando opportunamente i volumi impiegati nella preparazione della soluzione contenente il complesso in esame e mantenendo invariato il volume della soluzione di DXS (10 mg/ml).

La soluzione contenente il complesso di platino viene aggiunta alla soluzione di DXS, mantenuta in agitazione, e la miscela viene lasciata in agitazione per 15 min in modo da permettere la formazione delle interazioni elettrostatiche.

Terminata la fase di formazione degli addotti, la soluzione viene dializzata in modo da rimuovere l'eventuale complesso di platino non legato ed il sale NaNO₃ formatosi.

Nella sintesi degli addotti si è scelto di utilizzare quantità variabili di complesso cationico in modo da coprire il 100%, 50%, 25% e 12.5% dei gruppi solfato presenti nel DXS.

Procedura:

Vengono preparate due soluzioni come segue:

1. La soluzione di destrano viene preparata sciogliendo in una quantità minima (V_{DXS}) di acqua il destrano: 3 mg di DXS vengono sciolti in 0.3 ml di acqua (concentrazione finale 0.1 ml/mg).
2. La soluzione di platino viene preparata sciogliendo il relativo complesso in esame in quantità variabile di acqua (V_{Pt}), in base al rapporto Pt:DXS (vedi tab. 7.7), in modo da ottenere una soluzione finale ($V_{TOT}=V_{DXS}+V_{Pt}$) con concentrazione di platino 1mM.

Tabella 7.7: Quantità di reagenti utilizzati per la formazione degli addotti

	<i>Carico%</i>	<i>mg DXS</i>	<i>$\mu\text{moli SO}_4^-$</i>	<i>V_{DXS} (ml)</i>	<i>mg complesso</i>	<i>$\mu\text{moli Pt}$</i>	<i>V_{Pt} (ml)</i>	<i>V_{TOT} (ml)</i>
36	100%	3.0	15.8	0.3	6.4	15.8	15.5	15.8
	50%	3.0	15.8	0.3	3.2	7.9	7.6	7.9
	25%	3.0	15.8	0.3	1.6	3.9	3.6	3.9
	12.5%	3.0	15.8	0.3	0.8	2.0	1.7	2.0
37	100%	3.0	15.8	0.3	7.2	15.8	15.5	15.8
	50%	3.0	15.8	0.3	3.6	7.9	7.6	7.9
	25%	3.0	15.8	0.3	1.8	3.9	3.6	3.9
	12.5%	3.0	15.8	0.3	0.9	2.0	1.7	2.0
38	100%	3.0	15.8	0.3	8.0	15.8	15.5	15.8
	50%	3.0	15.8	0.3	4.0	7.9	7.6	7.9
	25%	3.0	15.8	0.3	2.0	3.9	3.6	3.9
	12.5%	3.0	15.8	0.3	1.0	2.0	1.7	2.0

Preparate le soluzioni, la soluzione contenente il complesso viene addizionata a quella contenente il destrano (mantenuta in agitazione) nell'arco di 1 minuto. La miscela risultante viene mantenuta in agitazione per 15 min in modo da portare alla formazione delle interazioni elettrostatiche.

Al termine della reazione, la soluzione viene purificata con una membrana di dialisi (*cut-off* 12kDa), in acqua per 24 ore, cambiando periodicamente la soluzione esterna, in modo da rimuovere il complesso libero ed il sale AgNO₃ formatosi.

Terminata la dialisi la soluzione viene liofilizzata fino alla completa rimozione di acqua.

Il solido così ottenuto è stato utilizzato per gli studi successivi:

- Studio della relazione complesso legato/complesso utilizzato in sintesi
- Studio del rilascio in tampone PBS
- Studio dell'attività biologica

7.3 Studio della relazione carico effettivo/complesso utilizzato

Formati gli addotti, si è voluto verificare l'effettivo carico di complesso rispetto al complesso utilizzato nella reazione. Per analizzare questa relazione sono state effettuate, mediante ICP-AES, le misure delle quantità di Pt e S contenute nell'addotto finale, in modo da analizzare il rapporto complesso:gruppi SO_4^- .

Tabella 7.8: Quantità di complesso nell'addotto col DXS

% Pt/ SO_4^- iniziale	Complessi		
	36	37	38
	% Pt/ SO_4^- effettivo		
100%	10 ± 2	8 ± 2	48 ± 2
50%	4 ± 1	4 ± 1	25 ± 2
25%	2,0 ± 0,8	1,8 ± 0,6	9 ± 1
12,5%	1,5 ± 0,9	1,4 ± 0,8	2,1 ± 0,8

Come si può vedere in tabella 7.8, i dati indicano che entrambi i complessi **36** e **37** mostrano una scarsa interazione con i gruppi solfato del DXS e solo una piccola quantità (< 10%) del complesso impiegato viene legato al vettore. Viceversa, il complesso **38** mostra una buona affinità per il DXS arrivando a legare circa il 50% del complesso utilizzato.

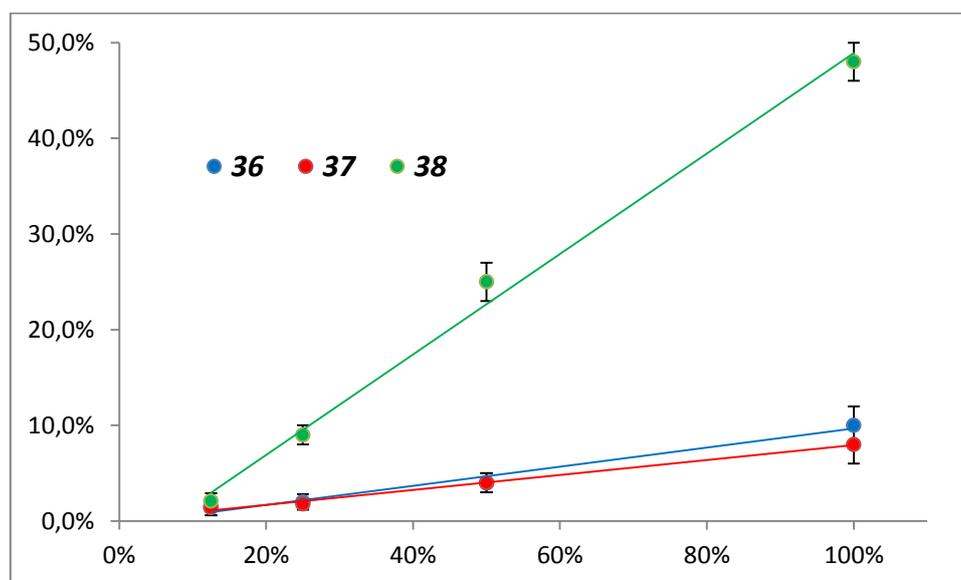


Figura 7.17: Profilo carico effettivo/complesso utilizzato

Tuttavia, è possibile constatare la relazione pseudo-lineare tra la quantità utilizzata ed il carico effettivo: raddoppiando il complesso utilizzato, raddoppia il carico finale (fig. 7.17).

Questi risultati sembrano indicare che nella formazione degli addotti Pt-DXS non sono coinvolte non solo interazioni ioniche ma anche interazione secondarie (es. legami idrogeno o interazioni non-covalenti).

Poiché il complesso **38** mostra un carico molto più elevato rispetto ai due analoghi, oltre ad un attività marcatamente superiore³, gli studi successivi di rilascio del farmaco e dell'attività biologica si sono incentrati solo sull'addotto DXS-**38**.

7.4 Studio del rilascio del farmaco in soluzione

Per valutare il rilascio del complesso di Pt^{II} **38** dal DXS in condizioni fisiologiche, è stato studiato il rilascio in soluzione tampone PBS a 25°C a pH 7.4 (in modo da simulare l'ambiente intracellulare). Per verificare l'effettivo rilascio del complesso, l'addotto disciolto in soluzione PBS a pH 7.4 è stato dializzato con membrana con *cut-off* di 12kDa e la soluzione esterna periodicamente mediante spettrometria UV-visibile per ricavare la concentrazione di complesso rilasciato nell'arco di 28 ore. Tale concentrazione è stata ricavata mediante la misura dell'intensità di assorbanza del complesso a λ di 251 nm ($\epsilon = 34433 \pm 87 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Le misure UV-Visibile sono state effettuate con spettrofotometro JASCO V550 utilizzando una cuvetta in quarzo.

Per effettuare un'analisi quantitativa, è stata costruita una retta di taratura con soluzioni standard di concentrazione compresa nel *range* 0.15-0.01 mM in PBS pH 7.4, registrando lo spettro di assorbimento nell'intervallo tra 200 e 400 nm (Fig. 7.18).

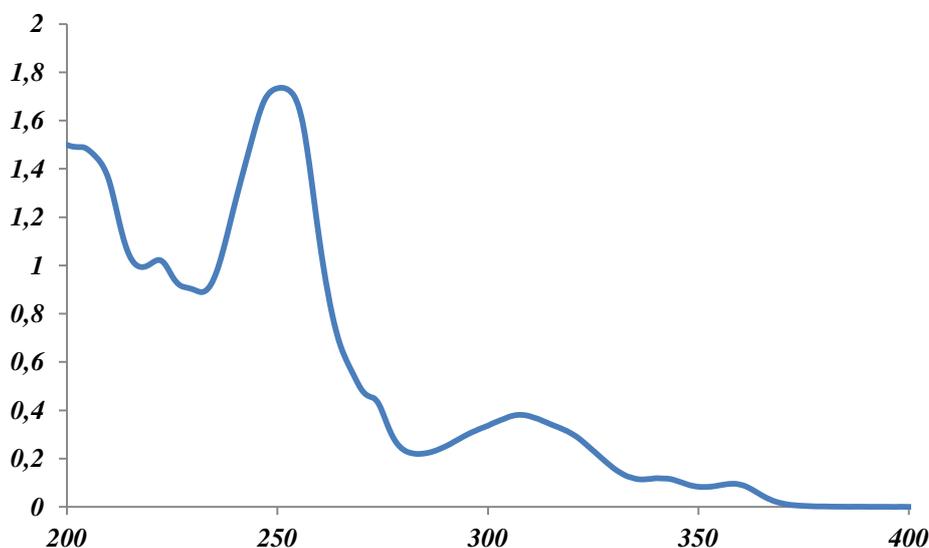


Figura 7.18: Spettro di assorbimento del complesso **38** in concentrazione 0.05 mM in PBS

Essendo la banda tra 230 e 270 nm a maggior assorbimento è stata calcolata ed utilizzata la rispettiva ϵ a 250 nm per determinare la concentrazione di complesso nella soluzione esterna.

Si è voluto inoltre studiare la relazione tra forza ionica della soluzione e rilascio del farmaco attraverso la variazione delle concentrazioni degli ioni presenti nella soluzione di dialisi. Si è studiato il rilascio in tre diverse concentrazioni di PBS: 2x (fig. 7.19), 1x (fig. 7.20) e 0.5x (fig.

7.21), rispettivamente 2, 1 e 0.5 volte la concentrazione dello standard PBS ($[\text{PO}_4^{2-}] = 8.3 \text{ mM}$ e $[\text{Cl}^-] = 139.7 \text{ mM}$).

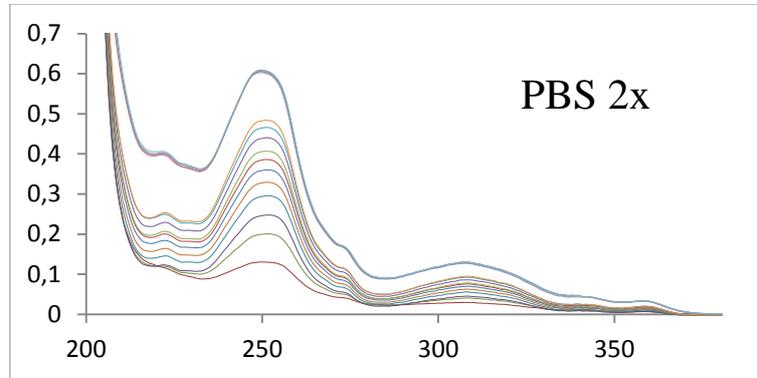


Figura 7.19: Rilascio dell'addotto DXS-38 in PBS 2x

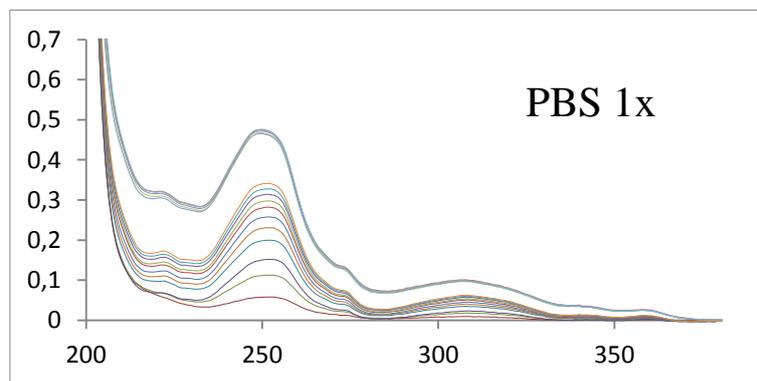


Figura 7.20: Rilascio dell'addotto DXS-38 in PBS 1x

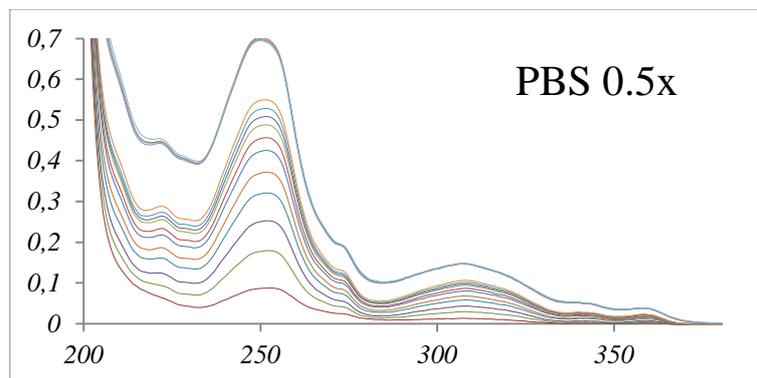


Figura 7.21: Rilascio dell'addotto DXS-38 in PBS 0.5x

Analizzando i profili di assorbimento (fig. 7.22), si può vedere come il rilascio dopo 24h raggiunga un valore massimo strettamente collegato con la forza ionica della soluzione: maggiore è la forza ionica, maggiore è la quantità rilasciata dall'addotto.

Tuttavia il rilascio non risulta essere quantitativo ma solo una parte del complesso legato viene rilasciata.

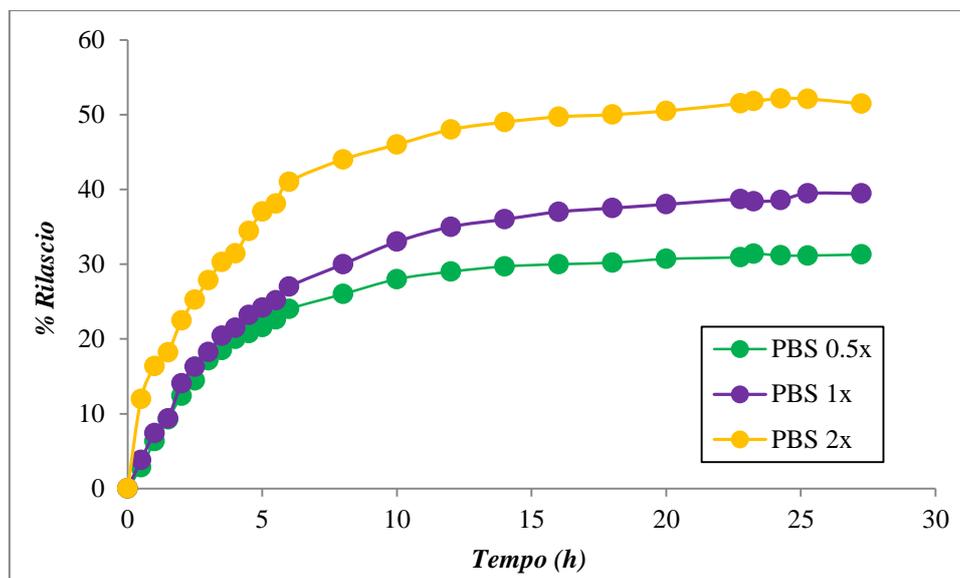


Figura 7.22: Profili di assorbimento a 250 nm

Confermato l'effettivo rilascio del complesso **38** da parte del vettore DXS, il lavoro si è spostato sullo studio dell'attività biologica dell'addotto, per confronto con il complesso libero.

7.5 Studio dell'attività dell'addotto DXS-38

Come trattato nel cap. 5.5, l'attività biologica viene analizzata attraverso la misura del valore di IC₅₀ (half inhibiting concentration), mediante il saggio della resazurina.

Le linee cellulari utilizzate in questo lavoro per la determinazione dell'inibizione di crescita da parte dei complessi del complesso **38** e del suo addotto con il destrano (**38-DXS**) sono:

- tre linee cellulari di mesotelioma pleurico maligno (MPM) BR95 (epiteloidi), MM98 (sarcomatoidi) e MG06 (miste con predominanza di epiteloidi), 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 di carcinoma ovarico A2780 e carcinoma al colon HCT116 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); il terreno McCoy's 5A è stato invece usato per la linea HCT116.

A tutti i terreni sono stati aggiunti L-glutammina (2 mM), penicillina 100 IU/ml, streptomicina (100 mg/l) e siero bovino fetale (FBS) 10% ed i trattamenti sono stati seguiti a 37°C in un incubatore umidificato con il 5% di CO₂ per 72h mediante un trattamento continuo (CT).

Il cisplatino è stato sciolto in una soluzione di NaCl 0,9% (pH 3 corretto con HCl, concentrazione soluzione standard 1 mM) mentre il complesso libero e l'addotto sono stati 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.

Tabella 7.9: Valori di IC_{50} dei complessi in esame

	A2780	HCT-116	BR95	MG06	MM98	MM98R	HMC
cisplatino	$0,5 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,9$	4 ± 1	3 ± 1	19 ± 3	7 ± 1
38	$0,12 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,09$	$1,32 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$2,09 \pm 0,06$	$0,60 \pm 0,04$
38-DXS	$0,20 \pm 0,04$	$1,2 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,3$	$1,03 \pm 0,09$	$1,8 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,4$	$0,90 \pm 0,08$

Come si può vedere in tabella il complesso **38**, di per sè più attivo del cisplatino, perde parte della sua efficacia a seguito della formazione dell'addotto con il destrano. Tuttavia, come visto nel cap. 7.4, il complesso non viene totalmente rilasciato e questo può influenzare l'effettivo valore di IC_{50} calcolato. Nonostante la riduzione di attività l'addotto mantiene un'efficienza maggiore rispetto al semplice cisplatino.

7.6 Conclusioni

Gli addotti basati su un'interazione elettrostatica possono essere sfruttati in strategie di DTD ma, a differenza dei metodi precedentemente descritti, questi addotti non garantiscono un marcato aumento dell'efficacia del trattamento.

Questo studio ha mostrato come solo il complesso **38** venga inglobato in quantità apprezzabile (50%) mentre i complessi **36** e **37** vengono legati solo marginalmente dal DXS (10%). Oltre al problema legato alla quantità di farmaco inglobato, l'addotto **38-DXS** non rilascia quantitativamente il farmaco nell'arco di 24h.

Questi aspetti limitano l'utilizzo di questa tipologia di addotti in studi biologici successivi.

7.7 Bibliografia

1. M. Gordon, S. Hollander. *J. Med.*, 1993, 24, 209.
2. M. Christian, Abstracts, *7th International Symposium on Platinum and other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemiotherapy.*, 1995, S128.
3. 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.

8. *Articoli*

1. Ravera, M.; Gabano, E.; Pelosi, G.; Fregonese, F.; Tinello, S.; Osella, D.; *A New Entry to Asymmetric Platinum(IV) Complexes via Oxidative Chlorination*; *Inorg. Chem.*, 2014, 53 (17), pp 9326–9335.
2. Gabano, E.; Gama, S.; Mendes, F.; Fregonese, F.; Paulo, A.; Ravera, M.; *Application of microwave-assisted heating to the synthesis of Pt(II) complexes*; *Inorganica Chimica Acta*, 2015, pp 16-19.
3. Pelosi, G.; Ravera, M.; Gabano, E.; Fregonese, F.; Osella, D.; *Unprecedented one-pot synthesis of an unsymmetrical cisplatin-based Pt(IV)-acetamidato complex*; *Chem. Commun.*, 2015, 51(38), pp 8051-3.
4. Ravera, M.; Gabano, E.; Zanellato, I.; Fregonese, F.; Pelosi, G.; Platts, J.; Osella, D.; *Antiproliferative activity of a series of cisplatin-based Pt(IV)-acetylamido/carboxylato prodrugs*; *Dalton Trans.*, 2016, Accepted Manuscript