



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Scuola di  
Scienze Matematiche  
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica  
Curriculum Scienze Chimiche

**Sintesi e caratterizzazione di  
[Ru<sub>2</sub>(μ-OOCCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl]. Studi di interazioni  
con target biologici e comparazione con il  
suo analogo di rodio.**

**Synthesis and characterization of  
[Ru<sub>2</sub>(μ-OOCCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl]. Studies of  
interactions with biological targets and  
comparison with its rhodium analogue.**

**Relatore**  
Luigi Messori

**Correlatori**  
Alessandro Pratesi; Tiziano Marzo

**Candidato**  
Sara Banfi

## Sommario

<b>1. Introduzione.....</b>	<b>4</b>
1.1 Composti inorganici come farmaci .....	4
1.2 Antitumorali metallici.....	5
1.2.1 <i>Il cisplatino</i> .....	5
1.2.2 <i>Antitumorali di seconda generazione</i> .....	10
1.3 I composti di Rutenio .....	16
1.4 I complessi dinucleari.....	21
<b>2. Scopo della tesi.....</b>	<b>25</b>
<b>3. Risultati .....</b>	<b>27</b>
3.1 Caratterizzazione e comportamento in soluzione dei complessi $[\text{Ru}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_4\text{Cl}]$ (14) e $[\text{Rh}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_4]$ (15).....	27
3.2 Interazioni con target biologici modello .....	32
3.2.1 <i>Interazione con lisozima</i> .....	32
3.2.2 <i>Interazione con oligonucleotide modello</i> .....	37
3.2.3 <i>Interazione con albumina</i> .....	40
<b>4. Conclusioni.....</b>	<b>45</b>
<b>5. Procedure sperimentali.....</b>	<b>47</b>
5.1 Materiali.....	47
5.2 Sintesi di cloruro di dirutenio(II,III)tetracetato (14) .....	48
5.3 Preparazione dei campioni per analisi UV-Vis .....	49
5.3.1 <i>Preparazione del campione per la caratterizzazione Uv-Vis del complesso <math>[\text{Ru}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_4\text{Cl}]</math> (15)</i> .....	49
5.3.2 <i>Preparazione del campione per lo studio del comportamento di</i>	

<i>[Rh<sub>2</sub>(μ-OOCCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] (15) in soluzione.....</i>	<i>50</i>
<i>5.3.3 Preparazione dei campioni per lo studio dell'interazione dei complessi con albumina.....</i>	<i>51</i>
5.4 Preparazione dei campioni per spettrometria di massa .....	51
5.5 Spettrometro di massa .....	53

# 1. Introduzione

## 1.1 Composti inorganici come farmaci

La presenza di alcuni metalli all'interno dell'organismo umano risulta fondamentale per lo svolgimento delle funzioni di diverse proteine e enzimi.

Scopo della chimica bioinorganica è proprio quello di studiare e comprendere il ruolo di questi elementi nei sistemi biologici.

Un ramo di questa disciplina si occupa di impiegare molecole contenenti centri metallici in campo medico nel trattamento di varie patologie. Tra le varie applicazioni terapeutiche è possibile citare l'utilizzo di composti a base di argento come antimicrobico e di ferro come antimalarico; farmaci a base di oro vengono utilizzati per il trattamento dell'artrite reumatoide e la somministrazione di composti di vanadio sembra poter alleviare i sintomi del diabete.<sup>1,2</sup>

L'uso di farmaci contenenti centri metallici risulta inoltre fondamentale nel trattamento di numerose patologie neoplastiche. Tra le sostanze più efficaci all'interno di questa categoria farmacologica, troviamo i composti a base di platino, che si dimostrano estremamente attivi nel trattamento di particolari tipi di tumore solido tra cui i tumori del testicolo, dell'ovaio e della vescica.<sup>3</sup>

L'interesse verso questo tipo di composti nasce intorno agli anni '60 a seguito della scoperta del cisplatino e dei suoi effetti dannosi sul processo di scissione cellulare ad opera di Rosenberg.<sup>1</sup>

Dalla scoperta di Rosenberg molti sforzi sono stati dedicati dalla comunità scientifica per sviluppare nuovi composti di coordinazione a base metallica con proprietà

---

<sup>1</sup> Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T., *Nature*, **1965**, 205, 698.

<sup>2</sup> Whitehead P. J., Lippard S. J., Sigel A., Sigel H.(ed), *Marcel Dekker, Inc.*: New York, **1996**, vol.32

<sup>3</sup> Orvig C., Abrams M.J., *Chem. Rev.* **1999**, 99.

antitumorali al fine di ottenere sostanze con un'efficacia superiore, una ridotta tossicità e una selettività migliore per il tessuto canceroso.

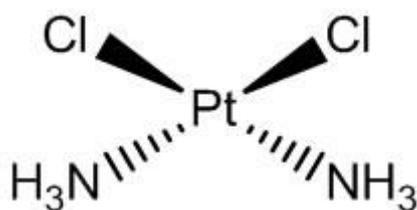
## 1.2 Antitumorali metallici

### 1.2.1 Il cisplatino

Il cisplatino (cis-diclorodiamminoplatino(II)) (**1**) mostrato in figura 1.1 è stato il primo complesso metallico impiegato in clinica nel trattamento chemioterapico dei tumori e occupa ormai da molti anni un ruolo primario in questo campo.

È utilizzato da solo o in combinazione con altri farmaci nel trattamento del carcinoma orofaringeo, dei bronchi, dei polmoni, della vescica, della cervice uterina, dell'osteosarcoma e del neuroblastoma.<sup>4</sup>

Questo composto è stato ampiamente studiato e attualmente abbiamo prove evidenti riguardo al suo meccanismo di azione.<sup>5</sup>



**Fig. 1.1** Formula di struttura del cisplatino (**1**)

<sup>4</sup> Wong E., Giandomenico C. M., *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2451-2466.

<sup>5</sup> Lee K.B., Wang D., Lippard S.J., Sharp P.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 4239

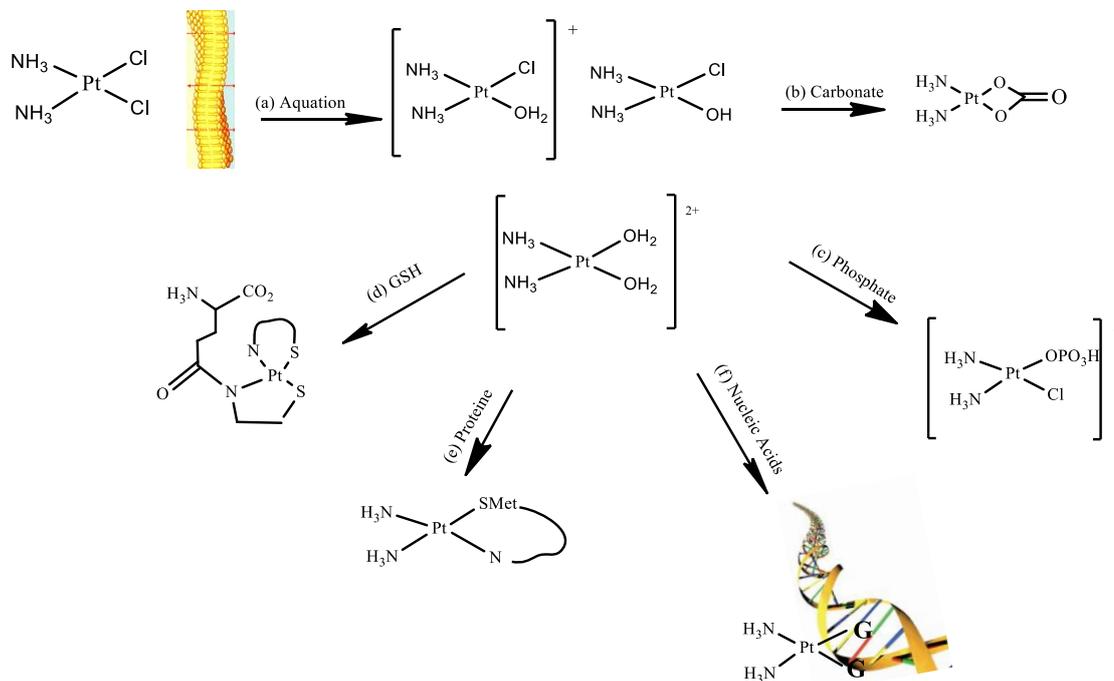
Il composto **1** è un complesso del platino II ( $d^8$ ) avente coordinazione quadrata planare con 2 leganti Cl e 2 leganti  $NH_3$  e riesce a svolgere la sua funzione grazie alla tendenza mostrata dai leganti Cl ad essere sostituiti da molecole di acqua.

All'interno del sistema circolatorio questa sostituzione viene limitata dall'elevata concentrazione di ioni cloruro (100 mM), garantendo così l'integrità del complesso fino all'arrivo all'interno della cellula.

Attraverso processi di diffusione passiva (presenza di un gradiente di concentrazione) e processi di diffusione attiva (presenza di appositi trasportatori di membrana), il cisplatino riesce a penetrare all'interno della membrana cellulare tumorale.

La bassa concentrazione di ioni  $Cl^-$  (circa 4-20 mM) nel citoplasma permette la sostituzione dei leganti cloruro con una molecola di acqua rendendo il complesso incapace di fuoriuscire dalla cellula.

Il prodotto farmacologicamente attivo è  $[Pt(NH_3)_2Cl(H_2O)]^+$ ; così sostituito il complesso risulta attivo e capace di interagire con il DNA contenuto all'interno del nucleo cellulare, inducendo l'apoptosi. A questo si affiancano altri prodotti ottenuti dalla sostituzione con leganti solfati e fosfati o con un'ulteriore molecola di acqua.



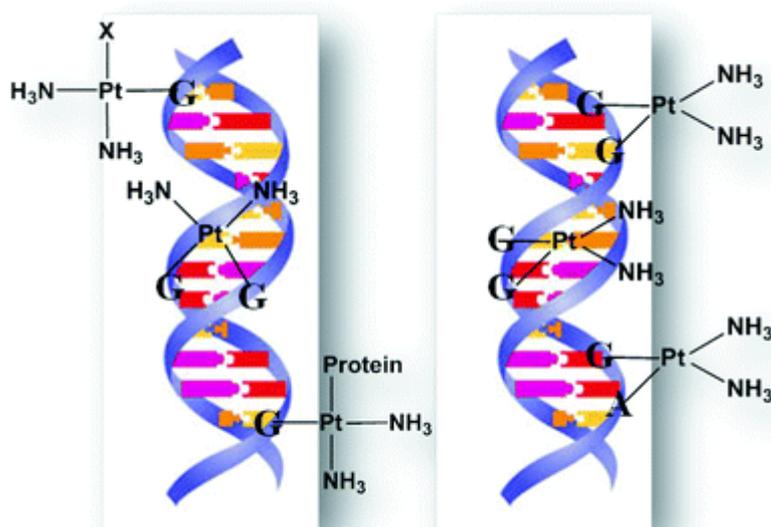
**Fig.1.2** Rappresentazione schematica della reattività del cisplatino all'interno del citoplasma.

La citotossicità del complesso è prevalentemente dovuta alla capacità dello ione metallico di coordinarsi agli atomi di azoto contenuti negli anelli imidazolici dei residui di guanina.

Nonostante la grande affinità per lo zolfo, il legame più stabile dal punto di vista termodinamico è infatti quello tra platino e azoto; si ha così la formazione di un legame tra una molecola di guanina e una molecola del composto **1** monoidrolizzata. La reazione solitamente prosegue: gli addotti finali possono coinvolgere un secondo atomo donatore che può legarsi tramite una diretta sostituzione del cloruro o tramite una prima sostituzione del cloruro da parte dell'acqua, quindi una successiva sostituzione dell'acqua formando diversi tipi di addotti a seconda della natura del secondo donatore. Sono comuni legami *intrastrand cross-link* (cioè all'interno dello stesso filamento) tra due guanine adiacenti e legami tra una guanina ed una adenina.

Altre forme di coordinazione prevedono l'interazione del metallo con due residui di guanina di filamenti opposti (*interstrand cross-link*) o la formazione di addotti metallo-proteina, in particolare con quelle ricche di amminoacidi solforati.

Questi legami provocano delle importanti distorsioni nella geometria del DNA piegando la doppia elica anche di 40° e inibendo così la replicazione e la trascrizione.<sup>5,6</sup>



**Fig.1.3** Rappresentazione dei possibili siti di legame del complesso lungo la struttura del DNA.

Il composto **1**, nonostante i suoi enormi vantaggi, ha dei considerevoli effetti collaterali principalmente dovuti al fatto che non è selettivo verso le cellule cancerose.

Dato che le cellule tumorali hanno la caratteristica di riprodursi molto più velocemente rispetto a quelle sane è evidente che risentono in misura maggiore della

<sup>6</sup> Kelland L., *Nat Rev Cancer* 7: 573-584

presenza del farmaco ma questo agisce anche su cellule che si riproducono velocemente come quelle presenti nei reni o nei bulbi piliferi.<sup>7</sup>

Va poi considerato che il composto **1** purtroppo non è sempre efficace poiché le cellule tumorali in alcuni casi possono sviluppare fenomeni di resistenza.<sup>6</sup>

Alcune cellule sono in effetti già intrinsecamente resistenti al suo effetto, mentre altre lo diventano man mano che la terapia procede.

I meccanismi tramite i quali viene esercitata questa resistenza sono molteplici e non completamente noti. Tra le principali cause dell'insorgere di fenomeni di resistenza troviamo la diminuzione della concentrazione del composto **1** all'interno della cellula, sia per la difficoltà di attraversamento della membrana dovuta alla mancanza della proteina CTR-1, trasportatore di membrana del rame che favorisce l'ingresso del farmaco nella cellula, sia a causa dell'aumento nel citoplasma di specie contenenti amminoacidi solforati in grado di reagire con il platino. Infatti anche se il legame Pt-N risulta termodinamicamente favorito, quello tra Pt e S risulta favorito dal punto di vista cinetico e l'aumento della concentrazione intracellulare di queste specie, determina la diminuzione della percentuale di platino disponibile a legarsi al DNA. Le proteine principalmente coinvolte sembrano essere le metallotioneine e il tripeptide glutatione che formano addotti stabili attraverso residui cisteinici con il composto **1**.

L'addotto Pt-glutatione inoltre può essere espulso dalla cellula grazie ad una serie di proteine di membrana, chiamate pompe d'efflusso GS-X.

Anche dopo l'interazione tra composto **1** e il DNA non è detto che il farmaco riesca a svolgere fino in fondo la sua attività citotossica.

Il DNA è infatti "protetto" da una serie di meccanismi capaci di correggere difetti e lesioni. In questa maniera il nostro corredo genetico può resistere ai continui attacchi che subisce (sotto forma di radioattività naturale, sostanze tossiche, ma anche

---

<sup>7</sup> Keppler B.K., *VCH*, Weinheim, New York , **1993**, 391

mutazioni e difetti casuali).

È stato dimostrato che alcune linee cellulari resistenti al cisplatino mostrano una migliore capacità rispetto ad altre cellule di riparare il DNA e rimuovere gli addotti con il platino.<sup>6</sup>

Il meccanismo di riparazione che sembra giocare il ruolo più importante per sopperire ai danni prodotti dal composto **1** sembra essere il NER (riparazione per escissione di nucleotidi). La via NER consiste nella rimozione e nella successiva sostituzione del segmento di DNA danneggiato, intervenendo tramite il riconoscimento di distorsioni della doppia elica (GG-NER, *global genomic-nucleotide excision repair*) oppure in fase di trascrizione (TC-NER, *transcription coupled-nucleotide excision repair*).

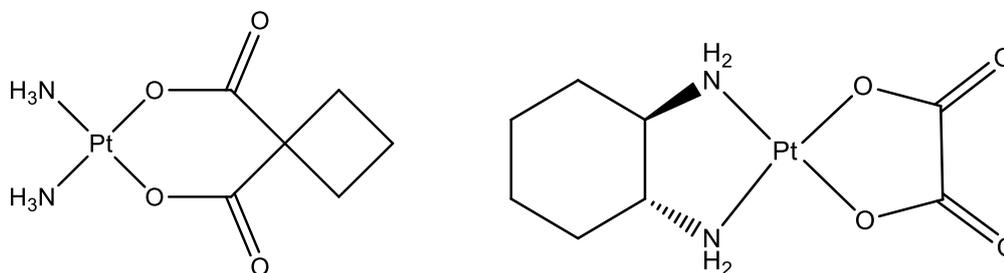
### **1.2.2 Antitumorali di seconda generazione**

Nel tentativo di minimizzare gli effetti collaterali legati alla tossicità del cisplatino e aumentarne l'efficacia farmacologica, negli ultimi decenni molte ricerche si sono concentrate su nuovi composti di platino.

Ad oggi ne sono stati sintetizzati e valutati centinaia; tuttavia nella maggior parte dei casi si sono ottenuti composti con caratteristiche farmacologiche spesso assolutamente sovrapponibili a quelle dello composto **1** e solo pochissimi sono stati riconosciuti come agenti chemioterapici di uso clinico.

Possiamo menzionare il carboplatino (**2**) e l'oxaliplatino (**3**) (*fig.1.4*) che possiedono entrambi un meccanismo d'azione simile composto **1**, con il vantaggio che il primo (**2**) possiede una minore tossicità ed analoga efficacia e l'altro (**3**), meno dipendente dal trasportatore CTR1, mostra maggiore attività nel trattamento di alcuni tumori

resistenti al cisplatino, in particolare nei confronti di quello del colon-retto.<sup>8,9</sup>



**Fig. 1.4** Formula di struttura di carboplatino a sinistra (2)  
e l'oxaliplatino a destra (3)

Sebbene i complessi di platino siano i composti più intensamente studiati come farmaci antitumorali, la ricerca è stata estesa allo studio di altri metallo-farmaci.

I complessi del titanio hanno dimostrato di possedere un'ampia gamma di proprietà antitumorali, pur presentando un meccanismo di azione che si differenzia da quello del platino. Attualmente sono oggetto di studi clinici i complessi budotitanio (4) e titanocene(5) (fig.1.5), i quali si sono rivelati particolarmente efficaci nei confronti del carcinoma dell'intestino e del seno.<sup>10,11</sup>

In particolare il composto 4 è stato il primo complesso non basato sul platino a essere sottoposto a test clinici, i quali hanno dimostrato un limite di dosaggio più elevato rispetto ai composti di coordinazione del platino. A questo risultato si contrappone la necessità di un trattamento cronico per ottenere gli effetti desiderati; ciononostante alcune ricerche hanno dimostrato una grande potenzialità del composto utilizzato in

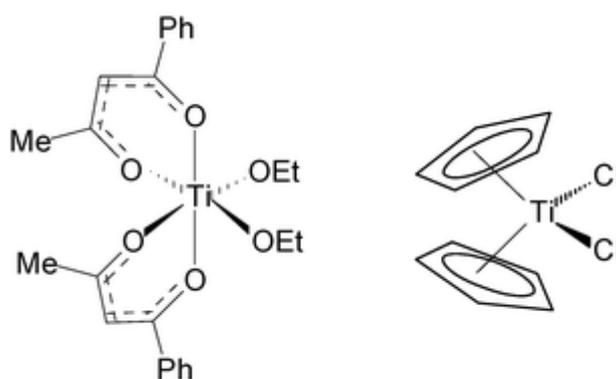
<sup>8</sup> Hannon M.J., *Pure Appl. Chem.*, **2007**, 79, 12, 2243-2261.

<sup>9</sup> Graham J., Muhsin M., Kirkpatrick P., *Nature Reviews*, **2004**, 3, 11-12.

<sup>10</sup> Melendez E., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2002**, 42, 309-315

<sup>11</sup> Clarke M.J., Zhu F., Frasca D.R., *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2511-2533

combinazione con altri farmaci antitumorali.<sup>12</sup>



**Fig. 1.5** Formula di struttura del budotitanio a sinistra (4)  
e del titanocene a destra (5).

Un altro esempio significativo di metallo-farmaci con proprietà antitumorali è costituito dai complessi a base di oro che hanno attirato l'interesse dei ricercatori fin dai primi anni '80 per la loro stretta affinità strutturale ed elettronica con i composti di platino.

L'Au(III) è sia isoelettronico ( $d^8$ ) che isostrutturale con il Pt(II); i complessi a geometria quadrata planare di Au(III) si sono dimostrati degli eccellenti e innovativi candidati per test di citotossicità anche se, in diversi casi, hanno mostrato una stabilità cinetica molto più bassa rispetto a quelli del platino, oltre a presentare una discreta sensibilità alla luce e la tendenza a ridursi ad oro metallico.<sup>13,14</sup>

Nel successivo decennio la ricerca in questo settore ha ricevuto un notevole impulso

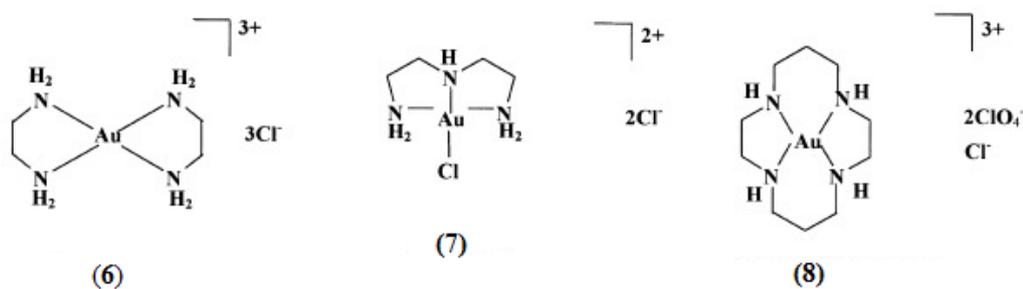
<sup>12</sup> Köpf-Maier P., Köpf H., Wagner W., *Naturwissenschaften*, **1981**, 68, 272-273

<sup>13</sup> Casini A., Cinellu M.A., Minghetti G., Gabbiani C., Coronello M., Mini E., Messori L., *J Med Chem*, **2006**, 49:5524–5531

<sup>14</sup> Cinellu M.A., Maiore L., Manassero M., Casini A., Arca M., Fiebig H.H., Kelter G., Michelucci E., Pieraccini G., Gabbiani C., Messori L., *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 336–339

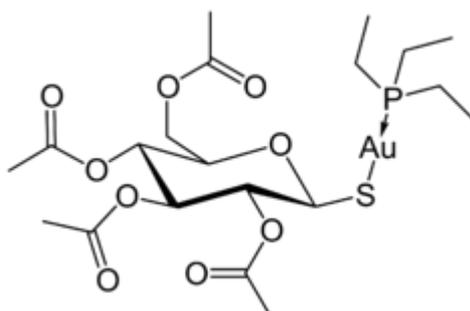
dovuto allo sviluppo di nuove tipologie di leganti per lo ione Au(III) che assicuravano maggiore stabilità, minore citotossicità e generalmente migliori proprietà farmacologiche in vitro. Vari composti antitumorali di Au(III) hanno dimostrato di superare la resistenza manifestata al cisplatino e ad altri farmaci antitumorali, e di causare la morte cellulare per apoptosi tramite processi DNA-indipendenti.

Tra i composti di Au(III) si può citare  $[\text{Au}(\text{en})_2]\text{Cl}_3$  (**6**),  $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}_2$  (**7**),  $[\text{Au}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2\text{Cl}$  (**8**),  $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}_2$  (**9**) e  $[\text{Au}(\text{phen})\text{Cl}_2]\text{Cl}$  (**10**), mostrati in figura 1.6 e 1.7



**Fig. 1.6** Rappresentazione delle formule di struttura di  $[\text{Au}(\text{en})_2]\text{Cl}_3$  (**6**),  $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}_2$  (**7**), e di  $[\text{Au}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2\text{Cl}$  (**8**).





**Fig. 1.8** Formula di struttura di Auranofin (II)

Grazie ai numerosi studi in vitro, sono state formulate una serie di ipotesi sulle possibili modalità di azione dei composti di oro. Tuttavia, i meccanismi molecolari responsabili dei loro effetti biologici sono in gran parte ancora sconosciuti anche se i risultati ottenuti in questi anni hanno identificato alcune probabili cause di citotossicità di questi composti.<sup>18</sup>

In particolare, sono stati ipotizzati danni diretti al DNA, modifiche del ciclo cellulare, danni mitocondriali, inibizione del proteosoma e la modulazione di chinasi specifiche.

Secondo la modalità di azione di questi complessi di oro sui bersagli biologici è possibile definire tre classi principali:

- Classe 1: Composti di Au come profarmaci, in grado di coordinarsi strettamente, dopo attivazione, a catene laterali di biomolecole (es. tioli, imidazoli, e selenoli). Questo comportamento implica un meccanismo di metallazione simile a quello dei composti di Platino.
- Classe 2: Complessi di Au come cationi, in grado di attraversare le membrane e di legarsi non covalentemente a biomolecole (proteine, enzimi, DNA).
- Classe 3: Composti di Au capaci di interagire con biomolecole attraverso la chimica

<sup>18</sup>Nobili S., Mini E., Landini I., Gabbiani G., Casini A., Messori L., *Medicinal Research Reviews* **2010**, Vol.30, No.3,550--580

redox.

### 1.3 I composti di Rutenio

In anni recenti i composti di rutenio hanno attirato l'attenzione della comunità scientifica per le potenzialità possedute come agenti antitumorali e, ad oggi, sono considerati una promettente alternativa ai composti del platino.

I complessi di rutenio possiedono infatti alcune proprietà chimiche che li rendono buoni candidati per la progettazione di farmaci antitumorali in quanto mostrano una buona stabilità in ambiente fisiologico, una cinetica di scambio dei leganti simile a quella dei composti di platino e, analogamente al platino, una elevata affinità per azoto e zolfo.<sup>19</sup>

Il grande potenziale dei composti di rutenio è però dovuto alla maggiore selettività che questi manifestano verso il tessuto canceroso rispetto ai farmaci di Pt(II).

Per lo ione rutenio sono accessibili in soluzione acquosa due differenti stati di ossidazione: Ru(II), avente configurazione elettronica  $d^6$  basso spin, e Ru(III) caratterizzato da uno stato  $d^5$  paramagnetico; le due configurazioni descritte permettono ai complessi di Ru di partecipare a reazioni di ossido-riduzione con componenti biologici.<sup>20</sup>

La possibilità di sfruttare le proprietà di entrambe le specie ha portato allo sviluppo di complessi che contengono rutenio(III) in qualità di profarmaci cioè composti non attivi e privi di citotossicità intrinseca al momento della somministrazione che si riducono a Ru(II), stato ossidativo in cui si manifesta l'attività farmacologica del composto di coordinazione, dopo aver raggiunto il tessuto tumorale. Questo è

---

<sup>19</sup>Allardyce C.S., Dyson P.J., *Platinum Metals Rev*, **2001** Rev 45: 62–69

<sup>20</sup>Clarke M.J., Zhu F., Frasca D.R., *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2511–2533

possibile poiché il tessuto canceroso possiede un potenziale di riduzione caratteristico dovuto a un minor contenuto di ossigeno e un pH inferiore rispetto al tessuto sano.<sup>20</sup>

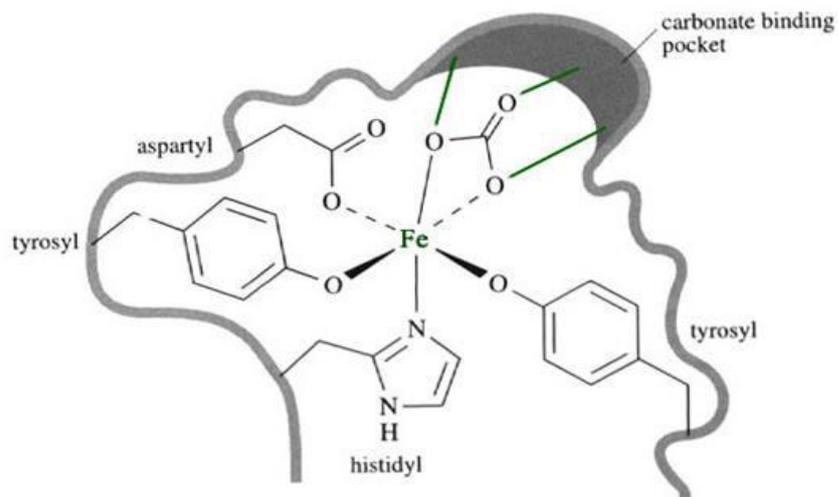
Una altra caratteristica che contraddistingue questi complessi è la geometria: diversamente dalla geometria quadrata planare del Pt(II), entrambi gli ioni Ru(II) e Ru(III) sono esacoordinati con geometria ottaedrica.

Tale differenza strutturale suggerisce che l'azione antitumorale del rutenio si svolga in maniera differente da quella del cisplatino, utilizzando meccanismi molecolari diversi sia per quanto riguarda il trasporto che l'interazione con bersagli molecolari.<sup>21</sup>

È stato dimostrato che la somiglianza esistente tra ioni del ferro e del rutenio trivalente rende incapace la transferrina, glicoproteina addetta al trasporto di Fe(III) nel sangue, di operare una distinzione tra i due metalli. Questa proteina mostra infatti un elevato grado di affinità sia verso il ferro che verso il rutenio sfruttando i 2 siti di legame contenenti 2 gruppi fenolici (forniti da residui di tirosina), un residuo di istidina ed uno di aspartato.

---

<sup>21</sup> Jamieson E.R., Lippard S.J., *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2467



**Fig. 1.9** Sito di coordinazione del metallo all'interno della transferrina

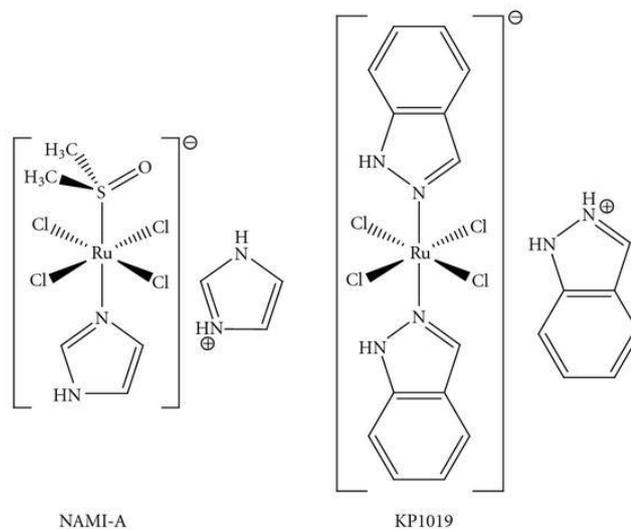
Sulla membrana di una cellula tumorale è presente un numero più elevato di recettori per la transferrina (le componenti neoplastiche, crescendo più rapidamente e in maniera incontrollata necessitano di un maggior apporto di ferro), determinando una maggiore diffusione di questi composti al loro interno.

La capacità del rutenio di “imitare” il ferro e quindi di legarsi a molte molecole biologiche, comprese le proteine del siero (albumina e transferrina), sembra contribuire alla bassa tossicità dei farmaci di rutenio.<sup>19</sup>

Tra i metallo-farmaci di rutenio vanno sicuramente menzionati il NAMI-A (**12**) e il KP1019 (**13**) (*fig.1.10*). Questi due composti hanno mostrato un'intensa attività antitumorale e hanno già concluso la prima fase di test clinici.<sup>22,23</sup>

<sup>22</sup> Alessio E.; Mestroni G.; Bergamo A., Sava G., *Curr. Top Med. Chem.* **2004**, 4(15): 1525-35

<sup>23</sup> Hartinger C.G., Zorbas-Seifried S., Jakupec M.A., Kynast B., Zorbas H., Keppler B.K., *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 891



**Fig.1.10** Formule di struttura di NAMI-A (**12**) e KP1019(**13**)

Rispetto agli attuali farmaci antitumorali, in particolare rispetto a quelli a base di platino, il composto **12** presenta il vantaggio di possedere un'azione selettiva sulle metastasi senza essere troppo tossico per le cellule normali.<sup>22</sup>

I target finali ed i meccanismi attraverso i quali il composto **12** esercita il suo effetto citotossico non sono ancora del tutto confermati. In ogni caso sembra che il meccanismo di azione differisca da quello del cisplatino e dei suoi analoghi.

Alcune ricerche hanno evidenziato una scarsa attitudine del composto a instaurare legami stabili con i filamenti del DNA e ciò presuppone un meccanismo di azione basato su target di origine proteica.

In letteratura è documentata la formazione di addotti stabili tra il composto **12** e proteine del siero come albumina e transferrina<sup>24,25</sup> e con proteine modello quali

<sup>24</sup> Bergamo A., Messori L., Piccioli F., Cocchietto M., Sava G., *Invest. New Drugs*, **2003**, 21(4): 401-411

<sup>25</sup> Messori, L., Orioli P, Vullo D., Alessio E., Iengo E., *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267(4): 1206

citocromo c e lisozima.<sup>26</sup>

Per quanto riguarda il composto **13** ([trans-tetraclorobis-indazolo Ru(III)]), strutturalmente simile al **12**, si è mostrato particolarmente efficace nei confronti del cancro al colon-retto,<sup>27</sup> ma non ha manifestato rilevanti effetti sulle metastasi.<sup>28</sup> Anche per questo composto il meccanismo di azione è sconosciuto.

Più recentemente è aumentato l'interesse verso alcuni composti organometallici, in particolare una serie di areni di Ru(II) di formula [Ru( $\eta^6$ -arene)Cl(en)][PF<sub>6</sub>] ha mostrato eccellenti proprietà antiproliferative *in vivo* e *in vitro* contro linee cellulare resistenti al cisplatino.<sup>29,30,31</sup>

Di grande interesse sono anche i composti di formula generale [Ru( $\eta^6$ -arene)Cl<sub>2</sub>(PTA)] (PTA=1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano) (RAPTA), per esempio [Ru( $\eta^6$ -toluene)(PTA)Cl<sub>2</sub>] (RAPTA-T), mostrato in figura 1.11, si è dimostrato selettivo contro tumori secondari in modo simile al composto **12**.<sup>32</sup>

---

<sup>26</sup> Casini A., Mastrobuoni G., Terenghi M., Gabbiani C., Monzani E., Moneti G., Casella L., Messori L., *J.Biol. Inorg. Chem.*, **2007**, 12(8): 11071117.

<sup>27</sup> Timerbaev A.R., Hartinger C.G., Aleksenko S.S., Keppler B.K., *Chem. Rev.* **2006**, 106, 2224.

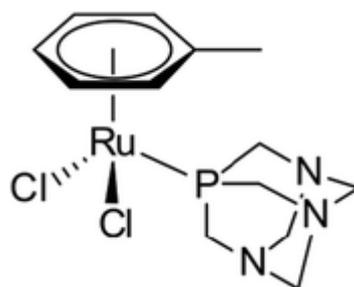
<sup>28</sup> Zorzet, S., Bergamo A., Cocchietto M., Sorc A., Gava B., Alessio E., Iengo E., Sava G. J., *Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 295, 927.

<sup>29</sup> Aird R.E., Cummings J., Ritchie A.A., Muir M., Morris R.E., Chen H., Sadler P.J., Jodrell D.I., *Br. J. Cancer*, **2002**, 94, 1652.

<sup>30</sup> Allardyce C.S., Dyson P.J., Ellis D.J., Heath S.L., *Chem. Commun.*, **2001**, 15, 1396.

<sup>31</sup> Scolaro C., Bergamo A., Brescacin L., Delfino R., Cocchietto M., Laurency G., Geldbach T.J., Sava G., Dyson P.J., *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 4161.

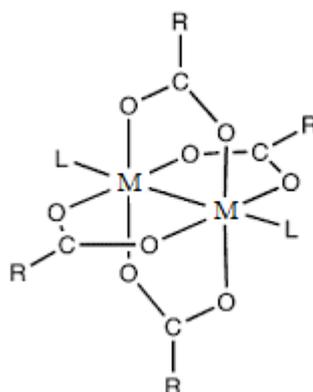
<sup>32</sup> Dyson P.J., *Chimia*, **2007** 61, 698.



**Fig.1.11** Formula di struttura di RAPTA-T

## 1.4 I complessi dinucleari

Tra i composti con proprietà antitumorali conosciuti possiamo menzionare alcuni complessi dinucleari di formula  $[M_2(COOR)_4(L)_x]^{n+}$  con  $M = Ru$  o  $Rh$ . La particolare struttura a lanterna di questi composti (*fig.1.12*), costituita da un nucleo che presenta un forte legame metallo-metallo con 4 leganti carbossilato a ponte, sembra avere importanti effetti citotossici su numerose linee cellulari.<sup>33</sup>



**Fig.1.12** Struttura a lanterna di un generico complesso dinucleare di formula  $[M_2(COOR)_4(L)_x]^{n+}$

<sup>33</sup> Chifotides H. T., Dunbar K. R., *Acc. Chem. Res.*, **2005**,38,146-156

Una delle più giovani e potenzialmente più interessanti famiglie tra questi composti di coordinazione dinucleari, è quella dei complessi di rutenio di formula  $[\text{Ru}_2(\text{COOR})_4(\text{L})_x]^{n+}$  con un nucleo a valenza mista ( $\text{Ru}_2(\text{II,III})$ ).

La particolare struttura, l'elevata stabilità e le peculiari proprietà chimico-fisiche<sup>34</sup> hanno fatto crescere negli ultimi anni un interesse sempre maggiore verso questi composti per le possibili applicazioni in vari settori tra cui quello dei materiali porosi<sup>35</sup>, dei catalizzatori<sup>36</sup> e delle architetture supramolecolari<sup>37</sup> oltre al già citato potenziale come metallo-farmaci nel trattamento di alcune forme tumorali.<sup>33,38</sup>

La prima sintesi di uno di questi complessi, in particolare di  $[\text{Ru}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_4\text{Cl}]$  (**14**), viene riportata nel 1966<sup>39</sup> e nel 1969 viene determinata la struttura cristallografica da F.A.Cotton e dai suoi collaboratori<sup>40</sup> che riportano le prime prove della presenza di un forte legame Ru-Ru con una distanza di legame di 2.284 Å e un ordine di legame pari a 2.5, i due centri metallici risultano equivalenti.

---

<sup>34</sup> Cotton F.A., Murillo C.A., Walton R.A., *Springer*, Heidelberg, **2005**, 3rd ed.

<sup>35</sup> Ribeiro G., Vichi F. M., de Oliveira Silva D., *J. Mol. Struct.*, **2008**, 890, 209–214.

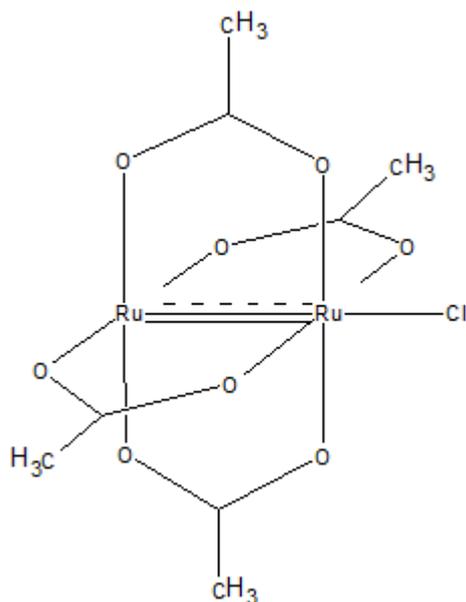
<sup>36</sup> Barker J. E., Ren T., *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 2264–2266

<sup>37</sup> Barral M. C., González-Pietro R., Herreo S., Jiménez-Aparicio R., Priego J. L., Royer E. C., Torres M. R., Urbanos F. A., Zamora F. J., *Clust. Sci.*, **2008**, 19, 219–230.

<sup>38</sup> Keppler B. K., Henn M., Juhl U. M., Berger M. R., Niebl R., Wagner F. E., *Prog. Clin. Biochem. Med.*, **1989**, 10, 41.

<sup>39</sup> Stephenson T.A, Wilkinson G., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1966**, 28, 2285–2291.

<sup>40</sup> Bennett M.J., Caulton K.G., Cotton F.A., *Inorg. Chem.*, **1969**, 8, 1–6



**Fig.1.11** Formula di struttura di  $[Ru_2(\mu-OOCCH_3)_4Cl]$  (**14**)

Recentemente il complesso **14** è stato utilizzato come precursore per la preparazione di una nuova classe di farmaci a base di diruteni.

I leganti carbossilati di questi nuovi composti derivano da farmaci antinfiammatori non steroidei quali ibuprofene, aspirina, naproxene<sup>41,42</sup> introdotti al fine di modulare l'attività biologica del complesso e in particolare l'attività citotossica. La scelta di utilizzare questo tipo di leganti deriva dal fatto che tali molecole possiedono una riconosciuta capacità chemio-preventiva rispetto a varie tipologie di cancro.

In questi nuovi composti, la cui struttura risulta dunque essere  $[Ru_2(dNSAID)_4]^+$  (dNSAID=deprotonated carboxylate from the non-steroidal anti-inflammatory drugs), permane il core  $Ru_2$  (II,III) a valenza mista e, in particolare i complessi che possiedono leganti che derivano da naproxene e ibuprofene, si dimostrano assai

<sup>41</sup> Ribeiro G., Benadiba M., Colquhoun A., de Oliveira Silva D., *Polyhedron*, **2008**, 27, 1131–1137

<sup>42</sup> Benadiba M., Santos R. R. P., de Oliveira Silva D., Colquhoun A., *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, 104, 928–935

efficaci rispetto all'inibizione della proliferazione in linee cellulari di glioma di ratto C6, modello per il tumore cerebrale maligno glioblastoma multiforme.<sup>43</sup>

Una seconda famiglia di composti dinucleari con promettente attività antitumorale *in vivo* e *in vitro* risulta essere quella dei complessi tetracarbossilati di dirodio(II)  $[\text{Rh}_2(\text{II})(\text{RCOO})_4\text{L}_2]$  (R=Me, Et, Ph or  $\text{CF}_3$ ; L= $\text{H}_2\text{O}$  o altri solventi)<sup>44,45</sup> ma ad oggi l'elevata tossicità a precluso il loro utilizzo.

Il meccanismo di azione non è ancora stato chiarito anche se alcuni studi hanno ipotizzato che questi composti interagiscono con il DNA e ne inibiscono la replicazione in maniera simile al cisplatino.

Attualmente numerosi studi si dedicano alla comprensione delle modalità di azione di questi nuovi composti.

---

<sup>43</sup> Andrade A., Namora S. F., Woisky R. G., Wiezel G., Najjar R., Sertie J. A. A., de Oliveira Silva D., *J.Inorg.Biochem.*, **2000**,81,23–27

<sup>44</sup> Hall L.M., Speer R.J., Ridgway H.J., *J. Clin. Hematol. Oncol.*, **1980**, 10, 25

<sup>45</sup> Bear J.L., Howard R.A., Dennis A.M., *Current Chemother.*, **1978**,1321

## 2. Scopo della tesi

L'ampio utilizzo del cisplatino come farmaco antitumorale ha indotto a progettare e testare nuove tipologie di complessi metallici in grado di superare i fenomeni di resistenza cellulare e di ridurre gli effetti collaterali di questo tipo di trattamento.

I complessi dinucleari sono stati teoricamente e sperimentalmente indagati per le loro particolari caratteristiche chimico-fisiche e alcuni complessi di dirutenio hanno mostrato di possedere un potenziale come farmaci antitumorali.<sup>38</sup> Recentemente anche alcuni composti di dirodio hanno manifestato proprietà citotossiche guadagnando un crescente interesse in questo ambito.<sup>44,45</sup>

In questo lavoro di tesi sono stati presi in esame i complessi **14** e **15**, composti di partenza per la sintesi di questi nuovi potenziali farmaci le cui proprietà chimiche e i processi biologici rimangono ancora in gran parte sconosciute.

Inizialmente è stato sintetizzato e caratterizzato attraverso spettroscopia UV-Vis il complesso **14**.

Successivamente il complesso **15** è stato studiato da un punto di vista chimico, caratterizzando il suo comportamento in soluzione tamponata a pH fisiologico tramite spettroscopia UV-Vis. al fine di paragonare il comportamento del complesso stesso rispetto al complesso **14** già precedentemente indagato.

Lo studio si è poi focalizzato sulla identificazione e caratterizzazione degli addotti che si possono eventualmente formare nelle reazioni fra i composti citotossici presi in esame e i target biologici scelti, quali la proteina modello lisozima, la proteina albumina e un oligonucleotide modello. L'analisi delle interazioni è stata svolta con misure spettrofotometriche nell'UV-Vis e con misure ESI-MS in alta risoluzione.

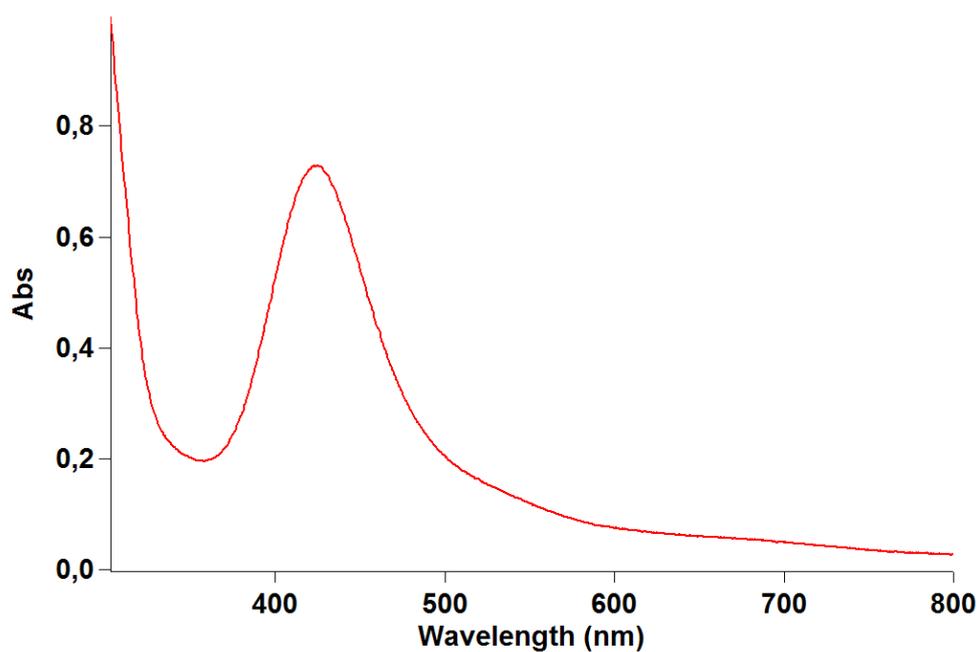
Arrivare a caratterizzare in modo puntuale l'interazione di questi complessi con target biologici modello può risultare di estrema importanza ed utilità; determinare

tali interazioni risulta un passo importante nella comprensione dei meccanismi attraverso cui questi composti esplicano la loro azione citotossica al fine di progettare metallo-farmaci sempre più efficaci.

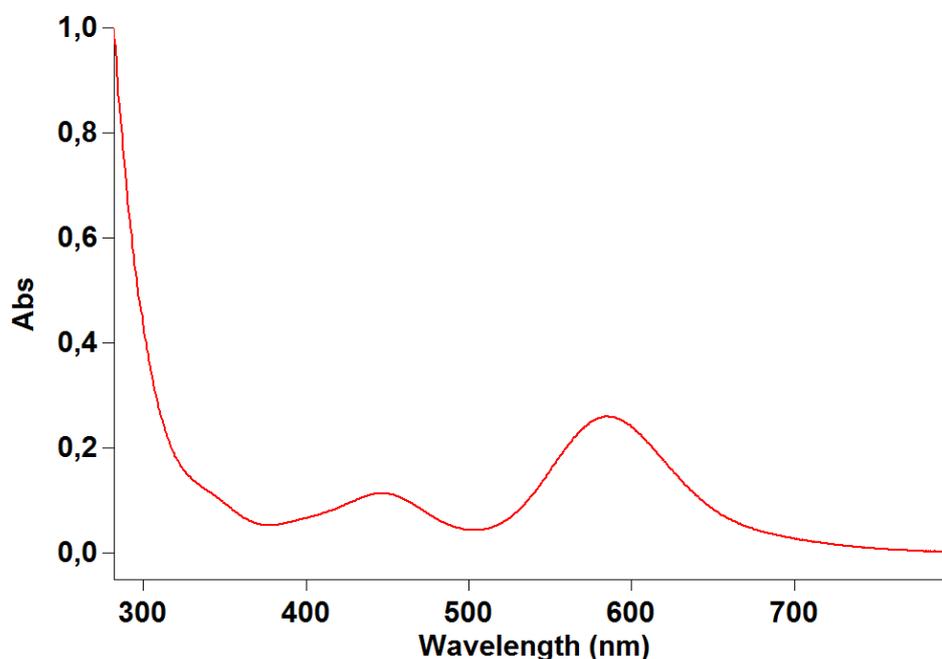
### 3. Risultati

#### 3.1 Caratterizzazione e comportamento in soluzione dei complessi $[\text{Ru}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_4\text{Cl}]$ (14) e $[\text{Rh}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_4]$ (15)

Si riporta lo spettro di assorbimento UV-Vis dei due complessi oggetto di studio in tampone ammonio acetato 20 mM, pH=6.8.



**Fig 3.1** spettro di assorbimento UV-Vis del composto **14**  $10^{-3}$  M in tampone ammonio acetato 20 mM, pH 6,8



**Fig 3.2** Spettro di assorbimento UV-Vis del composto **15**  $10^{-3}$  M in tampone ammonio acetato 20 mM, pH 6,8

Lo spettro riportato in figura 3.1 presenta una banda con  $\lambda_{\text{max}} = 424,9$  nm e  $\epsilon = 728$  L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>. Confrontando questo risultato con i dati riportati in letteratura possiamo confermare che il complesso sintetizzato è proprio il composto **14** e correlare la banda di assorbimento alla transizione elettronica LMCT (*Ligand to Metal Charge Transfer*),  $\pi(\text{Ru-O}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ . Il valore di  $\lambda_{\text{max}}$  di questa transizione risulta strettamente correlato alla natura del legante assiale e la presenza della banda ad alte energie indica la predominanza come principale cromoforo in soluzione della specie  $[\text{Ru}_2(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ .<sup>46</sup>

<sup>46</sup> R.L.S.R. Santos, R. van Eldik, D. de Oliveira Silva. *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 6615

In figura 3.2 si può invece osservare lo spettro UV-Vis del complesso **15**, caratterizzato dalla presenza di due bande di assorbimento:

$$\text{A. } \lambda_{1\text{max}}=445,5 \text{ nm} \quad \epsilon=114 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

$$\text{B. } \lambda_{2\text{max}}=584,5 \text{ nm} \quad \epsilon=260 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

la banda di assorbimento A è assegnata alla transizione  $\pi^*(\text{Rh}_2)\rightarrow\sigma^*(\text{Rh-O})$ , la banda B alla transizione  $\pi^*(\text{Rh}_2)\rightarrow\sigma^*(\text{Rh}_2)$ .<sup>47</sup>

È stato dimostrato come l'energia della banda di assorbimento A, usualmente osservata tra 530-660 nm, risulta strettamente dipendente dalla natura dei leganti assiali che il complesso di rodio può coordinare in soluzione. È stato precedentemente osservato che la sostituzione in posizione assiale di leganti O<N<P causa uno spostamento della banda a energie maggiori. Dunque monitorando l'assorbimento della banda è possibile osservare l'eventuale variazione delle specie in soluzione.<sup>48,49</sup>

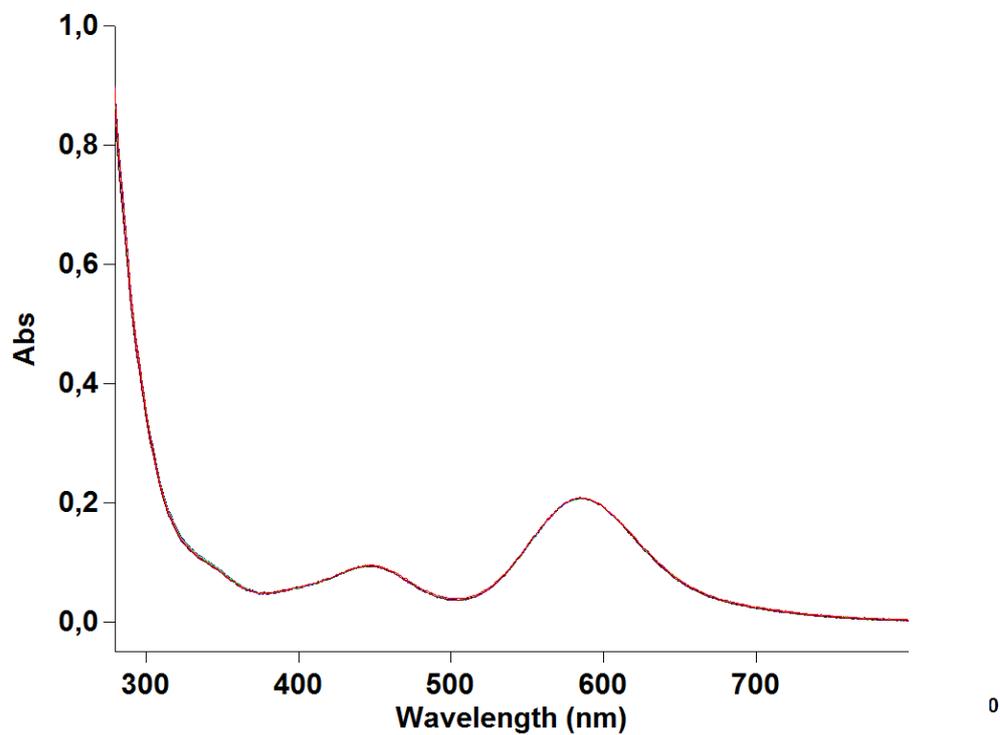
Utilizzando la spettrofotometria UV-visibile, è stato valutato il comportamento del composto **15** in soluzione a pH fisiologico per 24 ore, in presenza (*fig 3.4*) o in assenza (*fig 3.3*) di una proteina (lisozima HEWL), in modo da valutare la stabilità del complesso in soluzione e osservare le eventuali modifiche che possono verificarsi a causa della possibile interazione con la proteina.

---

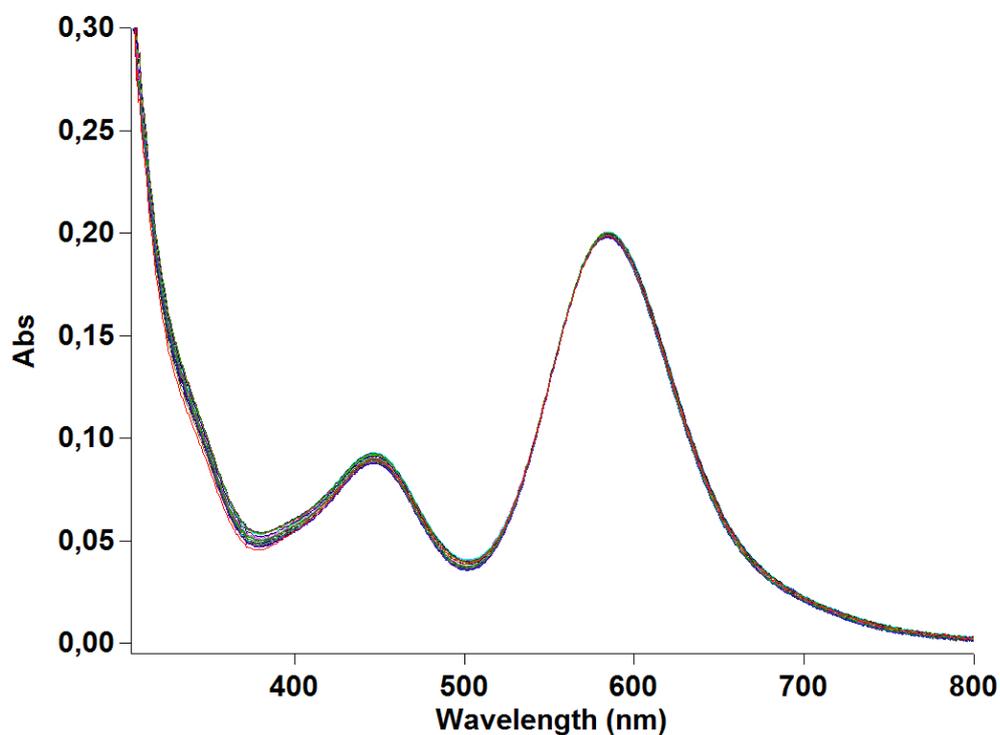
<sup>47</sup> Norman J. G, Renzoni G. E., Case D. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 5256-5267.

<sup>48</sup> Cotton F. A., Deboer B. G., Laprade M. D., Pipal J. R., Ucko D. A., *Acta Crystallogr B.* **1971** 27, 8

<sup>49</sup> Dubicki L., Martin R. L., *Inorg. Chem.*, **1970** 9, 773



**Fig 3.3** Spettro di assorbimento UV-Vis del composto **15**  $10^{-3}$  M in tampone ammonio acetato 20 mM, pH 6,8. Profili di Abs registrati in 24 h.



**Fig 3.4** Spettro di assorbimento UV-Vis del composto  $15 \cdot 10^{-3} M$  in presenza di HEWL (complesso/proteina=1:1) in tampone ammonio acetato 20 mM, pH 6,8. Profili di Abs registrati in 24 h.

Nelle 24 h non si osservano variazioni spettrali significative, quindi il composto risulta stabile nelle condizioni di analisi e non sembra interagire con la proteina.

Questi risultati possono essere confrontati con quelli ottenuti per l'analogo di rutenio precedentemente analizzato nelle medesime condizioni,<sup>50</sup> per il quale si osserva nelle 24 h di analisi un generale aumento dell'assorbanza tra 300 e 800 nm dovuto probabilmente a fenomeni di aggregazione e a formazione di specie oligomeriche. In presenza di lisozima non si manifesta più questo comportamento poiché

<sup>50</sup>Messori L., Marzo T., Nazar R., Sanches F., Rehman H.U., De Oliveira Silva D., Merlino A., *Angew. Chem. Int.* **2014**, 53, 6172–6175

probabilmente la metallazione della proteina impedisce i fenomeni di aggregazione mentre si nota un progressivo aumento dell'assorbanza nell'UV tra 300 e 370 nm e la comparsa di una debole banda nel visibile tra 500 e 700 nm correlabile alla sostituzione di una molecola di H<sub>2</sub>O in posizione assiale con un amminoacido della proteina.

## **3.2 Interazioni con target biologici modello**

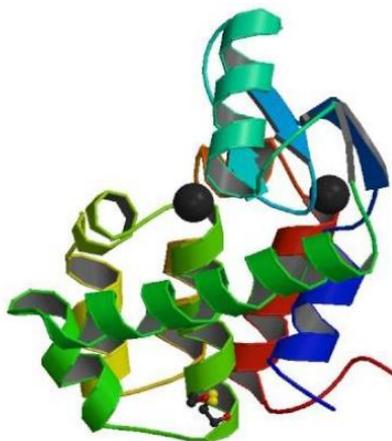
### **3.2.1 Interazione con lisozima**

Il primo target biologico utilizzato per valutare la reattività e caratterizzare il comportamento dei complessi metallici **14** e **15** è la proteina lisozima, utilizzando come metodo di indagine la spettroscopia di massa ad alta risoluzione con ionizzazione soft di tipo elettrospray (ESI-MS) che ci permette di ottenere precise informazioni sulla natura dei frammenti metallici legati alla proteina.

Il lisozima (14303 Da), presente in tessuti animali e dotato di attività battericida, è abbondantemente presente in numerose secrezioni animali e umane come ad esempio le lacrime e la saliva e si trova in concentrazioni abbastanza elevate nell'albume d'uovo.

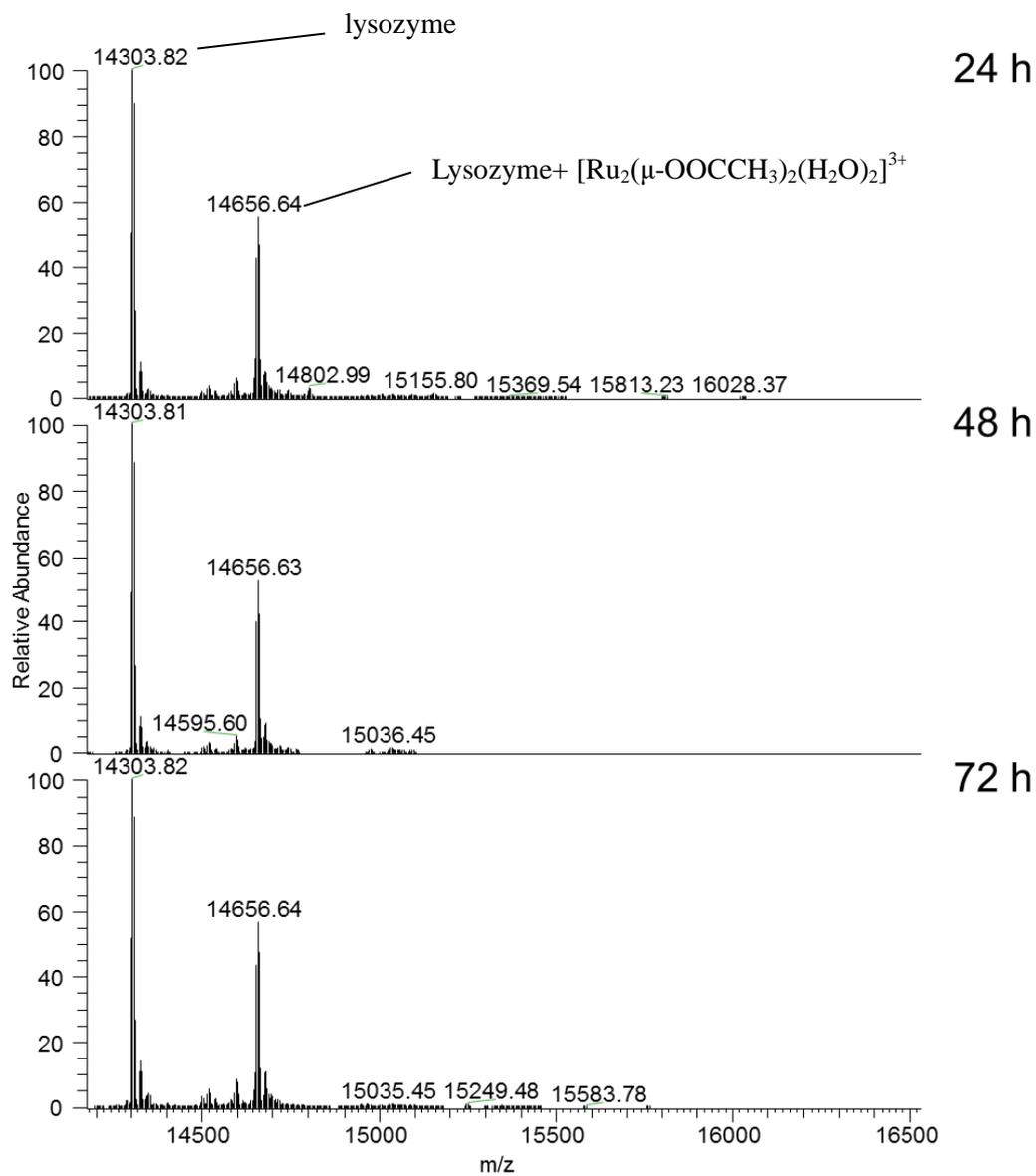
Questa proteina rappresenta una scelta di prim'ordine per questo metodo di analisi poiché, data la sua massa ridotta e la presenza su di esso di numerosi siti carichi positivamente, risulta essere particolarmente adatto per analisi ESI-MS; possiede inoltre la particolarità di riuscire a formare cristalli con relativa facilità rispetto ad altre proteine conosciute, rendendola un modello ideale per studiare la geometria degli addotti metallofarmaco-proteina tramite diffrattometria a raggi X. Nello

specifico il lisozima utilizzato è della tipologia HEWL (Hen Egg White Lysozime).

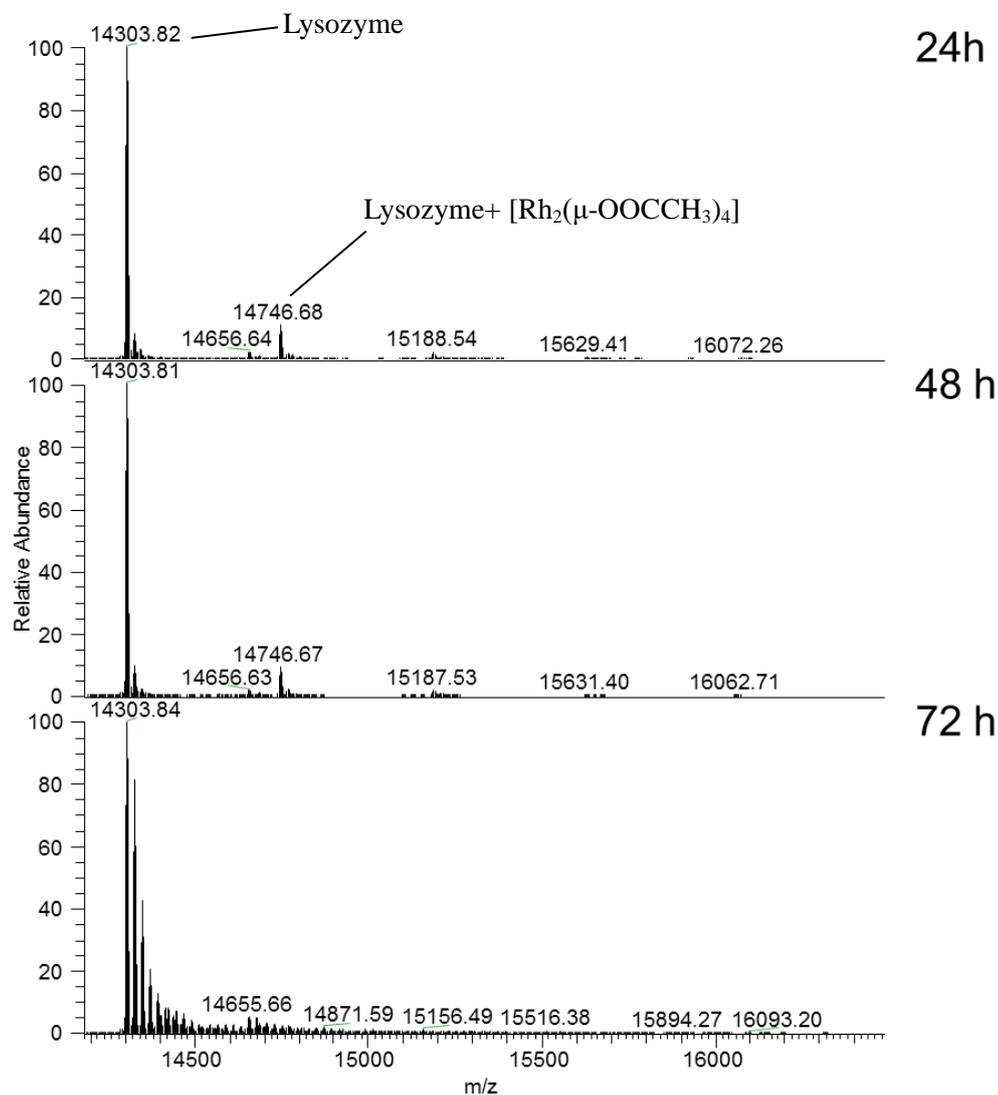


**Fig. 3.5** *Rappresentazione della struttura del lisozima.*

I risultati ottenuti per i composti **14** e **15** sono riportati rispettivamente in figura 3.6 e 3.7.



**Fig. 3.6.** Spettri ESI-MS deconvolti di lisozima  $10^{-4}$  M trattato con il composto **14** (rapporto metallo-proteina 3:1) in tampone ammonio acetato 20 mM (pH=6.8) registrati dopo 24, 48 e 72 h di incubazione a 37 °C.



**Fig. 3.7.** Spettri ESI-MS deconvolti di lisozima  $10^{-4}$  M trattato con **15** (rapporto metallo-proteina 3:1) in tampone ammonio acetato 20 mM (pH=6.8) registrati dopo 24, 48 e 72 h di incubazione a 37 °C.

Dall'analisi degli spettri ESI-MS della soluzione del composto **14** e lisozima registrati dopo 24, 48 e 72 h ore di incubazione a 37° C, si può notare un picco con

$m/z=14656.6$  Da.

Questo rapporto massa-carica può essere correlato ad un addotto formato dalla proteina modello con un frammento del tipo  $[\text{Ru}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ . Si osserva inoltre che l'intensità del picco non varia durante le 72 h.

Si può quindi ipotizzare che il composto  $[\text{Ru}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^+$  presente in soluzione formi addotti stabili con la proteina modello in cui si conserva il centro metallico Ru-Ru e che la metallazione della proteina avvenga tramite la perdita di due leganti acetato da parte del complesso che vengono presumibilmente sostituiti da funzioni analoghe della proteina.

Nello spettro ESI-MS a 24 h e 48 h del composto **15** con lisozima (*fig.3.7*) si nota un picco a  $m/z=14746,68$  Da correlabile a un addotto tra  $[\text{Rh}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_4]$  e lisozima, anche se il picco risulta poco intenso.

L'addotto non sembra essere stabile; infatti nello spettro alle 48 h si può notare come il picco a  $m/z=14746,68$  Da risulti meno intenso e nello spettro a 72 h non è più osservabile. In quest'ultimo si nota però la presenza di numerosi picchi imputabili alla formazione di addotti indesiderati tra la proteina e lo ione sodio, contenuto nel tampone salino utilizzato per l'analisi; a causa della presenza di questi nuovi addotti non è possibile affermare con certezza che la mancanza del segnale sia dovuta all'effettiva assenza dell'addotto metallo-proteina in quanto potrebbe risultare talmente poco intenso rispetto ai nuovi picchi da essere non rilevabile.

Confrontando questi risultati con quelli ottenuti monitorando la variazione di assorbanza del composto **15** con la proteina lisozima in 24 h, già mostrata in *fig. 3.3*, si deduce che la quantità di addotti formati non è significativa poiché non si osservano cambiamenti spettrali.

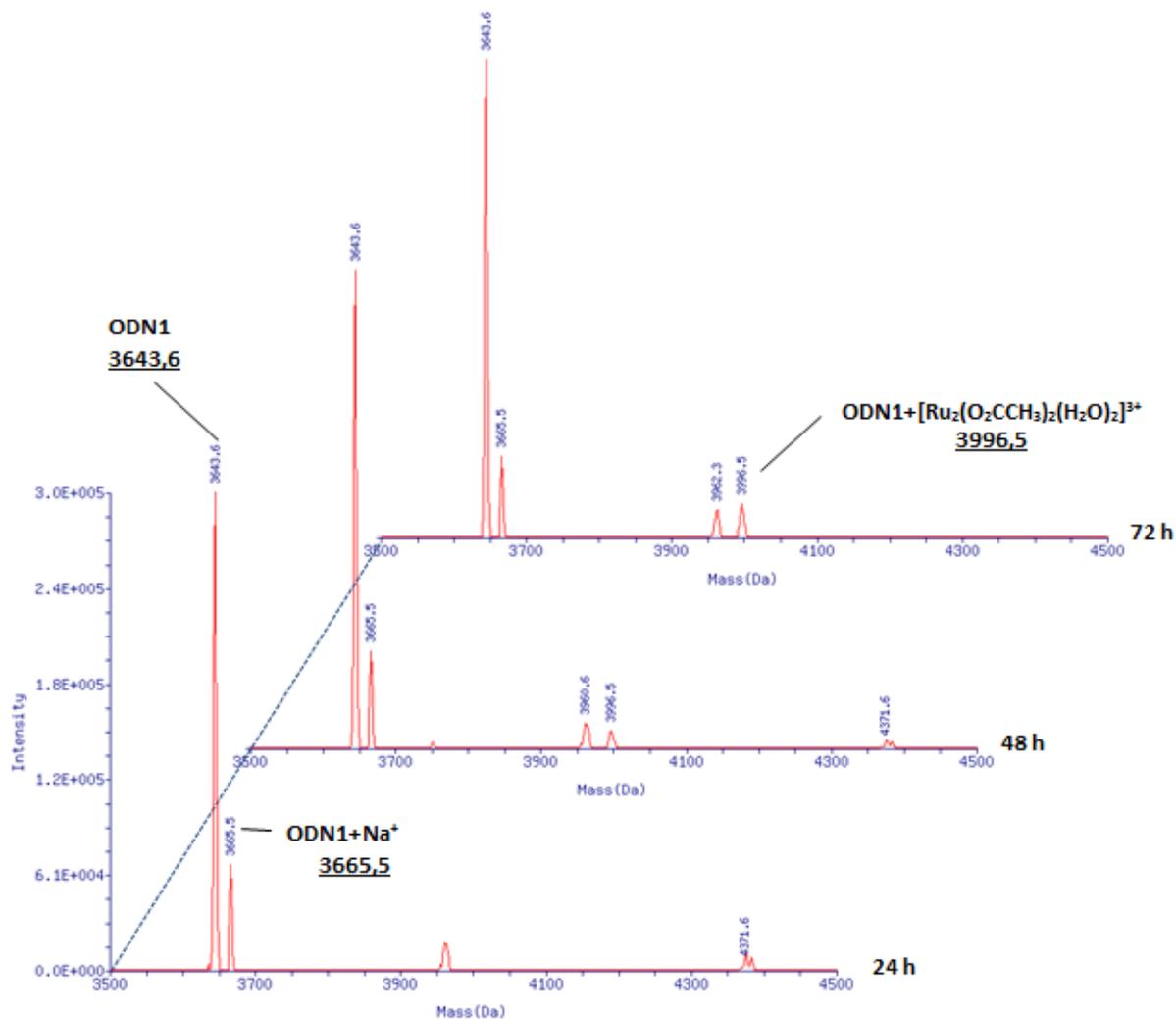
### **3.2.2 Interazione con oligonucleotide modello**

La scelta di valutare l'interazione dei composti in esame con l'oligonucleotide modello è dettata dalla consapevolezza che il DNA risulta essere l'obiettivo principale per i farmaci a base di platino clinicamente affermati.<sup>5</sup>

L'oligonucleotide modello scelto è di tipo ODN1 (3644 Da), costituito da 12 nucleotidi di sequenza 5'--ATTAGGCCTAAT--3' ed è stato impiegato per valutare l'efficacia dei complessi metallici nel formare addotti con un frammento di DNA impedendone la replicazione.

Come metodo di indagine viene utilizzata anche in questo caso la spettroscopia di massa ad alta risoluzione con ionizzazione soft di tipo elettrospray (ESI-MS) ma per questo tipo di analisi viene scelta la polarità negativa dello strumento.

Vengono di seguito riportati gli spettri di massa del complesso di rutenio registrati alle 24, 48 e 72 h di incubazione.



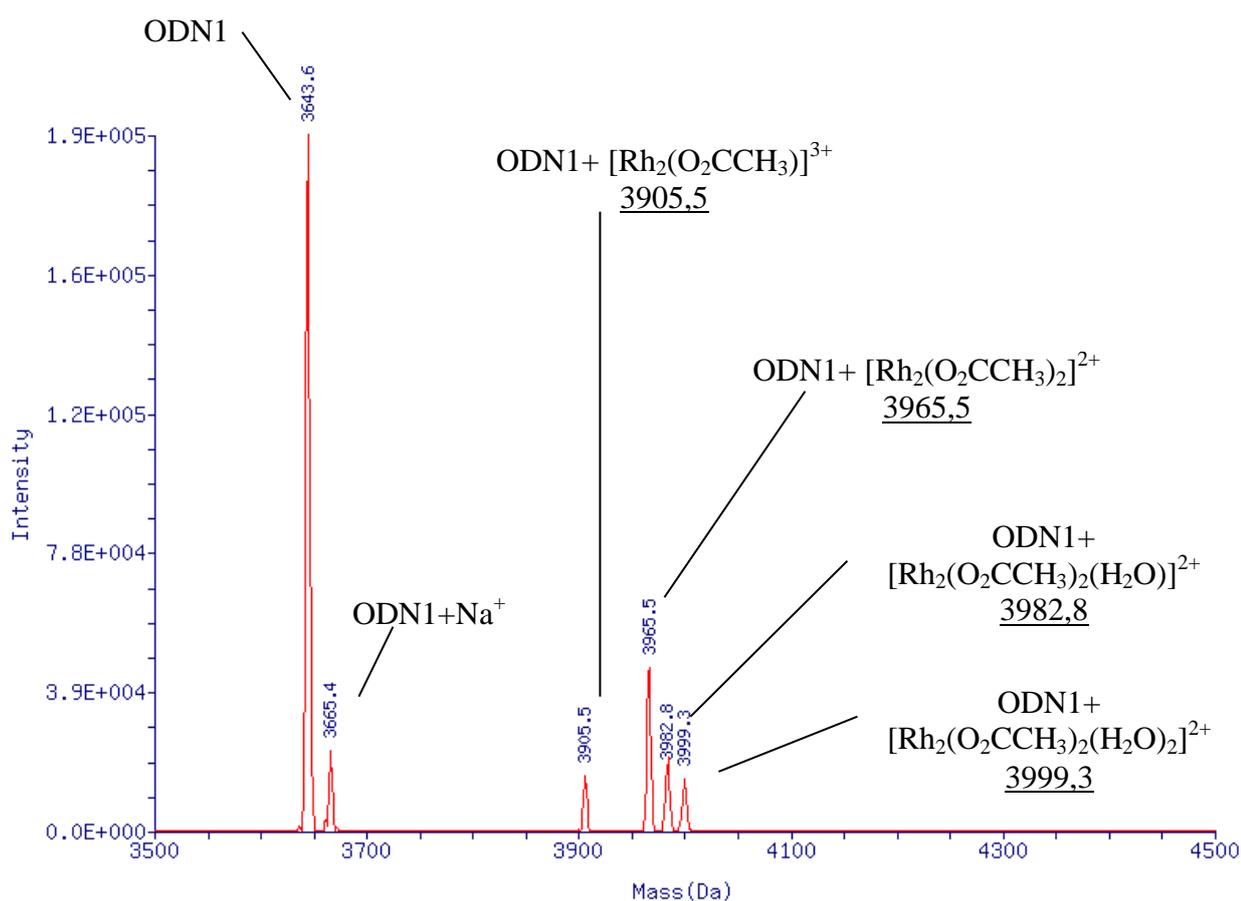
**Fig. 3.8.** Spettri ESI-MS deconvoluti di ODN1 in acqua milli-Q  $10^{-4}$  M incubato con composto **14** (rapporto metallo-oligonucleotide 2:1) per 24, 48 e 72 h a 37 °C.

Nella comparazione degli spettri di massa ottenuti dalla soluzione del complesso **14** con l'oligonucleotide possiamo osservare un picco con un valore  $m/z$  pari a 3996,5 Da che appare nello spettro a 48 h e che aumenta in quello a 72 h correlabile ad un addotto tra l'oligonucleotide e  $[\text{Ru}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ .

Dalla scarsa intensità dei picchi si deduce che il complesso reagisce debolmente con

l'oligonucleotide modello non prima di 24 h.

Lo stesso oligonucleotide modello ODN1 viene scelto per testare la reattività con il complesso **15** registrando gli spettri dopo 24, 48 e 72 h di incubazione. Avendo ottenuto risultati analoghi nei 3 spettri, viene riportato solo quello registrato alle 48 h.



**Fig. 3.9.** Spettro ESI-MS deconvoluto di ODN1 in acqua milli-Q 10<sup>-4</sup> M incubato a con composto **16** (rapporto metallo-oligonucleotide 2:1) per 48 h a 37 °C.

Osserviamo la formazione di diversi addotti tra il composto **15** e l'oligonucleotide ODN1:

- $m/z=3999,3 \rightarrow \text{ODN1} + [\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$
- $m/z=3982,8 \rightarrow \text{ODN1} + [\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$
- $m/z=3965,5 \rightarrow \text{ODN1} + [\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2]^{2+}$
- $m/z=3905,5 \rightarrow \text{ODN1} + [\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)]^{3+}$

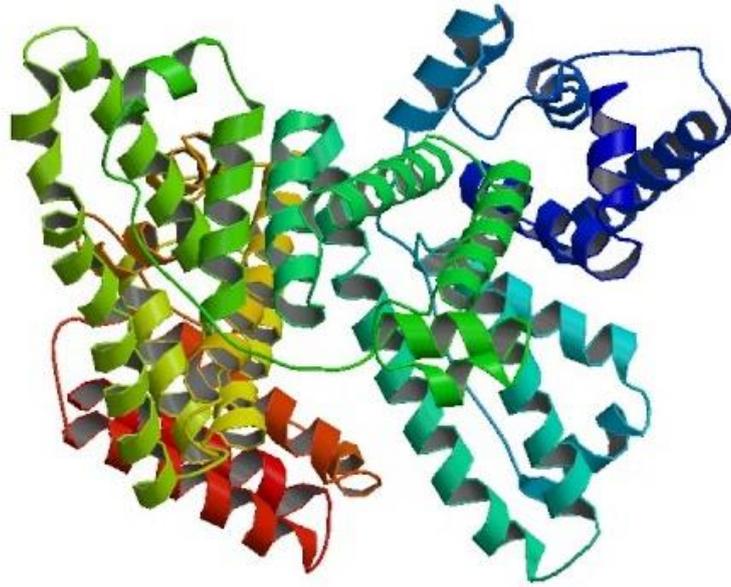
Il composto **15** reagisce dunque maggiormente con l'oligonucleotide rispetto al composto analogo di rutenio (**14**) e forma diversi tipi di addotti.

Negli spettri di entrambi i composti possiamo notare la presenza di un picco a  $m/z=[\text{ODN1}+\text{Na}]^+$  imputabile alla formazione di un addotto indesiderato tra la proteina e lo ione sodio, contenuto nel tampone salino utilizzato per l'analisi.

### 3.2.3 Interazione con albumina

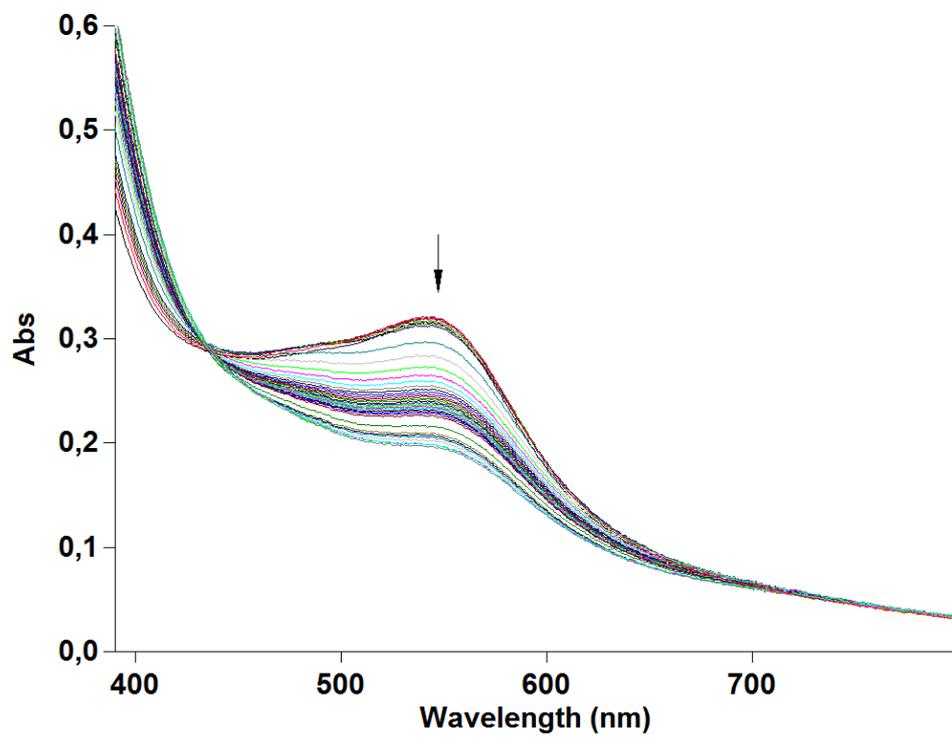
La formazione di addotti tra i complessi **14** e **15** e la proteina albumina non può essere indagata tramite spettroscopia di massa poiché questa proteina risulta avere un peso molecolare troppo elevato (MW: 66748 Da).

Nonostante questo risulta essere un importante target farmacologico poiché l'albumina viene considerata, per quantità e funzioni, una delle più importanti del nostro organismo. Viene sintetizzata dal fegato ed è contenuta soprattutto nei liquidi interstiziali e nel plasma, dove rappresenta da sola circa la metà delle proteine circolanti. Va inoltre considerato che la maggior parte dei composti citotossici contenenti metalli vengono somministrati per via endovenosa perciò una particolare attenzione va concessa alle interazioni metallo-farmaco con componenti macromolecolari del sangue con cui si possono legare e tramite i quali si possono accumulare nel tessuto tumorale.

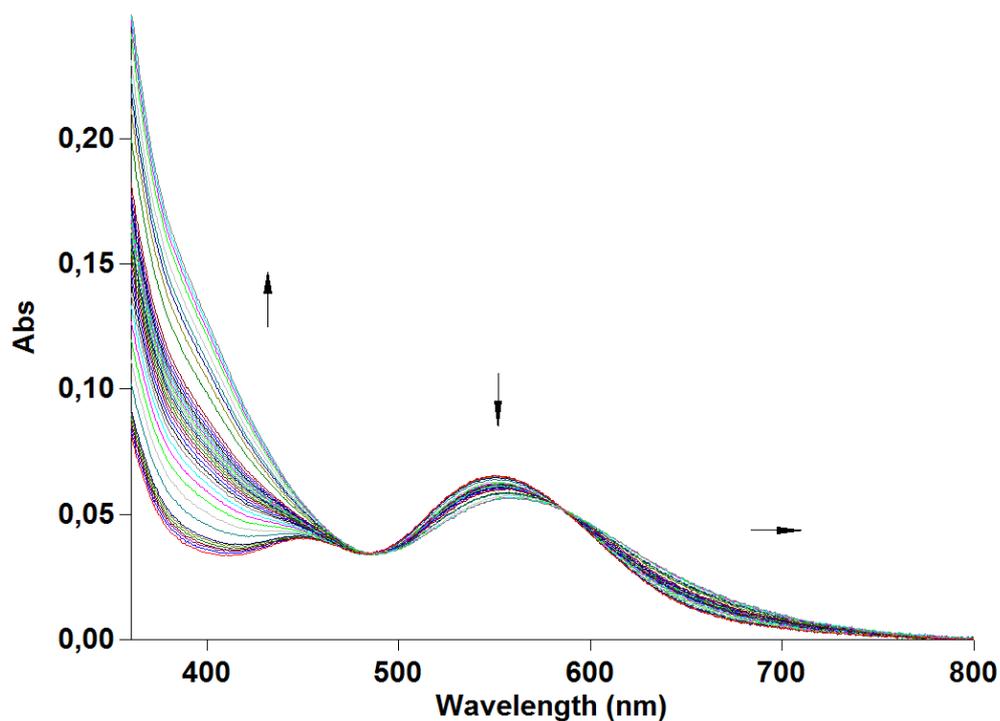


**Fig. 3.10** *Rappresentazione della struttura dell'albumina.*

Viene dunque scelto di studiarne la reattività con i due complessi tramite spettroscopia UV-Vis.



**Fig.3.11** *Spettro di assorbimento UV-Vis di albumina  $10^{-4} M$  trattata con composto **14** (rapporto metallo-proteina 3:1) in tampone ammonio acetato 20 mM, pH 6,8: profili di Abs registrati in 72h.*



**Fig. 3.12** Spettro di assorbimento UV-Vis di albumina  $10^{-4}$  M trattata con composto **15** (rapporto metallo-proteina 3:1) in tampone ammonio acetato 20 mM, pH 6,8: profili di Abs registrati in 72h.

Lo spettro di assorbimento UV-Vis del composto **14** con albumina viene riportato in fig. 3.11.

Possiamo notare come la banda del complesso a 424,9 nm osservata in fig. 3.1 assegnata alla transizione  $\pi(\text{Ru}-\text{O}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$  non sia più presente nel range spettrale osservato. Una nuova banda è inoltre apparsa nello spettro con una  $\lambda_{\text{max}}$  di 543,4 nm e la presenza di un punto isobestico tra i 400 e i 480 nm ci suggerisce la presenza di due specie in soluzione.

Basandoci su questi dati si può quindi ipotizzare che il complesso e la proteina

albumina hanno interagito.

Anche il composto **15** sembra formare addotti con la proteina albumina (fig.3.12).

Il cambiamento di colore della soluzione da verde-blu a rosa osservato durante la preparazione del campione al momento dell'aggiunta della proteina nella soluzione di  $[\text{Rh}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_4]$  causa lo spostamento a energie più basse della banda con  $\lambda_{\text{max}}$  588 nm e la presenza di un punto isobestico implica la presenza di più specie in soluzione.

## 4. Conclusioni

Recentemente i complessi dimetallici di rutenio e rodio hanno guadagnato una crescente attenzione come potenziali agenti antitumorali ma le modalità con cui tali complessi esplicano il loro effetto citotossico rimangono in larga parte sconosciute. Lo studio delle interazioni con i target biologici rappresenta un aspetto essenziale per la comprensione del meccanismo di azione dei metallo-farmaci.

In questo lavoro di tesi ci siamo quindi occupati di caratterizzare e analizzare le interazioni dei composti **14** e **15**, precursori di questa nuova famiglia di potenziali farmaci antitumorali, con le proteine lisozima e albumina e con l'oligonucleotide ODN1, permettendo di ottenere maggiori dettagli sul processo di metallazione di questi bersagli biologici.

Preliminarmente abbiamo studiato il comportamento del composto **15** da solo dopo solubilizzazione nel tampone di riferimento e in presenza di una quantità equimolare di lisozima al fine di osservare il comportamento del composto a pH fisiologico. Dalle analisi è stato osservato che il composto esaminato mostra un'apprezzabile stabilità nell'arco di 24 h, anche in presenza della proteina lisozima.

Successivamente gli studi di spettrometria ESI-MS condotti sui campioni hanno consentito di valutare la reattività e caratterizzare gli addotti tra il metallofarmaco e i target biologici. Il composto **15** ha mostrato di non avere particolare affinità con la proteina lisozima mentre forma diversi tipi di addotti con l'oligonucleotide modello. Per il complesso **14** invece è stata osservata una scarsa reattività con l'oligonucleotide mentre si è ottenuta la formazione di addotti stabili con il lisozima attraverso la sostituzione di due leganti acetato.

Tramite studi di spettroscopia UV-Vis infine abbiamo osservato che entrambi i composti reagiscono con la proteina albumina.

In conclusione, lo studio comparato dei due composti ha permesso di evidenziare una

differente reattività verso i tre target biologici suggerendo un diverso meccanismo di azione e fornendo interessanti spunti per ulteriori studi.

## 5. Procedure sperimentali

### 5.1 Materiali

I reagenti utilizzati nella sintesi del complesso **14**,  $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (M.W. 207,43), acido acetico (M.W. 60,05) e anidride acetica (M.W. 102,09) sono stati acquistati dal catalogo Sigma-Aldrich Co.LCC (Milano, Italia) e utilizzati senza ulteriore purificazione.

Il complesso **15** (M.W. 441,98), il buffer ammonio acetato 20 mM pH=6.8, utilizzato per le analisi spettrofotometrica e spettrometrica, la proteina lisozima HEWL (M.W. 14303 Da), l'albumina (M.W. 66748 Da) e l'oligonucleotide modello ODN1 utilizzati per valutare l'efficacia nel formare addotti con i complessi analizzati sono stati acquistati dal medesimo catalogo Sigma-Aldrich.

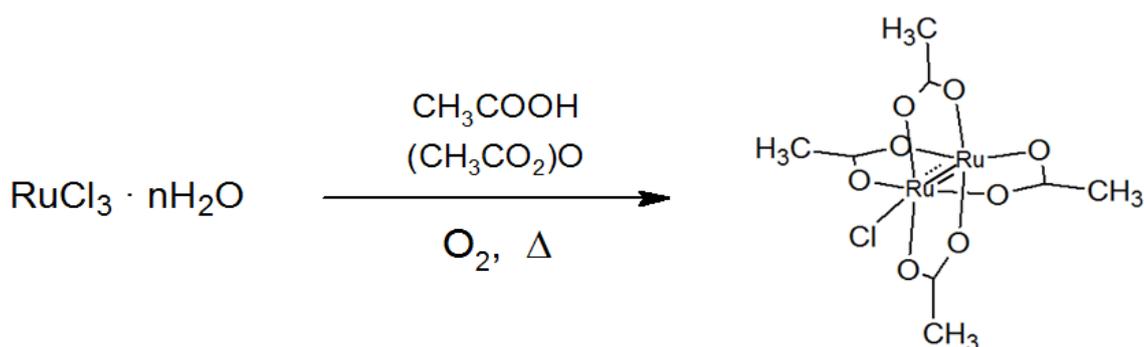
Le misure UV-Vis sono state effettuate con uno spettrofotometro a singolo raggio Cary Varian 50 Bio dotato di lampada allo xeno. I campioni, inseriti all'interno di celle di quarzo, sono stati sottoposti ad una scansione di lunghezze d'onda tra gli 800 ed i 200 nm.

Le acquisizioni degli spettri di massa dei campioni sono state effettuate con uno spettrometro ad alta risoluzione LTQ orbitrap® (ThermoScientific, San José, CA, USA) all'interno del Centro Interdipartimentale di Spettrometria di Massa (CISM) dell'Università di Firenze.

Per l'acquisizione è stato utilizzato il software Xcalibur 2.0 (Thermo) e gli spettri mediati deconvoluti e monoisotopici sono stati ottenuti usando il tool Xtract integrato; per l'acquisizione è stata utilizzata una risoluzione nominale, al rapporto  $m/z$  400, di 100000.

## 5.2 Sintesi di cloruro di dirutenio(II,III)tetracetato (**14**)

Il complesso **14** è stato sintetizzato a partire da  $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  in accordo con la procedura riportata in letteratura.<sup>41</sup>



**fig. 5.1.** *Schema di reazione*

1g di  $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  ( $4.8 \times 10^{-3}$  mol, M.W. 207,43 g/mol) viene portato a riflusso con una miscela di acido acetico (35 ml) e anidride acetica (7 ml) facendo fluire aria nell'ambiente di reazione.

Passati 30 min vengono aggiunti 5ml di acido acetico e 1 ml di anidride acetica poiché parte del solvente evapora durante la reazione.

Dopo circa 3 h si osserva un cambiamento di colore da marrone a verde scuro e il prodotto ottenuto viene raffreddato e filtrato per eliminare un residuo di colore nero.

La reazione continua a riflusso per tutta la notte sotto costante agitazione fino ad osservare una soluzione verde più intensa che viene lasciata raffreddare lentamente.

Infine il prodotto formatosi viene raccolto tramite filtraggio sotto vuoto e poi lavato con acido acetico, metanolo e dietil etere.

Il solido marrone ottenuto viene posto in essiccatore sotto vuoto per una notte e poi pesato. Si ottengono 0.23 g del composto **15** con una resa del 59%.

Il complesso viene caratterizzato tramite analisi elementare CHN e spettroscopia UV-Visibile.

Analisi elementare per  $C_8ClH_{12}O_8Ru_2$ :

Teorica: C: 20.11%, H: 3,38%

Sperimentale: C:20.50%, H: 2.57%

### 5.3 Preparazione dei campioni per analisi UV-Vis

La caratterizzazione del composto **15**, il comportamento del complesso **16** in soluzione e l'interazione dei due composti con la proteina albumina sono stati valutati attraverso l'analisi spettrofotometrica UV-Vis.

Inizialmente sono state preparate due soluzioni stock per i due complessi analizzati.

Nello specifico:

1. 1 ml di soluzione  $3 \cdot 10^{-3}$  M di complesso **14** realizzata pesando 1,44 mg di complesso e sciogliendoli in acqua milli-Q.
2. 1 ml di soluzione  $3 \cdot 10^{-3}$  M di complesso **15** realizzata pesando 1,32 mg di complesso e sciogliendoli in acqua milli-Q.

#### 5.3.1 Preparazione del campione per la caratterizzazione Uv-Vis del complesso $[Ru_2(\mu-OOCCH_3)_4Cl]$ (**14**)

Per sottoporre il complesso di Ru all'analisi spettrofotometrica UV-Vis si prepara 1

ml di soluzione  $10^{-3}$  M in tampone ammonio acetato 20mM (pH 6.8) prelevando 333  $\mu$ l di soluzione stock del complesso di rutenio e portando a volume con il tampone. Gli spettri registrati sono riportati nel paragrafo 3.1.

### **5.3.2 Preparazione del campione per lo studio del comportamento di $[\text{Rh}_2(\mu\text{-OOCCH}_3)_4]$ (15) in soluzione**

Per valutare il comportamento del complesso in soluzione vengono preparate due soluzioni:

1. 1 ml di soluzione  $10^{-3}$ M di complesso in tampone ammonio acetato, ottenuta prelevando 333  $\mu$ l di soluzione stock del complesso di rodio e portando a volume con il tampone.
2. 1 ml di soluzione  $10^{-3}$ M di complesso in presenza di lisozima (rapporto stechiometrico 1:1) in tampone ammonio acetato, ottenuta prelevando 333  $\mu$ l di soluzione stock del complesso di rodio, aggiungendo 100  $\mu$ l di una soluzione  $10^{-2}$ M di lisozima in acqua milli-Q e portando infine a volume con il tampone.

Viene misurato uno spettro del bianco che per la soluzione 1 risulta essere il solo tampone ammonio acetato e per la soluzione 2 una soluzione  $10^{-3}$ M di lisozima in tampone ammonio acetato. In seguito sono stati registrati gli spettri delle due soluzioni per 24 h.

I risultati sono riportati del paragrafo 3.2.2

### **5.3.3 Preparazione dei campioni per lo studio dell'interazione dei complessi con albumina**

Partendo da una soluzione stock di albumina  $5 \cdot 10^{-3}$  M in acqua milli-Q sono state preparate soluzioni con i complessi **14** e **15** in tampone ammonio acetato 20 mM (PH=6.8):

1. 1 ml di soluzione  $10^{-4}$  M di albumina in presenza del complesso **14** (rapporto stechiometrico 1:3). La soluzione è stata preparata prelevando 20  $\mu$ l di soluzione stock di HSA, 100  $\mu$ l di soluzione stock del complesso e 880  $\mu$ l di tampone ammonio acetato.
2. 1 ml di soluzione  $10^{-4}$  M di albumina in presenza del complesso **15** (rapporto stechiometrico 1:3), preparata prelevando 20  $\mu$ l di soluzione stock di HSA, 100  $\mu$ l di soluzione stock del complesso e 880  $\mu$ l di tampone ammonio acetato.

Per aumentare la possibilità di interazione del complesso, questo è stato impiegato in eccesso.

Inizialmente è stato registrato uno spettro del bianco per entrambe le soluzioni, cioè uno spettro della proteina con il tampone ammonio acetato.

In seguito sono stati registrati gli spettri delle due soluzioni per 72 h.

I risultati sono riportati del paragrafo 3.2.3

### **5.4 Preparazione dei campioni per spettrometria di massa**

Attraverso la spettrometria di massa ad alta risoluzione abbiamo indagato la reattività dei complessi **14** e **15** rispetto al lisozima e all'oligonucleotide modello.

Partendo da soluzioni stock di lisozima  $10^{-3}$  M in acqua milli-Q e di oligonucleotide

$10^{-3}$  M in acqua milli-Q sono state preparate soluzioni con i complessi **14** e **15** in tampone ammonio acetato 20 mM (PH=6.8).

Vengono preparate le seguenti soluzioni:

1. 500  $\mu$ l di soluzione  $10^{-4}$  M di lisozima con il complesso **14** (rapporto stechiometrico 1:3) preparata prelevando 50  $\mu$ l di soluzione stock di lisozima, 50  $\mu$ l di soluzione stock di complesso e 400  $\mu$ l di tampone.
2. 500  $\mu$ l di soluzione  $10^{-4}$  M di lisozima con il complesso **15** (rapporto stechiometrico 1:3) preparata prelevando 50  $\mu$ l di soluzione stock di ODN1, 33,4  $\mu$ l di soluzione stock di complesso e 400  $\mu$ l di tampone.
3. 500  $\mu$ l di soluzione  $10^{-4}$  M di ODN1 con il complesso **14** (rapporto stechiometrico 1:2) ottenuta prelevando 50  $\mu$ l di soluzione stock di ODN1, 33,4  $\mu$ l di soluzione stock di complesso e portando a volume con acqua milli-Q.
4. 500  $\mu$ l di soluzione  $10^{-4}$  M di ODN1 con il complesso **15** (rapporto stechiometrico 1:2) ottenuta prelevando 50  $\mu$ l di soluzione stock di ODN1, 33,4  $\mu$ l di soluzione stock di complesso e portando a volume con acqua milli-Q.

Per aumentare la possibilità di interazione del complesso, questo è stato impiegato in eccesso.

Le soluzioni finali sono state incubate a 37° C fino a 72 h prelevando 100  $\mu$ l per l'analisi a 24, 48 e 72 h.

Spettri e relativi risultati riportati nella sezione 3.2.

## 5.5 Spettrometro di massa

Come fonte di ionizzazione viene utilizzato un sistema ESI (electrospray ionization); questo tipo di ionizzazione estremamente soft si limita a caricare le specie analizzate e risulta quindi una delle tecniche di ionizzazione più adatte per le analisi di molecole polari con peso molecolare dell'ordine dei KDa.

Le tecniche ESI-MS prevedono la nebulizzazione del campione attraverso un capillare riscaldato, nel caso specifico ad una temperatura di 220 °C, all'interno di una camera sottoposta ad una tensione, nel nostro caso nell'ordine dei 3 kV. Questo porta alla formazione di una popolazione di ioni carichi filtrata poi dallo *skimmer*. Per registrare gli spettri le soluzioni dei campioni sono state diluite fino ad una concentrazione di 5 µM ed introdotti nello strumento tramite introduzione diretta con un flusso di 5 µL/min.