



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Scuola di  
Scienze Matematiche  
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica  
Curriculum Scienze Chimiche

**Nuovi alogeno-derivati dell'oxaliplatino per il trattamento del cancro al colon-retto: sintesi e comparazione delle proprietà chimiche e biologiche.**

**Oxaliplatin analogues bearing different halide ligands for colorectal cancer treatment: synthesis and comparison of chemical and biological properties.**

**Relatore**

Luigi Messori

**Correlatori**

Alessandro Pratesi; Tiziano Marzo

**Candidato**

Elisabetta Bucaletti

# Indice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introduzione</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>1.1. Composti inorganici a base di platino come agenti antitumorali</b> .....                     | <b>3</b>  |
| <b>1.2. Antitumorali di prima generazione: il cisplatino</b> .....                                   | <b>4</b>  |
| 1.2.1. Aspetti biologici e farmacologici del cisplatino .....  | 5         |
| <b>1.3. Antitumorali di seconda e terza generazione</b> .....  | <b>8</b>  |
| 1.3.1. Il carboplatino .....   | 8         |
| 1.3.2. L'oxaliplatino .....  | 9         |
| <b>1.4. Test farmacologici</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>2. Scopo della tesi</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>3. Risultati</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>3.1. Caratterizzazione e comportamento in soluzione dei complessi PtX<sub>2</sub>(DACH)</b> ..... | <b>17</b> |
| 3.1.1. Spettri di assorbimento UV-VIS: stabilità dei complessi in tampone fosfato.....               | 17        |
| 3.1.2. Calcolo delle costanti cinetiche per le reazioni di idrolisi dei complessi.....               | 21        |
| 3.1.3. Calcolo del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua dei complessi.....                    | 24        |
| <b>3.2. Interazione con target biologici modello</b> .....   | <b>26</b> |
| 3.2.1. Interazione con lisozima .....  | 26        |
| 3.2.2. Interazione con ribonucleasi A .....  | 28        |
| 3.2.3. Interazione con oligonucleotide modello .....   | 30        |
| <b>3.3. Studi di citotossicità su linee cellulari di CRC</b> .....                                   | <b>32</b> |
| <b>4. Conclusioni</b> .....  | <b>34</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5. Procedure sperimentali.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>5.1. Materiali .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>5.2. Sintesi degli alogeno-derivati dell'oxaliplatino.....</b>  | <b>37</b> |
| 5.2.1 Sintesi di PtCl <sub>2</sub> (DACH) .....  | 38        |
| 5.2.2 Sintesi di PtBr <sub>2</sub> (DACH).....   | 40        |
| 5.2.3 Sintesi di Ptl <sub>2</sub> (DACH) .....   | 42        |
| <b>5.3. Preparazione dei complessi PtCl<sub>2</sub>(DACH), PtBr<sub>2</sub>(DACH) e<br/>        Ptl<sub>2</sub>(DACH) per analisi UV-Vis .....</b> | <b>43</b> |
| <b>5.4. Preparazione dei campioni per determinazione logP .....</b>  | <b>44</b> |
| <b>5.5. Preparazione dei campioni per spettrometria di massa ...</b>   | <b>45</b> |
| <b>5.6. Preparazione dei campioni per misure di IC<sub>50</sub>.....</b>   | <b>49</b> |

# 1. Introduzione

## 1.1. Composti inorganici a base di platino come agenti antitumorali

La chimica bioinorganica si dedica allo studio del ruolo dei composti inorganici nei processi biologici, rivestendo questi un ruolo fondamentale per la vita.

Una branca di questa disciplina si occupa dello studio e della sintesi di composti metallici come farmaci, essendo gli ioni metallici necessari per l'espletazione delle funzioni di proteine ed enzimi.

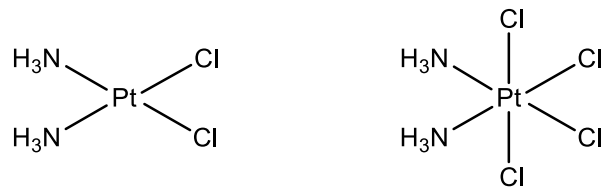
Alcuni documenti testimoniano l'utilizzo di composti a base di metalli in ambito medico già in epoca romana; oggi il campo di utilizzo si è espanso notevolmente, è possibile menzionare tra gli altri l'impiego dell'argento come antimicrobico, quello dell'oro per il trattamento dell'artrite reumatoide e quello del platino come agente antineoplastico.<sup>1</sup>

Negli anni '60 Rosenberg scoprì che i complessi di Pt(II) e Pt(IV), nello specifico il *cis*-diamminodicloroplatino(II) (CDDP) ed il *cis*-diamminotetracloroplatino(IV), inibivano la scissione cellulare, questo lo portò a pensare insieme con i suoi collaboratori che potevano essere utilizzati nel trattamento del cancro. In particolare videro che il cisplatino era estremamente efficace in alcuni tipi di tumore solido, come i tumori testicolari ed ovarici, della testa, del collo e della vescica.<sup>2</sup>

---

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

<sup>2</sup> Keppler B.K., *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, Weinheim, New York, **1993**, 391.



**Fig. 1.1.** Formula di struttura dei complessi di platino scoperti da Rosenberg, il *cis-diamminodichloroplatino(II)* ed il *cis-diamminotetrachloroplatino(IV)*.

Da quel momento le ricerche su questo tipo di composti hanno subito un incremento ed hanno portato alla sintesi di numerosi complessi, solo pochi tra questi, però, soddisfano i requisiti di chemio-tossicità, selettività e potenza richiesti per essere utilizzati nei protocolli clinici come chemioterapici. Possiamo menzionare tra gli altri, il carboplatino e l'oxaliplatino, entrambi con meccanismo d'azione simile al cisplatino, con il vantaggio che il primo possiede una minore tossicità rispetto a questo ed analoga efficacia, l'altro invece risulta efficace nel trattamento di alcuni tumori resistenti al cisplatino, in particolare nei confronti di quello del colon-retto.<sup>3</sup>

## 1.2. Antitumorali di prima generazione: il cisplatino

Il primo complesso metallico impiegato nel trattamento del cancro è stato il cisplatino, un complesso di Pt(II) con relativa configurazione elettronica d<sup>8</sup>, avente coordinazione quadrato planare con due leganti Cl<sup>-</sup> e due leganti NH<sub>3</sub> in conformazione *cis*.

Fu scoperto per caso da Rosenberg, professore di biofisica e chimica presso la Michigan State University, ed i suoi collaboratori nel 1964, durante studi di incidenza dei campi elettrici (prodotti tramite elettrodi di platino) sul processo di scissione cellulare nei batteri.<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Desoize B., Madoulet C., Particoular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment, *Critical Reviews in Oncology Hematology* 42, **2002**, 317-325.

Dopo la scoperta studiarono gli effetti del composto di platino su modelli di cancro animale, in seguito ci furono i primi test clinici sugli esseri umani. Tuttavia l'approvazione clinica di questo farmaco fu rimandata di alcuni anni, negli Stati Uniti fu approvato solo nel 1978 (in seguito anche in Giappone ed in Europa), poiché associata all'azione antitumorale si osservarono importanti effetti collaterali, come ototossicità, neuropatologie, tossicità ematologica e soprattutto nefrotossicità.

A causa delle suddette controindicazioni che ne limitano la dose di utilizzo, fu necessario mettere a punto un protocollo clinico che alleviasse questi effetti collaterali, attraverso processi di pre e post-idratazione del paziente e diuresi indotta.

Ad oggi il cisplatino viene utilizzato sia da solo che in combinazione con altri farmaci, è particolarmente efficace nel trattamento dei tumori ai testicoli ed alle ovaie, inoltre viene impiegato nel trattamento del carcinoma orofaringeo, dei bronchi e dei polmoni, della vescica e della cervice uterina, dell'osteosarcoma e del neuroblastoma.<sup>4</sup>

La ricerca di metodi migliori così come di farmaci più selettivi ed efficaci è, ancora oggi, un campo di ricerca attivo che cerca di sviluppare nuovi agenti protettori che, somministrati con il CDDP, ne riducano la tossicità.

### **1.2.1. Aspetti biologici e farmacologici del cisplatino**

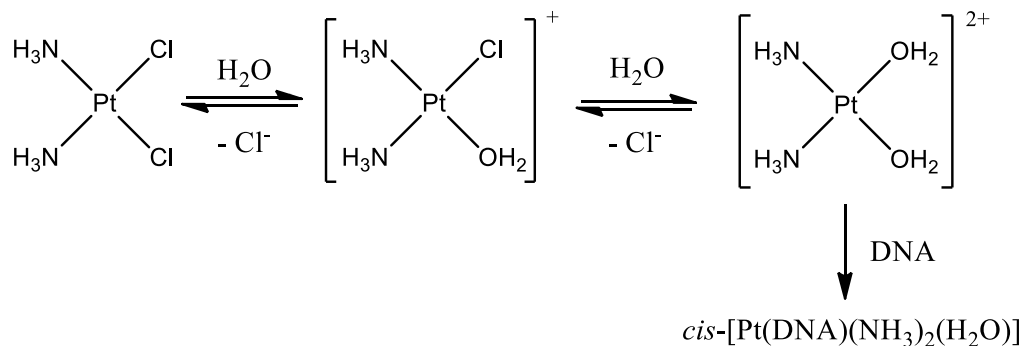
La peculiarità di questo complesso risiede nella tendenza mostrata dai leganti Cl<sup>-</sup> ad essere sostituiti da molecole di acqua: all'interno del sistema circolatorio questa sostituzione viene limitata dall'elevata concentrazione di ioni cloruro, garantendo così l'integrità del complesso fino all'arrivo all'interno della cellula; dove grazie ad una bassa concentrazione intracellulare di ioni Cl<sup>-</sup>, la reazione di "attivazione" della molecola è permessa; in questo modo il

---

<sup>4</sup> Wong E., Giandomenico C. M., Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2451-2466.

farmaco può interagire con il DNA ed esplicare il proprio effetto farmacologico.

L'azione del cisplatino si manifesta una volta penetrato all'interno della membrana cellulare, attraverso processi di diffusione passiva, ovvero favorita da un gradiente di concentrazione, e/o di diffusione attiva attraverso appositi trasportatori di membrana. La bassa concentrazione di ioni cloruro nel citoplasma permette la sostituzione dei leganti cloruro del cisplatino con molecole d'acqua, per formare gli aquoioni  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$  e  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ , in grado di reagire con il DNA (il target primario) ed altre componenti biologiche della cellula.<sup>5</sup>

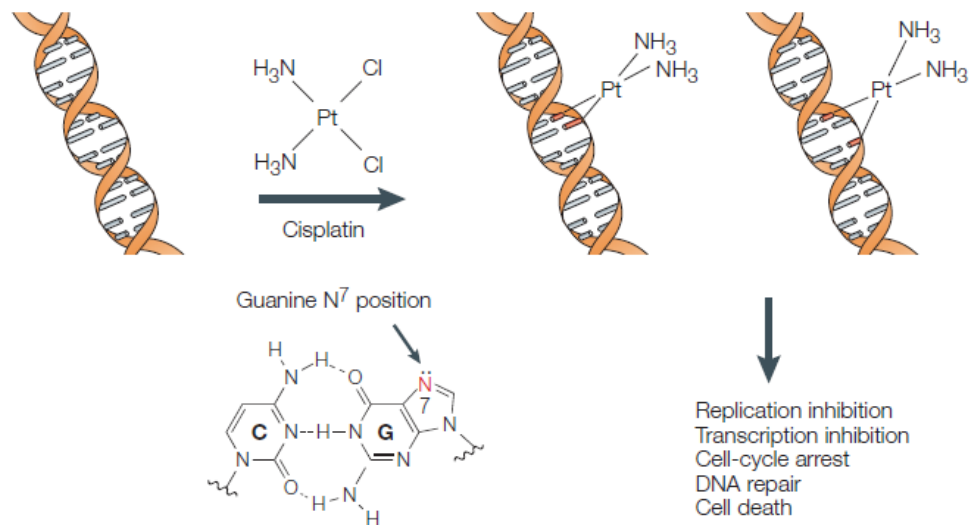


**Fig. 1.2.** *Formazione degli aquoioni del cisplatino e conseguente reazione con il target primario.*

Attraverso la caratterizzazione del meccanismo con cui il cisplatino induce il danneggiamento del DNA, è stato scoperto che la citotossicità del complesso è dovuta prevalentemente alla capacità dello ione metallico di coordinarsi agli atomi di azoto - in particolare al N<sup>7</sup> - presenti negli anelli imidazolici dei residui di guanina tramite vari addotti. L'addotto che si forma più frequentemente è quello che presenta una coordinazione del metallo con due residui di guanina consecutivi su di un filamento di DNA, definito "*intrastrand cross-link*"; altre forme di coordinazione prevedono l'interazione dello ione metallico con due residui di guanina su filamenti opposti, definito "*interstrand cross-link*", o la

<sup>5</sup> Kane S.A., Lippard S.J. Photoreactivity of platinum(II) in cisplatin-modified DNA affords specific cross-links to HMG domain proteins, *Biochemistry*, **1996**, 35, 2180-8.

formazione di un legame tra lo ione metallico  $Pt^{2+}$  ed un solo residuo di guanina.<sup>6-7</sup>



**Fig. 1.3.** *Formazione ed effetti dell'addotto cisplatino-DNA.*

I legami formati producono notevoli variazioni nella struttura del DNA, rendendone impossibile la trascrizione e la duplicazione, questo blocca la normale attività cellulare inducendo diversi meccanismi di risposta che, in seguito, portano alla morte cellulare. La morte cellulare programmata si può verificare tramite due meccanismi: apoptosi, in cui la cromatina si condensa e successivamente si frammenta dando origine ai corpi apoptotici circondati dalla membrana cellulare intatta, e necrosi, in cui la cellula si gonfia e si rompono le membrane presenti. È stato osservato che il verificarsi dell'una o dell'altra dipende dalla concentrazione di cisplatino.<sup>8</sup>

Il complesso non presenta una reattività selettiva ed esclusiva nei confronti del DNA, ma può legarsi anche ad altre macromolecole come le proteine. Ad esempio data la forte affinità tra platino e zolfo (entrambi atomi soft), è possibile osservare la platinazione di quelle proteine che presentano residui amminoacidici contenenti gruppi solfurei. Nello specifico la coordinazione del

<sup>6</sup> Whitehead P.J., Lippard S.J., *Metal ions in biological systems*, A. Sigel, H. Sigel (ed), Marcel Dekker Inc.: New York, **1996**, 32.

<sup>7</sup> Lee K.B., Wang D., Lippard S.J., Sharp P.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 4239.

<sup>8</sup> Wang D., Lippard S.J., *Cellular processing of platinum anticancer drugs*, *Nature Reviews*, **2005**, 4, 307-320.



platino con il glutatione e le metallotioneine è considerata uno dei fattori scatenanti la resistenza delle cellule tumorali al farmaco; essendo questi importanti agenti antiossidanti, il legame con il metallo inibisce la loro funzione.<sup>9</sup>

Oltre agli importanti effetti collaterali causati da questo tipo di farmaco, sono state sviluppate dalle cellule tumorali forme di resistenza che si esplicano attraverso una minore tendenza ad assimilare il complesso ed attraverso la capacità di riconoscimento ed espulsione o inattivazione del farmaco stesso.

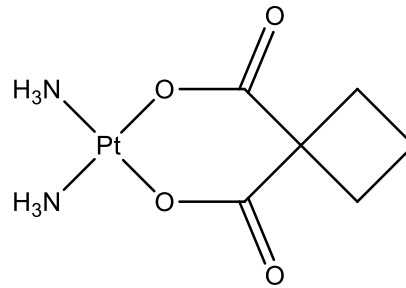
### **1.3. Antitumorali di seconda e terza generazione**

#### **1.3.1. Il carboplatino**

Per incrementare l'efficacia del cisplatino e ridurre la tossicità, si sono susseguiti, negli anni successivi alla sua scoperta, numerosi studi e quindi sintesi di nuovi analoghi, che mantenevano la struttura base del complesso ma differivano per i gruppi funzionali presenti nella molecola. Tra le centinaia di complessi di platino, detti di seconda generazione, sintetizzati e valutati come potenziali agenti antitumorali, possiamo citarne uno che è stato clinicamente approvato in tutto il mondo, il carboplatino (si veda *fig. 1.4*). Questo è del tutto analogo al cisplatino, avendo sia la stessa configurazione che la stessa coordinazione, ma differisce dal primo per un diverso legante, ovvero i due gruppi uscenti cloruro sono sostituiti da un gruppo ciclobutandicarbossilato.

---

<sup>9</sup> Kelland L., The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, *Nature Reviews*, **2007**, 7, 573-584.



**Fig. 1.4.** *Struttura del carboplatino.*

La sostituzione del gruppo uscente non altera il meccanismo di azione del complesso, infatti questo reagisce a livello biologico allo stesso modo del cisplatino, formando i medesimi addotti con il DNA. Il diverso gruppo uscente implica una minore reattività, se confrontata con quella del precursore, ma anche una minore tossicità ematica, di conseguenza rende possibile la somministrazione di un più alto dosaggio.

Mentre risulta essere efficace nel trattamento del tumore alle ovaie, lo è meno nei confronti di quello ai testicoli, alla testa ed al collo; in definitiva emerge un analogo spettro di azione rispetto al cisplatino e stesse forme di resistenza.<sup>10</sup>

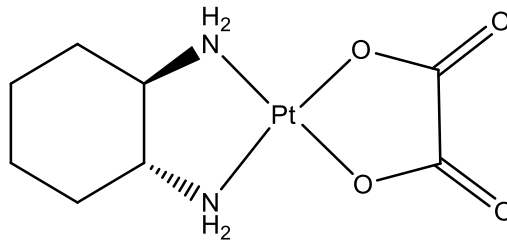
### 1.3.2. L'oxaliplatino

L'oxaliplatino, commercializzato con il nome di Eloxatin, (R-R')-1,2-diamminocicloesanoplatino(II) ossalato, è un analogo di terza generazione del cisplatino, il quale ha ricevuto l'approvazione per l'uso clinico nel 1999 in Europa e nel 2002 negli Stati Uniti.

In *figura 1.5* è mostrata la struttura dell'oxaliplatino con la relativa stereochimica; dove il legante diamminocicloesano, detto DACH, è il legante

<sup>10</sup> Hannon M.J., Metal-based anticancer drugs: from a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology, *Pure Appl. Chem.*, **2007**, 79, 12, 2243-2261.

che rimane inalterato durante il processo di attivazione del complesso, mentre il legante bidentato ossalato adempie la funzione di gruppo uscente.



**Fig. 1.5.** *Struttura dell'oxaliplatino.*

La caratteristica di questo complesso risiede nell'essere particolarmente efficace nel trattamento di tumori che hanno sviluppato resistenza nei confronti del cisplatino, come il tumore al colon retto (stimato come la quarta maggior causa di morte da cancro).<sup>11</sup> Questo differente spettro di azione rispetto al cisplatino ed al carboplatino, si pensa sia dovuto alle diverse caratteristiche steriche e chimiche dell'addotto che viene a formarsi con il DNA; inoltre presenta anche una maggiore tollerabilità rispetto al cisplatino.

L'oxaliplatino risulta anche particolarmente efficace, in combinazione con 5-fluoracile, nel trattamento del cancro ai testicoli ed alle ovaie avendo, come detto, una minore nefrotossicità ed ototossicità rispetto al cisplatino.<sup>12</sup>

Un'importante limitazione nell'uso di questo farmaco, però, risiede nel fatto che induce neuropatia periferica, i cui sintomi sono intorpidimento degli arti inferiori e superiori ed una diffusa sensazione di freddo.

Questo effetto negativo può essere dovuto ad una alterazione delle proprietà dei canali voltaggio-dipendenti, come quelli del sodio, responsabili dell'instaurazione di un potenziale d'azione che permette l'apertura dei canali stessi. Inoltre molti degli effetti neurologici indotti dal complesso possono essere considerevolmente attenuati tramite infusioni di  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , ciò suggerisce un coinvolgimento del legante labile, l'ossalato, rilasciato durante il

<sup>11</sup> Haggard F.A., Boushey R.P., Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clin. Colon Rectal Surg.* **2009**, *22*, 191-197.

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

processo di attivazione del farmaco, rinomato per essere un buon complessante degli ioni calcio.<sup>13</sup>

Per meglio comprendere il meccanismo inducente l'ipereccitabilità neuromuscolare causata dal trattamento con oxaliplatino, sono stati effettuati diversi studi. I quali hanno dimostrato che i pazienti aventi sintomi acuti, non presentano degenerazione assonale, questo suggerisce uno specifico effetto del farmaco sui neuroni sensoriali e/o motori o su cellule muscolari; evento inedito poiché nessun altro agente antineoplastico a base di platino comportava un simile disturbo. Inoltre la somiglianza di questi sintomi indotti dal trattamento chemioterapico con quelli causati da diversi farmaci o tossine che agiscono sui canali ionici muscolari e neuronali, ha rimarcato la possibilità di una specifica interazione tra l'oxaliplatino ed i canali ionici situati nella membrana cellulare.<sup>14</sup>

Per brevi esposizioni al farmaco la neuropatia è reversibile ed i suoi sintomi svaniscono dopo poco tempo dalla somministrazione; mentre per esposizioni croniche questa può diventare irreversibile, ciò può essere correlato all'accumulo del complesso nelle cellule del ganglio della radice dorsale del sistema spinale ed alla conseguente diminuzione del metabolismo cellulare.<sup>15</sup>

## 1.4. Test farmacologici

L'analisi degli effetti citotossici di composti metallici include un'ampia tipologia di metodi i quali possono essere raggruppati in vari stadi di sperimentazione che terminano, solo in pochissimi casi, nell'approvazione come farmaco.

---

<sup>13</sup> Grolleau F., Gamelin L., Boisdron-Celle M., Lapied B., Pelhate M., Gamelin E., A Possible Explanation for a Neurotoxic Effect of the Anticancer Agent Oxaliplatin on Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels, *J. Neurophysiol*, **2001**, 85, 2293-2297.

<sup>14</sup> Pasetto M.L., D'Andrea M.R., Rossi E., Monfardini S., Oxaliplatin-related neurotoxicity: How and why?, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 59, **2006**, 159-168.

<sup>15</sup> Dabrowiak J.c., "Metals in Medicine", **2009**, Department of Chemistry, Syracuse University, New York, USA, 122.

I test a cui viene sottoposto un potenziale farmaco possono essere identificati in:

- Test *in vitro*. Comprendono varie tipologie di approcci come l'esposizione al composto analizzato di proteine, DNA o molecole biologiche, generalmente estratte dal sistema di appartenenza e purificate. Sono analisi utilizzate per capire il meccanismo di azione di una molecola una volta accertata la tossicità verso una particolare linea di cellule tumorali.
- Test *in vivo*. Rappresentano un modo per verificare le proprietà antitumorali di un composto inserito, però, in un contesto biologico più complesso. Solitamente ciò richiede il controllo della proliferazione di particolari tipologie di cellule tumorali umane inizialmente impiantate sotto la cute di cavie animali sui quali vengono registrati gli effetti.
- *Trials clinici*. Sono un insieme di verifiche condotte per raccogliere dati sulla sicurezza e sull'efficacia di nuovi farmaci o di nuovi dispositivi medici; queste verifiche possono richiedere periodi anche molto lunghi ed ingenti spese di gestione, perciò vengono sottoposti a questo tipo di sperimentazione solamente un numero esiguo di complessi che hanno mostrato un'efficacia molto elevata.

## 2. Scopo della tesi

Il cancro rappresenta, ancora oggi, una delle principali cause di morte in tutto il mondo e, dal numero di nuove diagnosi, è stato stimato un significativo aumento del numero dei casi nei prossimi anni. È quindi diventato sempre più importante sviluppare e testare nuovi farmaci capaci di combattere le patologie neoplastiche.

L'approvazione per l'utilizzo in clinica del cisplatino, concessa dalla FDA nel 1979, ha aperto la strada a numerosi studi su farmaci a base metallica. Il fine della ricerca in questo ambito era ed è tuttora incentrato nel tentativo di sviluppare complessi, quindi farmaci, più efficaci rispetto al cisplatino, caratterizzati cioè da minori effetti collaterali e dalla capacità di superare la resistenza intrinseca e/o acquisita delle cellule tumorali rispetto a questo complesso. Infatti è stato dimostrato che alcuni tipi di cellule tumorali, come quelle del colon-retto, manifestano meccanismi di resistenza al trattamento con cisplatino; questa capacità delle cellule può esternarsi sia prima che il complesso abbia raggiunto il suo target (il DNA), sia una volta formatosi l'addotto DNA-metallo.<sup>16</sup>

In questo lavoro di tesi, svolto presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Firenze all'interno del gruppo di ricerca del Prof. Luigi Messori, sono stati sintetizzati e caratterizzati tre complessi a base di platino, gli alogeno-derivati dell'oxaliplatino: PtCl<sub>2</sub>(DACH), PtBr<sub>2</sub>(DACH) e PtI<sub>2</sub>(DACH). In cui il legante ossalato è stato sostituito con due leganti alogenuro, nello specifico con cloruro, bromuro e ioduro.

L'ipotesi alla base del lavoro qui riportato è che, modificando la struttura dell'oxaliplatino sia possibile ottenere una diversa reattività del composto.

Infatti il legante bidentato ossalato, rimosso durante il processo di attivazione del farmaco, ha un forte potere chelante nei confronti degli ioni Ca<sup>2+</sup> presenti nell'organismo; sostituendo questo con due leganti alogenuro identici ipotizziamo di ottenere un composto che presenti una diminuita comparsa di

---

<sup>16</sup> Desoize B., Madoulet C., Particoular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment, *Critical Reviews in Oncology Hematology* 42, **2002**, 317-325.

effetti di neuropatia periferica, la quale è dovuta proprio alla diminuzione della concentrazione di questi ioni nell'organismo.<sup>17</sup>

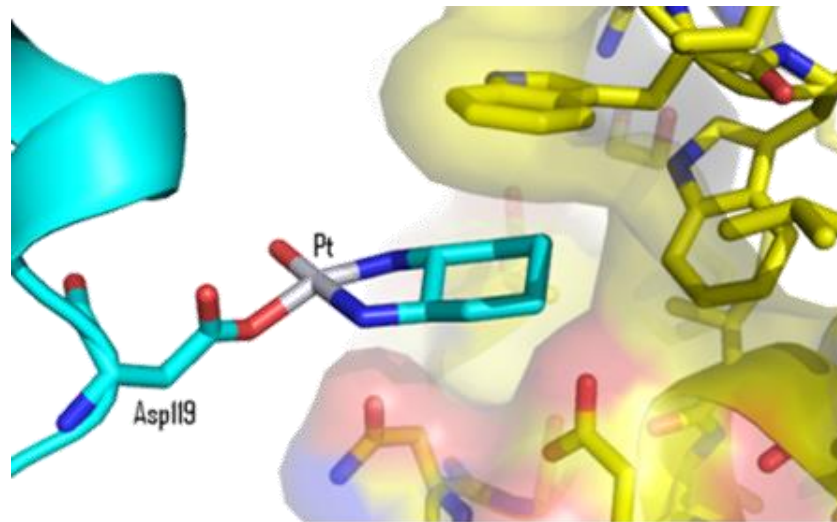
Inoltre da questo tipo di sostituzione potremmo riscontrare un incremento del carattere lipofilo del complesso, in particolare supponiamo che questo aumenti nel senso  $Cl < Br < I$ ; ciò suggerirebbe una migliore assimilazione del farmaco all'interno della cellula e quindi una migliore efficacia farmacologica.

Un altro aspetto importante che riguarda il cisplatino e l'oxaliplatino, è il fatto che entrambi non sono farmaci selettivi, cioè non rispondono esclusivamente a quello che è il loro target primario, cioè il DNA; ma possono interagire anche con le proteine presenti nelle cellule o nel flusso sanguigno, determinando significativi effetti collaterali. Ad esempio è stato descritto il processo secondo il quale l'oxaliplatino forma un complesso, tramite un processo a due step, con la proteina lisozima.<sup>18</sup> Questo in un primo stadio perde un gruppo ossalato che si coordina al gruppo carbossilato del residuo Asp119, in seguito alla coordinazione alla proteina anche il secondo gruppo ossalato si stacca dal platino, in questo processo la coordinazione al legante DACH non subisce modifiche. Il diamminocicloesano si inserisce perfettamente in una cavità della struttura della proteina stessa, formata dai residui Trp63, Asp101 e Asn103.

---

<sup>17</sup> Grolleau F., Gamelin L., Boisdron-Celle M., Lapied B., Pelhate M., Gamelin E., A Possible Explanation for a Neurotoxic Effect of the Anticancer Agent Oxaliplatin on Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels, *J. Neurophysiol*, **2001**, 85, 2293-2297.

<sup>18</sup> Marzo T., "From conventional to novel Pt-based antineoplastic agents: mechanistic and biological effects", tesi di dottorato, Università degli Studi di Firenze, XXVIII ciclo, **2012-2015**.



**Fig. 2.1.** *Rappresentazione del sito di coordinazione del lisozima per oxaliplatino.*

Sulla base di questi studi, è stato ipotizzato che sostituendo il legante ossalato si possa avere una diversa reattività del complesso nei confronti della proteina, in particolare potrebbe cambiare il meccanismo di reazione oppure non interagire più con questa vista la mancanza del legante ossalato.

Riuscire ad impedire al farmaco di interagire con i composti proteici è uno degli scopi principali della ricerca, poiché questo tipo di reazione risulta essere, infatti, una delle maggiori cause della tossicità sistemica prodotta dall'oxaliplatino; bloccare questo cammino farmacologico potrebbe ridurre significativamente gli effetti collaterali prodotti dal farmaco.

I complessi  $PtCl_2(DACH)$ ,  $PtBr_2(DACH)$  e  $PtI_2(DACH)$  sono stati sintetizzati e studiati da un punto di vista chimico, caratterizzando il loro comportamento in soluzione e le loro proprietà di lipofilità. Successivamente, in analogia con quanto già riportato in letteratura e studiato in precedenza, la reattività degli analoghi sintetizzati è stata testata rispetto a target biologici modello, ovvero le proteine lisozima e RNasi-A e l'oligonucleotide (si veda *figura 5.9*), tramite esperimenti di spettrometria di massa. Tale reattività è stata studiata comparativamente con i dati disponibili per cisplatino ed oxaliplatino, per valutare le eventuali divergenze nel comportamento del complesso dovute alla presenza di un diverso legante.

Infine è stata testata la citotossicità, *in vitro*, dei complessi  $PtCl_2(DACH)$ ,  $PtBr_2(DACH)$  e  $PtI_2(DACH)$  comparativamente con quelle del cisplatino e



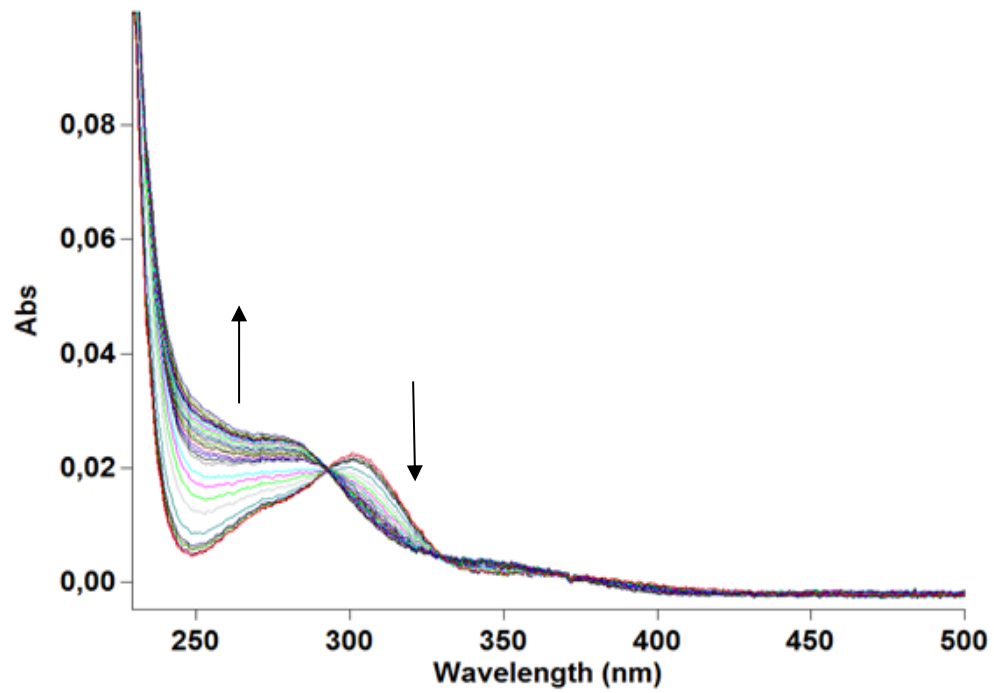
dell'oxaliplatino su un panel di linee cellulari tumorali del cancro del colon-retto, ovvero HT-29, HCT-8 e HCT-116, ed una linea cellulare sana di controllo, HEK293.

## 3. Risultati

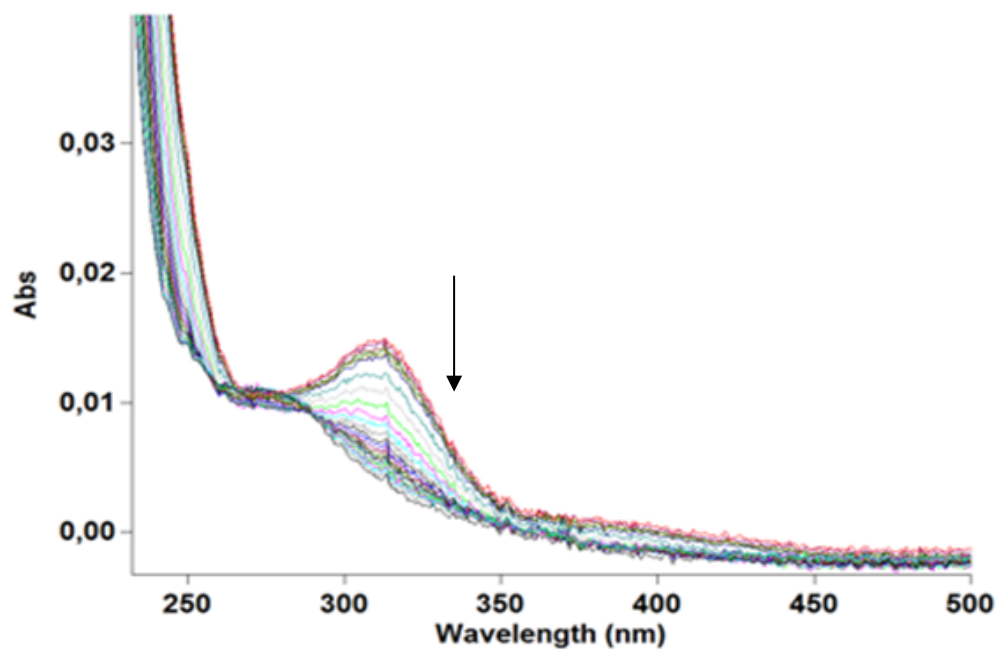
### 3.1. Caratterizzazione e comportamento in soluzione dei complessi PtX<sub>2</sub>(DACH)

#### 3.1.1. Spettri di assorbimento UV-VIS: stabilità dei complessi in tampone fosfato

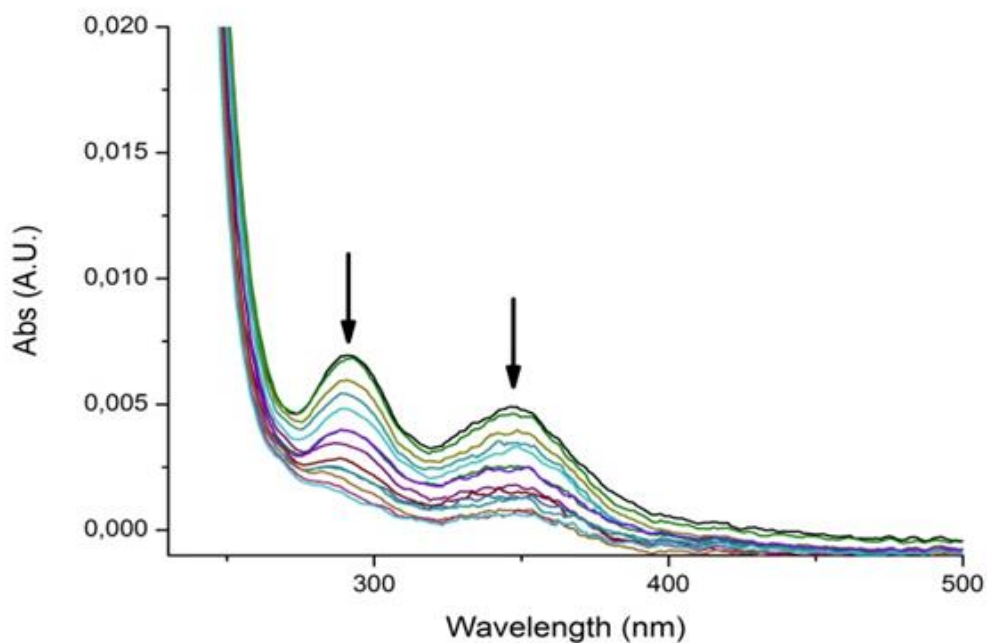
Nella seguente sezione vengono riportati gli spettri di assorbimento UV-VIS dei complessi PtCl<sub>2</sub>(DACH), PtBr<sub>2</sub>(DACH) e PtI<sub>2</sub>(DACH) 10<sup>-4</sup> M in buffer fosfato 50 mM a pH=7.4 (specifiche dell'analisi riportate nel *paragrafo 5.3*). Gli spettri sono stati registrati nell'arco delle 72 h per valutare le proprietà in soluzione dei complessi, in un ambiente che simuli le condizioni fisiologiche, in particolare per definire la stabilità in queste condizioni.



**Fig. 3.1.** Spettro di assorbimento UV-Vis di PtCl<sub>2</sub>(DACH) 10<sup>-4</sup> M in buffer fosfato 50 mM a pH=7.4, profili di assorbanza registrati per 72 ore.



**Fig. 3.2.** Spettro di assorbimento UV-Vis di PtBr<sub>2</sub>(DACH) 10<sup>-4</sup> M in buffer fosfato 50 mM a pH=7.4, profili di assorbanza registrati per 72 ore.



**Fig. 3.3.** Spettro di assorbimento UV-Vis di  $PtI_2(DACH)$   $10^{-4}$  M in buffer fosfato 50 mM a  $pH=7.4$ , profili di assorbanza registrati per 72 ore.

Come possiamo notare dai valori riportati nelle ascisse di ciascuno spettro, tutti e tre i complessi presentano transizioni elettroniche con assorbanze molto basse, quindi coefficienti di estinzione molare ( $\epsilon$ ) piccoli, secondo la legge di Lambert-Beer:  $A=\epsilon \cdot b \cdot C$ .

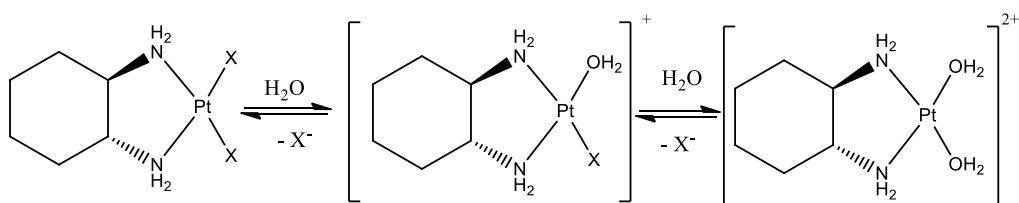
**Tab. 1.1.** Valori dei coefficienti di estinzione molare degli alogeno-derivati dell'oxaliplatino.

| Complesso      | $\lambda_{max}$ (assorbanza) | Coefficiente di estinzione molare $\epsilon$ ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) |
|----------------|------------------------------|---|
| $PtCl_2(DACH)$ | 301.4 nm (0.023)             | 230   |
| $PtBr_2(DACH)$ | 312 nm (0.016)               | 158.4   |
|                | 308.02 nm (0.025)            | 246.4   |
| $PtI_2(DACH)$  | 290.8 nm (0.007)             | 70  |

Dal confronto con studi precedentemente effettuati, è possibile attribuire la banda a lunghezza d'onda 290 nm dello spettro di  $PtI_2(DACH)$ , la spalla di poco

inferiore ai 300 nm dello spettro di  $\text{PtBr}_2(\text{DACH})$  e quella analoga dello spettro di  $\text{PtCl}_2(\text{DACH})$  alla transizione LMCT (*Ligand to Metal Charge Transfer*), in cui un doppietto elettronico o gli elettroni partecipanti ad un legame  $\pi$  del legante, vengono trasferiti in un orbitale d vuoto dello ione metallico; questo tipo di transizioni avendo una frequenza di assorbimento maggiore cadono nella regione del vicino UV. Mentre la banda a lunghezza d'onda 350 nm relativa a  $\text{PtI}_2(\text{DACH})$ , quella a circa 310 nm di  $\text{PtBr}_2(\text{DACH})$  e quella a circa 300 nm di  $\text{PtCl}_2(\text{DACH})$  vengono attribuite alle transizioni d-d del platino, in cui gli elettroni del metallo passano da un orbitale d a più bassa energia in uno ad energia maggiore.<sup>19-20</sup>

Inoltre valutando la variazione dell'assorbanza in funzione del tempo, possiamo affermare che i leganti alogenuro  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Br}^-$  (confermando la loro natura di buoni gruppi uscenti) vengono facilmente sostituiti da molecole di acqua, per formare i corrispondenti aquoioni, che presentano un'intensità di assorbimento molto inferiore rispetto ai primi; mentre per quanto concerne il legante  $\text{I}^-$  questo, rispetto agli altri due, presenta una minore tendenza ad essere sostituito, quindi il corrispondente acquoione si formerà più lentamente.



**Fig. 3.4.** Schema della reazione di idrolisi di  $\text{PtX}_2(\text{DACH})$ .

In particolare nello spettro in *fig. 3.1.* per il complesso  $\text{PtCl}_2(\text{DACH})$  osserviamo un incremento dell'assorbanza in funzione del tempo per quanto riguarda l'ampia spalla a lunghezza d'onda circa 250 nm, attribuibile alla transizione LMCT  $\text{Cl}_2\text{O}(p_{x,y}) \rightarrow \text{Pt}(d_{x^2-y^2})$  dove i leganti cloruro vengono sostituiti da acqua. Per quanto concerne la seconda banda di assorbimento a circa 300 nm, presumibilmente dovuta alla transizione d-d dello ione metallico

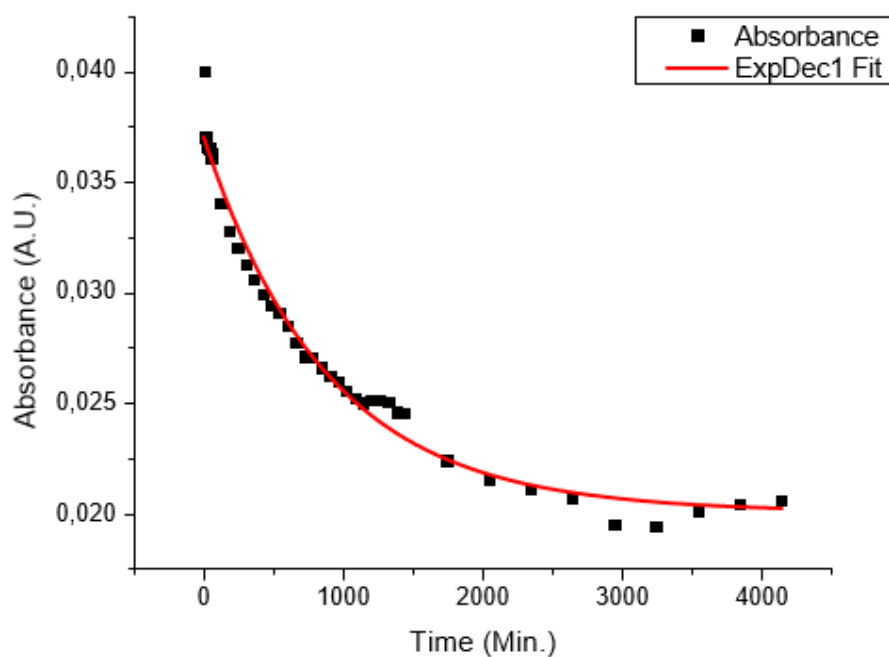
<sup>19</sup> Marzo T. et al, Cisplatin and its dibromido analogue: a comparison of chemical and biological profiles, *Biometals*, **2016**, 29, 535-542.

$Pt(d_{xy}) \rightarrow Pt(d_x^2-y^2)$ , questa, così come per gli altri due complessi, diminuisce in intensità, a causa della sostituzione di un legante alogenuro che è un forte donatore  $\pi$  ( $I^- > Br^- > Cl^-$ ) con una molecola d'acqua.<sup>20</sup>

### 3.1.2. Calcolo delle costanti cinetiche per le reazioni di idrolisi dei complessi

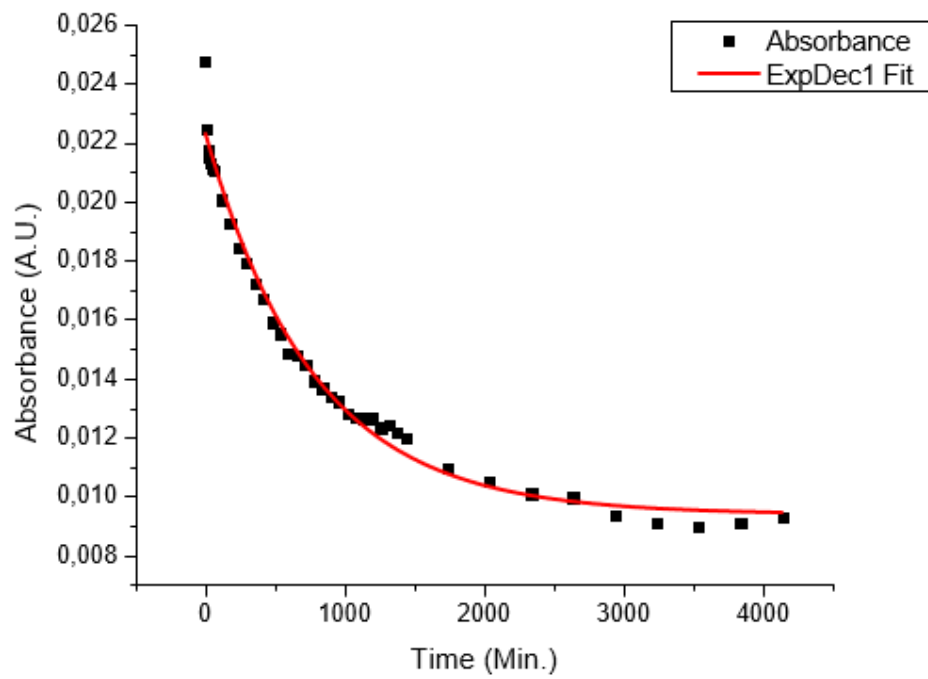
Poiché la forma diacquo rappresenta la specie attiva dei complessi capace di interagire con il DNA, abbiamo ritenuto importante stabilire la cinetica del processo di idrolisi, rivestendo questo un ruolo fondamentale per l'espletamento dell'effetto farmacologico desiderato.

Vengono riportati i grafici dell'assorbanza in funzione del tempo.

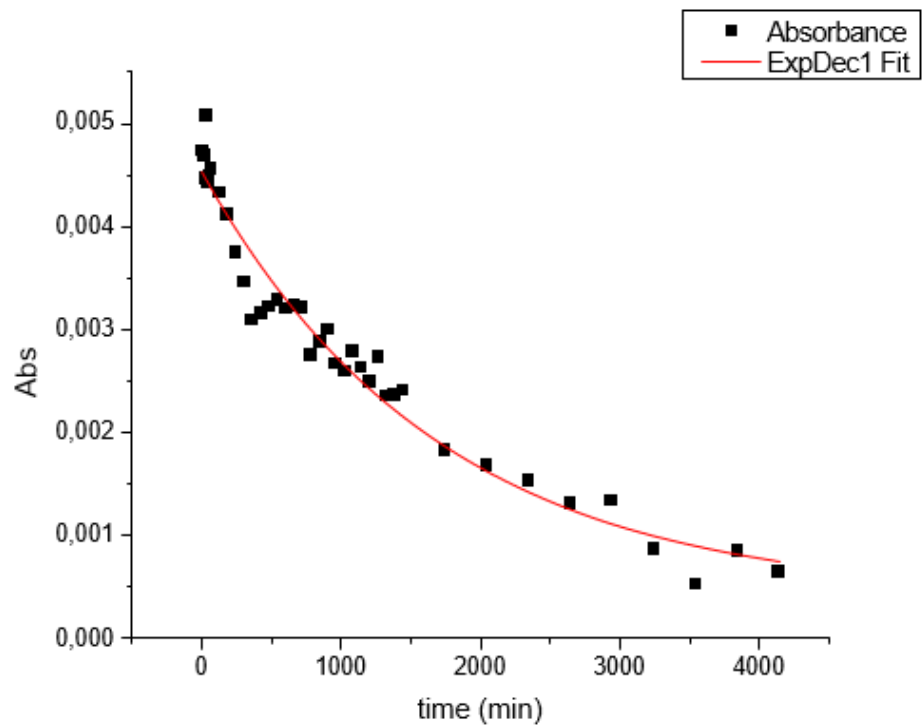


**Fig. 3.5.** Profilo cinetico di  $PtCl_2(DACH)$  in tampone fosfato.

<sup>20</sup> Marzo T. et al, cis- $PtI_2(NH_3)_2$ : a reappraisal, *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 14893-14905.



**Fig. 3.6.** Profilo cinetico di  $PtBr_2(DACH)$  in tampone fosfato.



**Fig. 3.7.** Profilo cinetico di  $PtI_2(DACH)$  in tampone fosfato.

Il *fitting* scelto è di tipo monoesponenziale ed il processo di idrolisi per i tre complessi è stato trattato come una reazione di pseudo-primo ordine. Vengono riportati nella seguente tabella i valori delle costanti cinetiche sperimentali degli alogeno-derivati dell'oxaliplatino, ricavate dalle equazioni delle rette utilizzate per il *fitting* dei dati sperimentali.

**Tab. 1.2.** Valori delle costanti cinetiche sperimentali dei complessi con relativi tempi di emivita e coefficienti di determinazione.

| Complesso                | $k_{\text{obs}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ | $t_{1/2} \text{ (min)}$ | $r^2$ |
|--------------------------|--|-------------------------|-------|
| PtCl <sub>2</sub> (DACH) | $1.89 \cdot 10^{-5}$                     | 611.3                   | 0.981 |
| PtBr <sub>2</sub> (DACH) | $2.14 \cdot 10^{-5}$                     | 538.4                   | 0.985 |
| PtI <sub>2</sub> (DACH)  | $9.75 \cdot 10^{-6}$                     | 1184.6                  | 0.961 |

Dai dati ottenuti osserviamo che il cloro- ed il bromo-derivato hanno all'incirca la stessa costante cinetica, questo significa che in soluzione perdono con la stessa velocità il legante alogenuro. Ciò si riflette anche nei valori del tempo di emivita,  $t_{1/2}$ , definito come il tempo necessario affinché la concentrazione iniziale della specie considerata si dimezzi. Questo parametro risulta essere importante poiché è un indice della concentrazione degli acquoioni presenti all'interno della cellula e quindi disponibili per la complessazione del DNA.

Notiamo una significativa discrepanza per quanto riguarda i valori relativi allo iodo-analogo, questo infatti mostra un tempo di emivita molto maggiore rispetto ai suoi alogeno-analoghi ed una minore costante cinetica per la reazione di idrolisi, ciò significa che i leganti ioduro vengono sostituiti dalle molecole d'acqua più lentamente. Questo diverso comportamento può essere determinato dal fatto che il legante ioduro è un legante soft (in misura maggiore rispetto agli altri alogeni essendo l'ultimo del gruppo e per le maggiori dimensioni) così come il platino, quindi la maggiore interazione soft-soft fra i due atomi potrebbe essere la possibile causa della diversa cinetica di idrolisi.

Dalla letteratura notiamo che l'oxaliplatino presenta una  $k_{\text{obs}}=7.76 \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}\text{)}$  che risulta essere molto simile al valore sperimentale ottenuto per lo iodo-



analogo, così come il tempo di emivita che per l'oxaliplatino risulta essere  $t_{1/2}=1488.72$  (min).<sup>21</sup>

Da quanto riportato, quindi, i complessi PtCl<sub>2</sub>(DACH) e PtBr<sub>2</sub>(DACH) risultano maggiormente instabili e quindi, una volta attraversata la membrana cellulare, presentano una maggiore velocità di reazione nei confronti del DNA, impiegando minore tempo, rispetto allo iodo-analogo ed all'oxaliplatino, ad attivarsi.

### **3.1.3. Calcolo del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua dei complessi**

Dopo aver preparato le miscele bifasiche dei tre complessi come descritto nel *paragrafo 5.4*, si prelevano due aliquote, rispettivamente dalla fase acquosa e da quella organica, per ciascun complesso, e si misura la concentrazione del metallo presente tramite spettrofotometria di emissione atomica ICP. In seguito viene calcolato il logaritmo del rapporto delle concentrazioni del complesso nelle due fasi. I valori riportati nella seguente tabella sono stati ottenuti dalla media su tre determinazioni e sono stati comparati con quelli del cisplatino e dell'oxaliplatino descritti in letteratura.

---

<sup>21</sup> Gao W.G., Pu S.P., Liu W.P., Liu Z.D., Yang Y.K., *Yao Xue Xue Bao*, **2003**, 38, 223.

**Tab. 1.3.** Valori sperimentali dei coefficienti di lipofilicità dei complessi studiati.

| Complesso                | Log P               |
|--------------------------|---------------------|
| Cisplatino               | -2.40 <sup>22</sup> |
| Oxaliplatino             | -1.76 <sup>23</sup> |
| PtCl <sub>2</sub> (DACH) | -0.47               |
| PtBr <sub>2</sub> (DACH) | -0.16               |
| PtI <sub>2</sub> (DACH)  | 0.76                |

Poiché il coefficiente di lipofilicità è definito come logaritmo del rapporto della concentrazione dell'analita tra fase organica ed acquosa, tanto più è grande il suo valore, maggiore è il carattere lipofilo del campione.

Come possiamo notare gli alogeno-derivati sono molto più lipofili rispetto ai loro analoghi, cisplatino ed oxaliplatino; in particolare notiamo una lipofilicità crescente passando dal cloro, al bromo, allo iodo-analogo, che è proprio quello che ci aspettavamo, poiché questa caratteristica aumenta lungo un gruppo della tavola periodica.

Per quanto riguarda l'aspetto farmacologico, questo incremento di lipofilicità potrebbe portare ad una maggiore internalizzazione della cellula dei complessi sintetizzati. Questo aumentato *uptake* del metallo da parte della cellula potrebbe determinare un miglioramento dell'azione citotossica del complesso poiché una maggiore concentrazione del composto risulterebbe presente nel citoplasma e quindi disponibile alla reazione con lo specifico target.

<sup>22</sup> Marzo T. et al, cis-PtI<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: a reappraisal, *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 14893-14905.

<sup>23</sup> M.V. Baker, P.J. Barnard, S.J. Berners-Price, S.K. Brayshaw, J.L. Hickey, B.W. Skelton, A.H. White, *Dalton Trans.*, **2006**, 30, 3708.

## 3.2. Interazione con target biologici modello

### 3.2.1. Interazione con lisozima

Per valutare la reattività e caratterizzare il comportamento dei complessi metallici nei confronti di bersagli biologici modello, è stata impiegata la spettrometria di massa ad alta risoluzione. Nello specifico la prima proteina modello utilizzata per questo tipo di studio è stato il lisozima, essendo noto da numerosi studi la platinazione della proteina sia con cisplatino che con oxaliplatino.<sup>24</sup>

Dalla letteratura è nota la reattività specifica del cisplatino nei confronti del residuo di istidina (His15) del lisozima, la platinazione all'imidazolo avviene tramite la perdita dei due leganti cloruro, con relativa coordinazione del frammento  $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2]^{2+}$  alla proteina.<sup>25</sup>

Mentre per quanto riguarda l'oxaliplatino, questo presenta un diverso sito di coordinazione alla proteina, poiché si inserisce in una cavità del lisozima formata dai residui triptofano (Trp63), aspartato (Asp101) ed asparagina (Asn103), dove il rilascio del gruppo ossalato è favorito dalla coordinazione del platino al gruppo carbossilato del residuo Asp119 della proteina stessa.<sup>26</sup>

Da quanto riportato, possiamo dedurre che cambiando tipologia di legante sia possibile ottenere un diverso meccanismo di reazione del complesso di platino nei confronti della proteina. Questo tipo di osservazione ci ha portato ad ipotizzare che la diversa reattività rispetto alla proteina possa poi riflettersi in un differente profilo farmacologico del complesso rispetto a quello degli analoghi di platino comunemente impiegati in clinica.

Sulla base di queste supposizioni abbiamo ritenuto opportuno studiare il comportamento degli alogeno-derivati sintetizzati rispetto a dei modelli

---

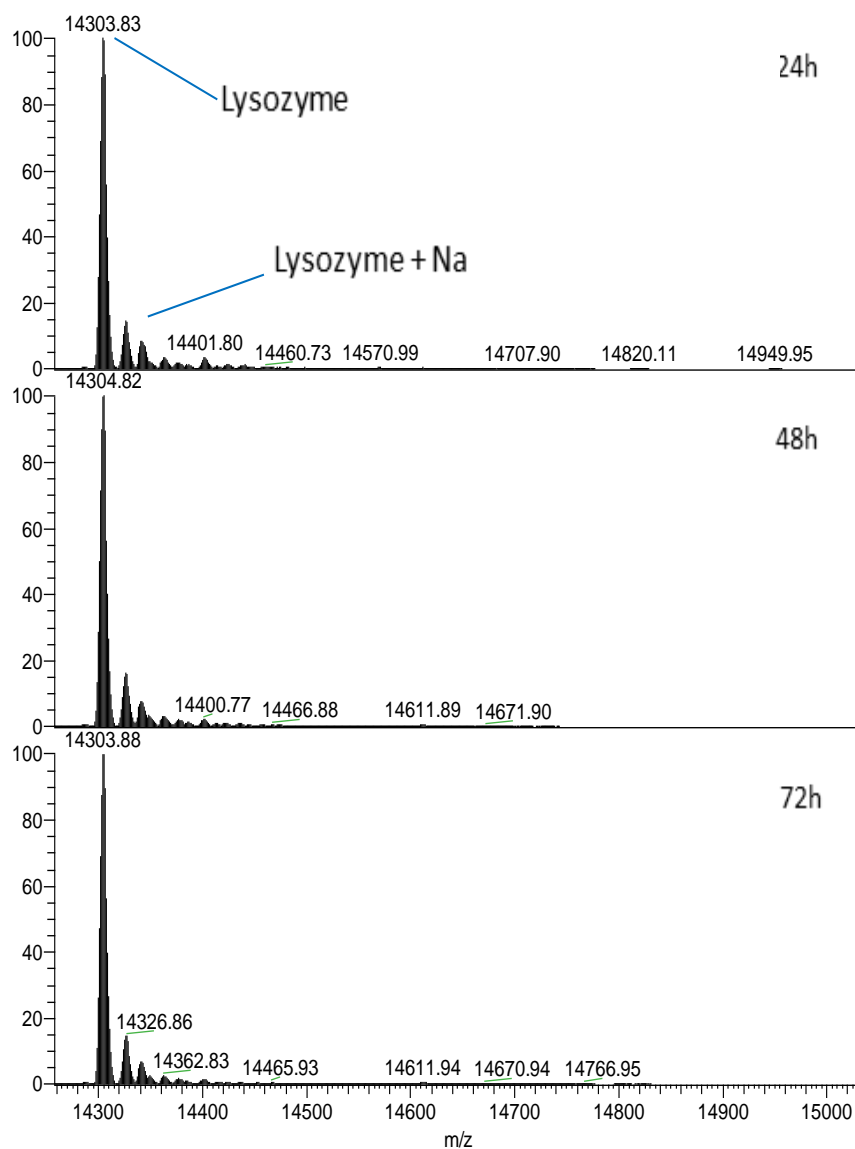
<sup>24</sup> Marasco D., Messori L., Marzo T., Merlino A., Oxaliplatin vs Cisplatin: competition experiments on their binding to lysozyme, *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 10392-10398.

<sup>25</sup> Casini A., Mastrobuoni G., Temperini C., Gabbiani C., Francese S., Moneti G., Supuran C.T., Scozzafava A., Messori L., *Chem. Commun.*, **2007**, 2, 156-158.

<sup>26</sup> Marzo T., "From conventional to novel Pt-based antineoplastic agents: mechanistic and biological effects", tesi di dottorato, Università degli Studi di Firenze, XXVIII ciclo, anni **2012-2015**.

biologici tramite spettrometria di massa ad alta risoluzione. Nel *paragrafo 5.5.* sono state riportate le procedure secondo le quali si è proceduto alla preparazione dei campioni per l'analisi.

Dagli spettri di massa registrati e deconvoluti a 24, 48 e 72 h otteniamo profili analoghi per tutti e tre i complessi, quindi per semplicità, per le proteine lisozima e ribonucleasi, sono stati riportati gli spettri di un solo complesso essendo gli altri identici. Come si può notare dalle *fig. 3.8. e 3.9.* gli spettri presi a campione sono quelli del complesso  $PtBr_2(DACH)$ .



**Fig. 3.8.** Spettri ESI-MS deconvoluti di lisozima  $10^{-4}$  M trattato con  $PtBr_2(DACH)$  (rapporto metallo-proteina 3:1) in buffer ammonio acetato 20 mM (pH=6.8) registrati dopo 24, 48 e 72 h di incubazione a 37 °C.

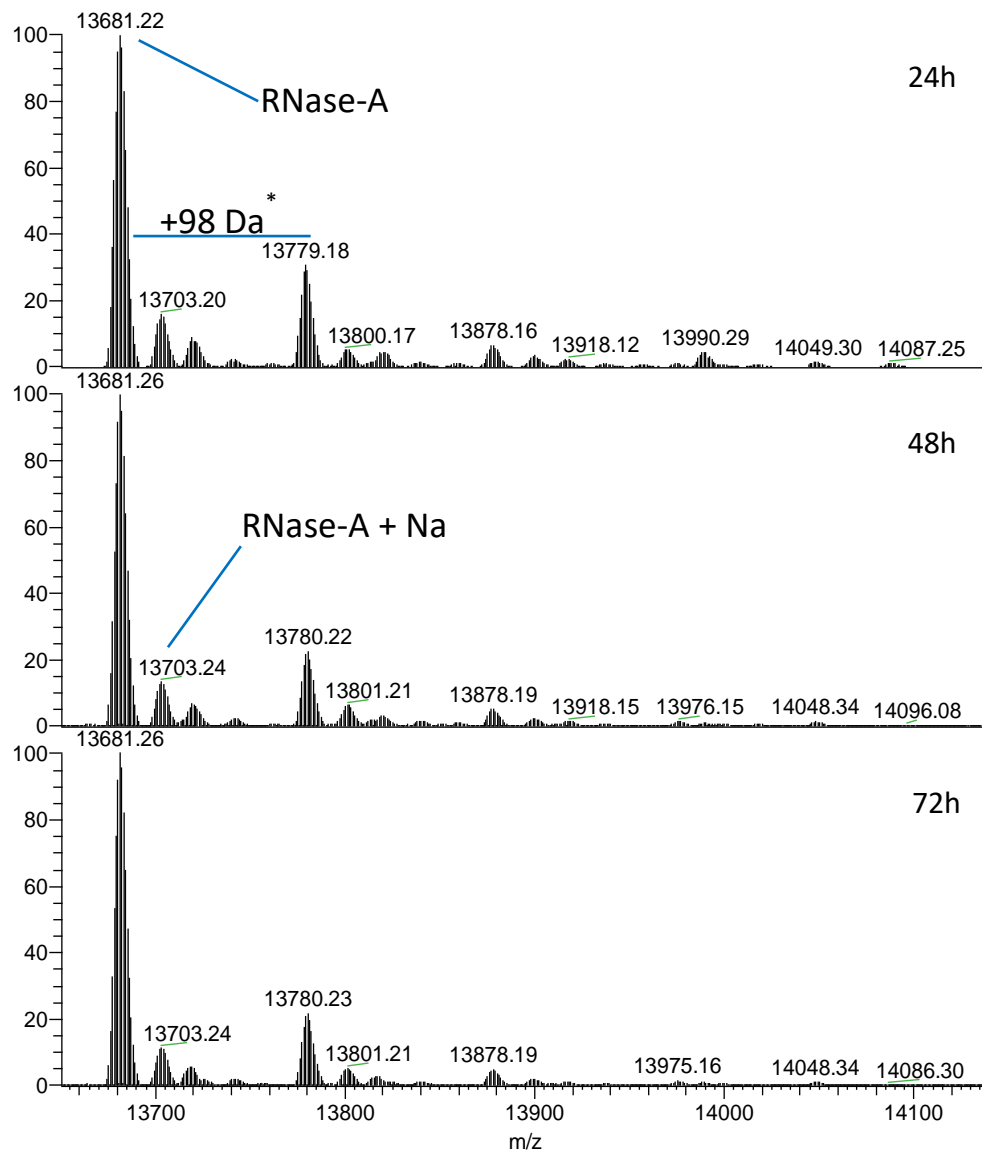
Dall'analisi degli spettri notiamo che nessuno dei complessi presi in analisi forma addotti con la proteina modello, a differenza degli analoghi oxaliplatino e cisplatino. Questa evidenza potrebbe suggerire diverse proprietà farmacologiche degli alogeno-derivati rispetto ai farmaci antineoplastici comunemente impiegati.

Possiamo notare, inoltre, la presenza di un picco a  $m/z = (M^{*+} + 23)$  imputabile alla formazione di un addotto indesiderato tra la proteina e sodio, contenuto nel tampone salino utilizzato per l'analisi.

### 3.2.2. Interazione con ribonucleasi A

La seconda proteina modello con cui abbiamo valutato la reattività dei complessi  $PtX_2(DACH)$  è stata la ribonucleasi A. Anche in questo caso notiamo una diversa reattività dei complessi sintetizzati rispetto ai composti di riferimento, cisplatino ed oxaliplatino, che formano addotti con questo tipo di target proteico.

La *fig. 3.9.* mostra gli spettri di massa registrati a 24, 48 e 72 h e deconvoluti di  $PtBr_2(DACH)$ , le specifiche per la preparazione del campione all'analisi sono riportate nel *paragrafo 5.5.* Di nuovo, avendo ottenuto risultati identici per il cloro e lo iodo analogo, è stato riportato lo spettro di un solo campione.



**Fig. 3.9.** Spettri ESI-MS deconvolti di RNasi-A 10<sup>-4</sup> M trattata con PtBr<sub>2</sub>(DACH) (rapporto metallo-proteina 3:1) in buffer ammonio acetato 20 mM (pH=6.8) registrati dopo 24, 48 e 72 h di incubazione a 37 °C.

Dagli spettri registrati si evince che, anche in questo caso, i complessi PtX<sub>2</sub>(DACH) non reagiscono nei confronti di target proteici, poiché nessun segnale è attribuibile alla formazione di addotti metallici con la RNasi-A.

Così come riscontrato negli spettri di massa dei campioni con lisozima, si constata la presenza di picchi che suggeriscono la formazione di addotti tra la ribonucleasi ed il sodio presente nel tampone. Troviamo, inoltre, un picco a  $m/z = (M^{*+} + 98)$  attribuibile alla formazione di addotti isobari indesiderati tra

la proteina e le piccole quantità solfati e fosfati contenuti nel tampone salino.<sup>27</sup>

### 3.2.3. Interazione con oligonucleotide modello

Le proprietà antitumorali del cisplatino e dell'oxaliplatino sono dovute alla coordinazione del metallo al DNA, la quale provoca la distorsione del filamento che, se non intervengono meccanismi di riparazione, porta alla morte cellulare.<sup>28</sup>

Numerosi studi hanno dimostrato che, dopo l'attivazione per idrolisi dei complessi di platino (all'interno della cellula), si formano addotti stabili tra il DNA ed il Pt<sup>2+</sup>. In particolare la complessazione del metallo avviene tra due residui adiacenti di guanina o tra una guanina ed una adenina. La configurazione *cis* del complesso induce la coordinazione del platino al N<sup>7</sup> di entrambe le basi puriniche nel solco maggiore del DNA.<sup>29</sup>

Per queste ragioni gli alogeno derivati dell'oxaliplatino sono stati incubati con un oligonucleotide modello, definito ODN2 (con sequenza 5'-CTACGGTTTCAC-3'), per verificare la loro efficacia nella coordinazione con il filamento di DNA (dati sperimentali sulla preparazione dei campioni riportati nel *paragrafo* 5.5.).

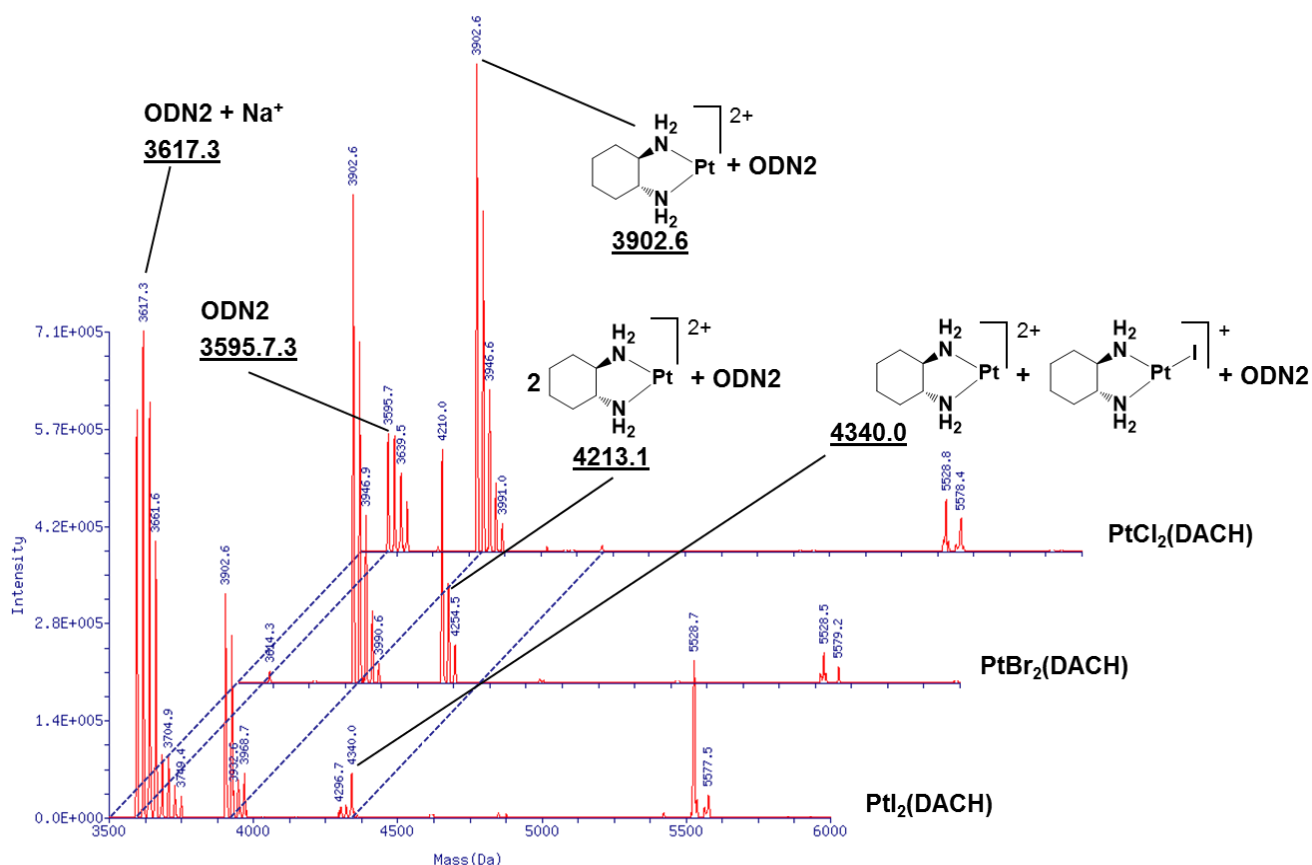
Vengono di seguito riportati gli spettri di massa dei tre complessi di platino registrati alle 72 ore dall'incubazione.

---

<sup>27</sup> Chowdhury SK, et al. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1990**, *1*, 382-388.

<sup>28</sup> Reedijk J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 3611-3616.

<sup>29</sup> Jamieson E.R., Lippard S.J., *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2467-2498.



**Fig. 3.10.** Spettri ESI-MS deconvoluti di ODN2 in acqua milli-Q  $10^{-4}$  M (rapporto metallo-oligonucleotide 2:1) incubato con PtCl<sub>2</sub>(DACH), PtBr<sub>2</sub>(DACH) e PtI<sub>2</sub>(DACH) per 72 h a 37 °C.

Dalla comparazione degli spettri di massa ottenuti possiamo notare come i tre complessi, una volta attivati, cioè dopo esser stati idrolizzati ed aver rimosso i leganti alogenuro, reagiscono e formano addotti con il frammento di DNA, secondo quanto auspicato. In particolare dai segnali ottenuti possiamo supporre la formazione sia di mono che bis-addotti tra i complessi e l'oligonucleotide preso in esame. Nello specifico il segnale a  $m/z$  3902.6 Da, presente in tutti e tre gli spettri, può essere attribuito alla formazione del mono-addotto tra complesso ed oligonucleotide; per quanto concerne gli spettri di PtBr<sub>2</sub>(DACH) e di PtI<sub>2</sub>(DACH), notiamo due segnali, uno a 4213.1 Da (per il bromo-derivato) ed uno a 4340.0 Da (per lo iodo-derivato) attribuibili alla formazione di un bis-addotto.



Dai valori ottenuti possiamo constatare che il bis-addotto formato da parte dello iodo-analogo dell'oxaliplatino, risulta costituito da un frammento  $[\text{Pt}(\text{DACH})]^+$  e da uno  $[\text{Pt}(\text{DACH})]^{2+}$ . La presenza di questo tipo di addotto, può essere ricondotto alla diversa cinetica di idrolisi dei composti sintetizzati (si veda *tab.1.2.*). Infatti lo iodo-analogo presenta una costante cinetica sperimentale significativamente diversa, circa un ordine di grandezza inferiore, rispetto agli altri due alogeno derivati.

A supporto di quanto affermato, notiamo come il picco molecolare dell'ODN2 a  $m/z$  3617.3 Da negli spettri di  $\text{PtCl}_2(\text{DACH})$  e  $\text{PtBr}_2(\text{DACH})$  risulti assente o di bassa intensità, mentre nello spettro di  $\text{PtI}_2(\text{DACH})$  si rivela ben visibile anche nello spettro alle 72 h. Questo dato sperimentale indica appunto che il complesso di iodio si idrolizza più lentamente degli altri alogeno-derivati, quindi presenta una minore velocità di reazione con il target biologico.

Sulla base dei dati fin qui ottenuti ci aspetteremo quindi una maggiore reattività tra il DNA ed il cloro e bromo derivato, rispetto a quella con lo iodo analogo, in particolare i primi due avranno una velocità di reazione maggiore rispetto al terzo.

### 3.3. Studi di citotossicità su linee cellulari di CRC

Per valutare la citotossicità di un farmaco, il protocollo sperimentale, prevede la determinazione dei valori di  $\text{IC}_{50}$ , ovvero la concentrazione di farmaco che produce un effetto tale da causare il dimezzamento delle cellule vitali.

Nel nostro caso i tre complessi sono stati testati su un panel di tre linee cellulari umane di carcinoma al colon-retto HCT116, HT29 e HCT8 (questo tipo di cellule hanno, nell'ordine, una sensibilità crescente nei confronti del cisplatino) e su un controllo di cellule umane renali sane, HEK293.

Queste cellule sono state esposte a concentrazioni crescenti dei complessi nel range 0-200  $\mu\text{M}$ , dopo 24 h la vitalità cellulare è stata valutata tramite Trypan Blue, le cellule vitali sono state contate e sono stati dunque determinati i

valori di  $IC_{50}$  (il protocollo seguito per questo tipo di analisi è stato descritto nel *paragrafo 5.6.*).

**Tab. 1.4.** Valori di  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ,  $mean \pm SEM$ ) per i tre complessi sintetizzati e per i composti di riferimento oxaliplatino e cisplatino.

| <b>Linee cellulari</b> | <b>Cisplatin</b> | <b>Oxaliplatino</b> | <b>PtCl<sub>2</sub>(DACH)</b> | <b>PtBr<sub>2</sub>(DACH)</b> | <b>PtI<sub>2</sub>(DACH)</b> |
|------------------------|------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <b>HCT-116</b>         | 24.4±0.6         | 49.9±1.9            | 9.86±1.4                      | 30.96±0.8                     | 33.7±2.2                     |
| <b>HT-29</b>           | 16.7±2.3         | 18.8±2.5            | 49.07±1.1                     | 66.75±2.0                     | 26.4±3.0                     |
| <b>HCT-8</b>           | 9.2±1.5          | 33.1±0.6            | 30.83±0.1                     | 48.64±0.1                     | 50.8±4.8                     |
| <b>HEK293</b>          | 91.41±4.15       | >200                | 194.86±6.8                    | >200                          | 80.41±5.23                   |

Confrontando i valori di  $IC_{50}$  per la linea cellulare HCT116 (quella che mostra una resistenza maggiore nei confronti del trattamento con cisplatino), vediamo che rispetto all'oxaliplatino, PtCl<sub>2</sub>(DACH) mostra una maggiore citotossicità. Mentre per quanto riguarda le altre linee cellulari, i complessi sintetizzati conservano all'incirca la stessa efficacia.

Inoltre per quanto riguarda la linea cellulare di controllo, anche qui, notiamo una citotossicità del tutto simile tra oxaliplatino ed i suoi alogeno derivati.

Da ciò si evince come la sostituzione dei gruppi funzionali legati al platino determini differenti caratteristiche nel complesso (velocità di idrolisi e reattività verso target biologici), le quali possono determinare un incremento (in alcuni casi) dell'effetto citotossico nei confronti di alcune linee tumorali.

## 4. Conclusioni

In questo progetto di tesi ci siamo occupati della sintesi e della caratterizzazione dei complessi  $\text{PtCl}_2(\text{DACH})$ ,  $\text{PtBr}_2(\text{DACH})$  e  $\text{PtI}_2(\text{DACH})$ , analoghi dell'oxaliplatino, ottenuti tramite la sostituzione del legante ossalato con due leganti alogenuro. I nostri studi si sono basati su prove di stabilità in soluzione, di interazione con target biologici e di citotossicità nei confronti di alcune linee cellulari; per capire come e se, i diversi gruppi funzionali sul metallo possano indurre una diversa reattività del complesso.

Tramite spettrofotometria UV-Vis è stata testata la stabilità dei composti sintetizzati in soluzione acquosa, nello specifico in un tampone fosfato a pH fisiologico. Da quanto ottenuto abbiamo visto che i tre complessi di platino siano sottoposti ad una progressiva idrolisi, poiché i leganti alogenuro, cloruro e bromuro soprattutto, vengono facilmente sostituiti da molecole d'acqua (si vedano le costanti cinetiche di idrolisi nel *paragrafo 3.1.2.*); ciò risulta essere estremamente positivo, in quanto è stato dimostrato che gli acquoioni dell'oxaliplatino e quindi degli alogeno derivati, argomento di questa tesi, sono le specie attive che vanno a reagire con l'oligonucleotide considerato.

Nello specifico da studi cinetici abbiamo osservato come questi complessi presentino una costante sperimentale di idrolisi molto maggiore rispetto a quella dell'analogo loro precursore (ad eccezione dello iodo-analogo che presenta una  $k_{\text{obs}}$  paragonabile a quella dell'oxaliplatino). Questo tipo di dato suggerisce una maggiore velocità di formazione della specie attiva e di conseguenza in una maggiore reattività nei confronti dei target biologici. In realtà è noto dalla letteratura e da studi *in vivo*, come questa maggiore reattività del cloro-analogo sia determinata da una estrema instabilità del complesso e per questo non sia un buon candidato farmaco.

A supporto di quanto precedentemente affermato, possiamo notare come nello spettro di massa (*fig. 3.10.*) alle 72 ore sia ancora presente un picco attribuibile alla forma libera dell'oligonucleotide nello spettro dello iodo-analogo, mentre per quanto concerne gli altri due spettri dei complessi

PtCl<sub>2</sub>(DACH) e PtBr<sub>2</sub>(DACH), qui si ha una completa reazione tra il target ed il composto sintetizzato, essendo questo picco di intensità debole o assente.

In seguito tramite emissione atomica ICP è stata determinata la lipofilità dei complessi che, come da previsione, ha stabilito che sostituendo il complesso con leganti di lipofilità crescente (caratteristica che aumenta lungo un gruppo), questi vanno ad aumentare il carattere lipofilo del composto di coordinazione (si veda *tab. 1.3.*). L'aumento di lipofilità dei complessi della serie PtX<sub>2</sub>(DACH) rispetto all'oxaliplatino, potrebbe suggerire un migliore assorbimento cellulare del farmaco, dovendo questo attraversare la membrana cellulare costituita da un doppio strato fosfolipidico.

Con lo scopo di indagare gli aspetti meccanicistici e le modalità con cui i complessi interagiscono con target biologici modello, questi sono stati sottoposti a studi di interazione con le proteine modello lisozima e ribonucleasi-A e con l'oligonucleotide ODN2, simulatore dell'interazione con DNA, tramite tecniche ESI-MS ad alta risoluzione.

Dai risultati ottenuti è stato osservato come, a differenza dell'oxaliplatino e del cisplatino, i complessi PtCl<sub>2</sub>(DACH), PtBr<sub>2</sub>(DACH) e PtI<sub>2</sub>(DACH) non interagiscono con le proteine modello. Questo risulta essere un dato molto importante, poiché numerosi effetti collaterali dei farmaci antitumorali possono essere ascritti all'interazione tra questi e i cosiddetti target secondari, cioè proprio le proteine presenti all'interno della cellula. Mentre per quanto riguarda l'interazione con l'oligonucleotide si osserva la formazione di addotti dovuti presumibilmente alla coordinazione del frammento [Pt(DACH)]<sup>2+</sup> sul sito GG dell'oligonucleotide. L'assenza di reattività di tutta la serie PtX<sub>2</sub>(DACH) nei confronti delle proteine modello, potrebbe quindi suggerire l'esistenza di un unico profilo farmacologico, ovvero l'interazione con il DNA.

Infine, sono stati effettuati test preliminari di citotossicità nei confronti di tre linee cellulari tumorali, HCT116, HT29 e HCT8, tutte riguardanti il tumore al colon-retto, ed una linea cellulare sana di controllo, HEK293. Confrontando i dati ottenuti per i complessi sintetizzati con quelli ottenuti per oxaliplatino e cisplatino, è stato rilevato come per la linea cellulare HCT116, quella che presenta una maggiore resistenza nei confronti del cisplatino, il complesso PtCl<sub>2</sub>(DACH) risulti più reattivo rispetto ai suoi analoghi alogenati e soprattutto nei confronti dei composti di riferimento CDDP ed oxaliplatino. Per quanto riguarda le altre linee cellulari abbiamo ottenuto citotossicità

analoghe, senza significative discrepanze tra i vari composti analizzati. Dai dati raccolti possiamo evincere che la sostituzione del legante ossalato, per quanto visto, non è determinante nell'attività citotossica del complesso ma influenza significativamente il profilo farmacologico del complesso stesso. Infatti è stato dimostrato come la sostituzione del legante ossalato, con due leganti alogenuro, comporti una reattività selettiva nei confronti del target primario (oligonucleotide). L'assenza di reattività dei complessi  $PtX_2(DACH)$  nei confronti dei modelli proteici presi in esame, potrebbe suggerire che questo tipo di composti non inducano tossicità sistemica una volta somministrati, seguendo questi una sola via farmacologica.

## 5. Procedure sperimentali

### 5.1. Materiali

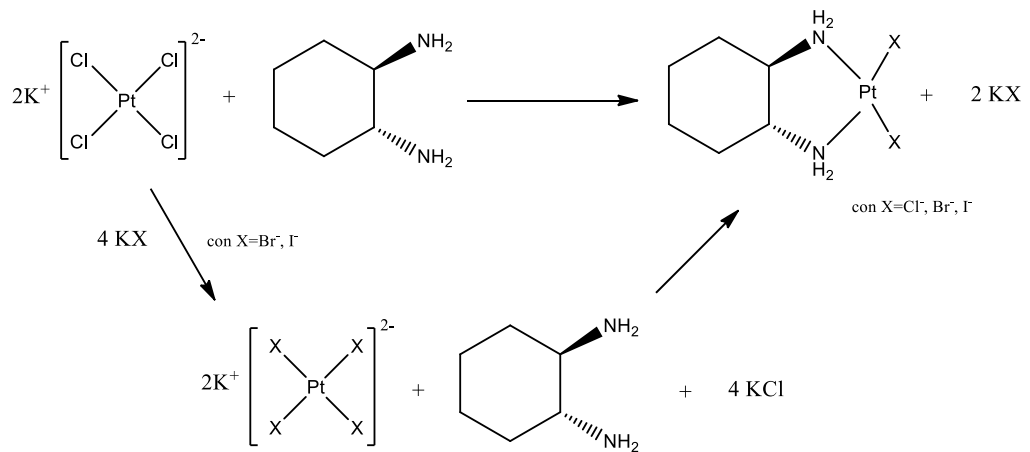
I reagenti utilizzati per la realizzazione delle sintesi oggetto del nostro studio,  $K_2PtCl_4$  (M.W. 415.11), diammino-cicloesano (DACH) (M.W. 114.19), KBr (M.W. 119.01) e KI (M.W. 166.01) sono stati acquistati dal catalogo Sigma-Aldrich Co.LCC (Milano, Italia) e sono stati impiegati senza ulteriore purificazione.

Per quanto riguarda i tamponi – buffer fosfato 50 mM pH=7.4 e buffer ammonio acetato 20 mM pH=6.8 – utilizzati per le analisi spettrofotometrica e spettrometrica, ed i solventi, dimetilsolfossido e dimetilformammide deuterata, anch'essi impiegati per le analisi spettrometrica e spettroscopica, sono stati acquistati dallo stesso catalogo Sigma-Aldrich.

Le stesse proteine modello ed oligonucleotide utilizzati per valutare l'efficacia nel formare addotti con i complessi sintetizzati, sono stati acquistati dal medesimo catalogo.

### 5.2. Sintesi degli alogeno-derivati dell'oxaliplatino

I complessi di platino sono stati sintetizzati tutti tramite lo stesso tipo di reazione illustrata nel seguente schema.

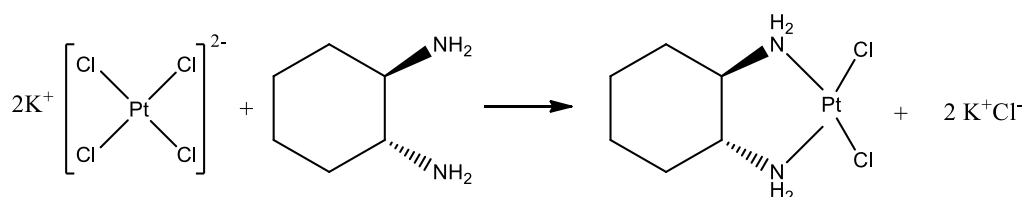


**Fig. 5.1.** Schema di sintesi della serie dei complessi  $PtX_2(DACH)$ .

Per quanto concerne i complessi  $PtBr_2(DACH)$  e  $PtI_2(DACH)$ , questi prevedono uno step di reazione aggiuntivo rispetto al cloro derivato, poiché il sale di platino di partenza,  $K_2PtCl_4$ , deve essere convertito nel rispettivo tetraalogenoplatinato di potassio. Nel successivo step viene aggiunto il diamminocicloesano (DACH) affinché questo sostituisca due leganti alogenuro e chelando il platino formi il complesso  $PtX_2(DACH)$ .

### 5.2.1 Sintesi di $PtCl_2(DACH)$

Il complesso  $PtCl_2(DACH)$  è stato sintetizzato a partire da tetracloroplatinato di potassio e DACH, secondo lo schema riportato in *fig. 5.2*.



**Fig. 5.2.** Sintesi del complesso  $PtCl_2(DACH)$ .

Sono stati pesati 99.7 mg di  $K_2PtCl_4$  ( $2.4 \times 10^{-4}$  mol, M.W. 415.09 g/mol) e solubilizzati in 1.5 mL di acqua milli-Q, questa soluzione è stata poi trasferita in un palloncino da reazione, coperto con alluminio per evitare reazioni di degradazione e posto sotto agitazione magnetica.

In seguito sono stati pesati 27.4 mg di DACH ( $2.42 \times 10^{-4}$  mol, M.W. 114.19 g/mol, rapporto stechiometrico 1:1 con il platino) che sono stati solubilizzati in 2 mL di acqua milli-Q. Questa soluzione è stata aggiunta tramite una siringa al palloncino, a cui è stato applicato un setto di gomma affinché l'ambiente di reazione fosse privo di aria. Quindi piccole aliquote della soluzione di DACH sono state aggiunte gradualmente nel corso di un'ora alla soluzione acquosa del complesso di platino. La soluzione dell'ammina viene aggiunta lentamente affinché non si abbiano reazioni parallele e tutto il DACH aggiunto vada a sostituire due leganti cloruro del platino.

La soluzione viene lasciata sotto agitazione all'incirca per 4 ore, trascorso questo tempo si nota la presenza di un precipitato giallo, quindi per favorire la completa precipitazione dei cristalli del complesso, il palloncino viene lasciato sotto lenta agitazione per una notte a temperatura ambiente.

Infine il prodotto formatosi viene raccolto tramite filtraggio sotto vuoto, il filtrato viene poi lavato con acqua, etanolo ed etere freddi. Dopo i lavaggi il solido giallo viene raccolto e posto in essiccatore per una notte.

Il prodotto seccato viene pesato, si ottengono 88.36 mg di  $PtCl_2(DACH)$  da cui risulta una resa del 96%.

Il complesso viene caratterizzato tramite analisi elementare CHN ed analisi  $^1H$ -NMR.

Analisi elementare per  $PtCl_2(DACH)$ :

Teorica: C: 18.96%, H: 3.71%, N: 7.37%.

Sperimentale: C: 18.84%, H: 3.66%, N: 7.30%.

$^1H$ -NMR,  $\delta$  ppm (DMF- $d_7$ , 400.13 MHz, 298 K): 2.45 (t,  $J = 8$  Hz, 2H); 2.21 (d,  $J = 12$  Hz, 2H); 1.52 (m, 4H); 1.16 (m, 2H).

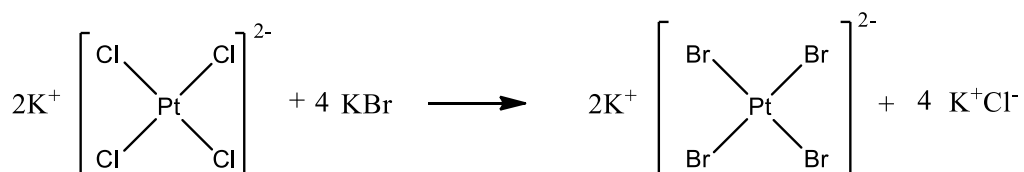


### 5.2.2 Sintesi di PtBr<sub>2</sub>(DACH)

Per la sintesi del complesso PtBr<sub>2</sub>(DACH) sono stati utilizzati il tetrabromoplatinato di potassio, K<sub>2</sub>PtBr<sub>4</sub>, (a sua volta sintetizzato a partire dal cloro derivato) e diamminocicloesano; secondo lo schema di reazione riportato in *fig. 5.4*.

Inizialmente sono stati pesati 99.9 mg di K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> ( $2.41 \times 10^{-4}$  mol, M.W. 415.09 g/mol) solubilizzati in 1.5 mL di acqua milli-Q, questa soluzione è stata trasferita in un palloncino di reazione (coperto con alluminio per evitare reazioni di degradazione) posta sotto agitazione magnetica e riscaldata tramite bagno ad acqua a circa 50 °C.

Sono stati poi pesati 117.7 mg di KBr ( $9.64 \times 10^{-4}$  mol, M.W. 119.01 g/mol, rapporto stechiometrico 4:1 con K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>) e solubilizzati in 2 mL di acqua milli-Q, questa soluzione è stata poi trasferita a piccole aggiunte nel palloncino di reazione contenente K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>. Per ottenere la sostituzione quantitativa dei leganti cloruro con quelli bromuro, come mostrato in *fig. 5.3*.



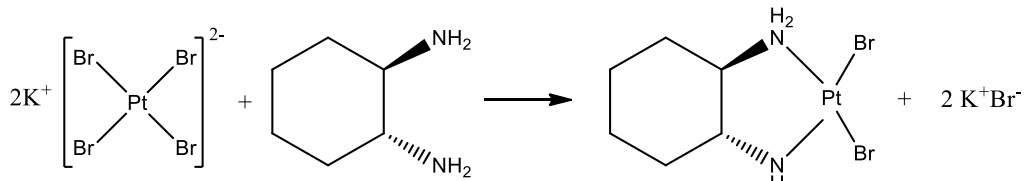
**Fig. 5.3.** Sintesi del complesso K<sub>2</sub>PtBr<sub>4</sub>.

Dopo 5 minuti è stato tolto il riscaldamento ed applicato un setto di gomma al palloncino (per mantenere l'ambiente di reazione inerte), in questo frangente si osserva una colorazione rosso bruno della soluzione.

Abbiamo proceduto come segue, mantenendo la soluzione sotto agitazione a temperatura ambiente, sempre mantenendo il palloncino coperto.

Sono stati pesati 27.2 mg di DACH, ( $2.41 \times 10^{-4}$  mol, M.W. 114.19 g/mol, rapporto stechiometrico 1:1 con il complesso di platino), solubilizzati in 2 mL di acqua milli-Q e trasferiti in una siringa di vetro. La soluzione è stata lentamente aggiunta nell'arco di un'ora alla soluzione acquosa di K<sub>2</sub>PtBr<sub>4</sub>,

questo per evitare reazioni indesiderate come quella di polimerizzazione dell'ammina catalizzata dalla presenza del bromo.



**Fig. 5.4.** Sintesi del complesso  $PtBr_2(DACH)$ .

A questo punto la soluzione presenta una colorazione giallo paglierino, questa viene lasciata sotto agitazione all'incirca per due ore, trascorso questo tempo si nota la presenza di un precipitato giallo, quindi si mantiene sotto lenta agitazione per una notte per avere la completa precipitazione dei cristalli gialli del complesso  $PtBr_2(DACH)$ .

Infine i cristalli ottenuti vengono filtrati con pompa a vuoto, lavati con acqua milli Q, con etere etilico ed etanolo freddi. Dopo questi lavaggi viene raccolto il solido giallo chiaro depositato nel filtro e posto in essiccatore. Una volta essiccato il solido si procede alla pesata, da cui si riscontra una resa del 70.23%, avendo ottenuto 79.27 mg di prodotto.

Questo viene poi caratterizzato tramite analisi elementare CHN ed analisi  $^1H$ -NMR.

Analisi elementare per  $PtBr_2(DACH)$ :

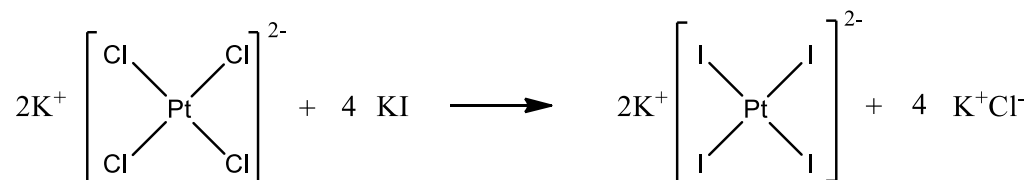
Teorica: C: 15.36%, H: 3.01%, N: 5.97%.

Sperimentale: C: 16.50%, H: 3.14%, N: 6.30%.

$^1H$ -NMR,  $\delta$  ppm (DMF-d<sub>7</sub>, 400.13 MHz, 298 K): 2.50 (t, J = 8 Hz, 2H); 2.23 (d, J = 12 Hz, 2H); 1.56 (m, 4H); 1.15 (m, 2H).

### 5.2.3 Sintesi di $PtI_2(DACH)$

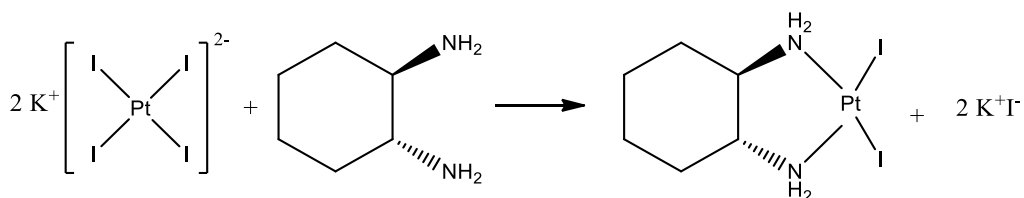
La sintesi del complesso  $PtI_2(DACH)$  è stata realizzata partendo sempre da  $K_2PtCl_4$ , nel primo step di reazione vengono sostituiti i leganti cloruro con quelli ioduro (*fig. 5.5.*), infine nel secondo step viene aggiunto diamminocicloesano per avere il prodotto finale (*fig. 5.6.*).



**Fig. 5.5** Sintesi del complesso  $K_2PtI_4$ .

Sono stati pesati 99.3 mg di  $K_2PtCl_4$  ( $2.4 \times 10^{-4}$  mol, M.W. 415.09 g/mol) e solubilizzati con 1.5 mL di acqua milli-Q in un palloncino da reazione, che è stato poi coperto con alluminio. Nel primo step la reazione è stata effettuata ad una temperatura di poco inferiore ai 50 °C (tramite un bagno ad acqua) e sotto agitazione magnetica. Per ottenere una sostituzione quantitativa dei leganti cloruro con quelli ioduro è stato utilizzato un rapporto 1:4 di complesso nei confronti dello ioduro di potassio. Quindi sono stati pesati 158.7 mg di KI ( $9.4 \times 10^{-4}$  mol, M.W. 166.01 g/mol), solubilizzati in 2 mL di acqua milli-Q ed aggiunti alla soluzione di  $K_2PtCl_4$  contenuta nel palloncino di reazione. Dopo 5 minuti viene tolto il riscaldamento ed il palloncino viene chiuso con un setto di gomma.

Nel frattempo vengono pesati 27.3 mg di DACH ( $2.4 \times 10^{-4}$  mol, M.W. 114.19 g/mol, rapporto stechiometrico 1:1) e solubilizzati in 2 mL di acqua milli-Q. La soluzione ottenuta viene trasferita in una siringa, tramite la quale si procede all'aggiunta graduale della soluzione di DACH nel palloncino di reazione. Ad aggiunte concluse si nota la presenza di un precipitato giallo, per cui si lascia il palloncino sotto lenta agitazione per una notte a temperatura ambiente così da permettere la completa precipitazione dei cristalli del complesso.



**Fig. 5.6.** Sintesi del complesso  $PtI_2(DACH)$ .

Il prodotto di reazione viene poi filtrato con pompa a vuoto, lavando il filtrato con acqua milli-Q, etanolo ed etere freddi. Una volta prelevato il solido viene messo in essiccatore; si procede inseguito alla pesata, da cui otteniamo 135.5 mg di prodotto, quindi una resa dell'81%.

Il prodotto viene caratterizzato tramite analisi elementare CHN ed analisi  $^1H$ -NMR.

Analisi elementare per  $PtI_2(DACH)$ :

Teorica: C: 12.8%, H: 2.32%, N: 4.98%.

Sperimentale: C: 12.5%, H: 2.32%, N: 4.86%.

$^1H$ -NMR,  $\delta$  ppm (DMF-d<sub>7</sub>, 400.13 MHz, 298 K): 2.50 (t,  $J = 8$  Hz, 2H); 2.23 (d,  $J = 12$  Hz, 2H); 1.56 (m, 4H); 1.15 (m, 2H).

### 5.3. Preparazione dei complessi $PtCl_2(DACH)$ , $PtBr_2(DACH)$ e $PtI_2(DACH)$ per analisi UV-Vis

La stabilità e la costante cinetica di idrolisi dei complessi  $PtCl_2(DACH)$ ,  $PtBr_2(DACH)$  e  $PtI_2(DACH)$  sono state valutate attraverso l'analisi spettrofotometrica UV-Vis, in cui viene monitorata l'assorbanza dei campioni nel range di lunghezze d'onda tra 200 e 800 nm, per 72 h a 25 °C.

I complessi di platino sono stati disciolti nel tampone fosfato 50 mM, pH=7.4 (operazione difficile per il bromo-analogo a causa dalla sua scarsa solubilità)

per avere una soluzione con concentrazione  $10^{-4}$  M, da cui se ne preleva 1 mL per l'analisi spettrofotometrica.

Inizialmente è stato registrato uno spettro del bianco, cioè del tampone fosfato, in seguito sono stati registrati gli spettri dei campioni riportati nel *paragrafo 3.1.1*.

Le misure sono state effettuate con uno spettrofotometro UV-Vis a singolo raggio Cary Varian 50 Bio dotato di lampada allo xeno all'interno del quale, i nostri 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, ad una velocità pari a 400 nm/min.

## 5.4. Preparazione dei campioni per determinazione logP

Il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, logP, riassume in sé le caratteristiche intrinseche di affinità con i solventi polari o apolari, che vengono abitualmente indicate come idrofilicità e lipofilicità. Il coefficiente di lipofilicità riportato è definito come il logaritmo del rapporto tra la concentrazione del complesso in ottanolo e la concentrazione del complesso nella fase acquosa.

$$\log P = \log \frac{[\text{complesso}]_{\text{oct}}}{[\text{complesso}]_{\text{wat}}}$$

Questo coefficiente è stato determinato utilizzando il metodo *shake flask* modificato secondo quanto riportato di seguito.

Una miscela bifasica di acqua milli-Q (50 mL) ed ottanolo (50 mL) viene agitata per 72 h affinché si abbia una completa saturazione di entrambe le fasi. Vengono quindi preparate le soluzioni dei complessi  $\text{PtCl}_2(\text{DACH})$ ,  $\text{PtBr}_2(\text{DACH})$  e  $\text{PtI}_2(\text{DACH})$  a concentrazione  $10^{-3}$  M, solubilizzando i campioni in 3 mL di fase acquosa (satura di ottanolo), in seguito viene aggiunto un uguale volume di

ottanolo (saturo di acqua). Le soluzioni vengono miscelate per 10 minuti ed in seguito poste in centrifuga per 5 minuti a 6000 rpm per permettere la separazione delle due fasi.

Si preleva 1 mL di entrambe le fasi per ciascuna soluzione, a cui si aggiunge un uguale volume di acqua regia (HCl:HNO<sub>3</sub> 3:1) e si porta fino ad un volume di 2.5 mL aggiungendo acqua milli-Q. Queste soluzioni vengono mantenute ad una temperatura di circa 90 °C per 24 h, affinché si abbia completa mineralizzazione del platino (al fine di evitare interferenze da parte dei leganti nella successiva analisi ICP). Si determina quindi la concentrazione del complesso nelle due fasi tramite analisi spettrofotometrica ICP-OES.

Le misure sono state effettuate con lo strumento Varian 720-ES Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES) equipaggiato con un nebulizzatore ultrasonico CETAC U5000 AT+. Per quanto riguarda le condizioni operative dello strumento, il flusso esterno di argon è stato iniettato a 16.5 L/min, mentre quello ausiliario a 1.50 L/min, invece il flusso di introduzione dei campioni è stato impostato a 1 mL/min.

Per la determinazione della concentrazione del platino è stata registrata l'assorbanza alle righe di emissione caratteristiche alle lunghezze d'onda 214.423 nm e 265.945 nm.

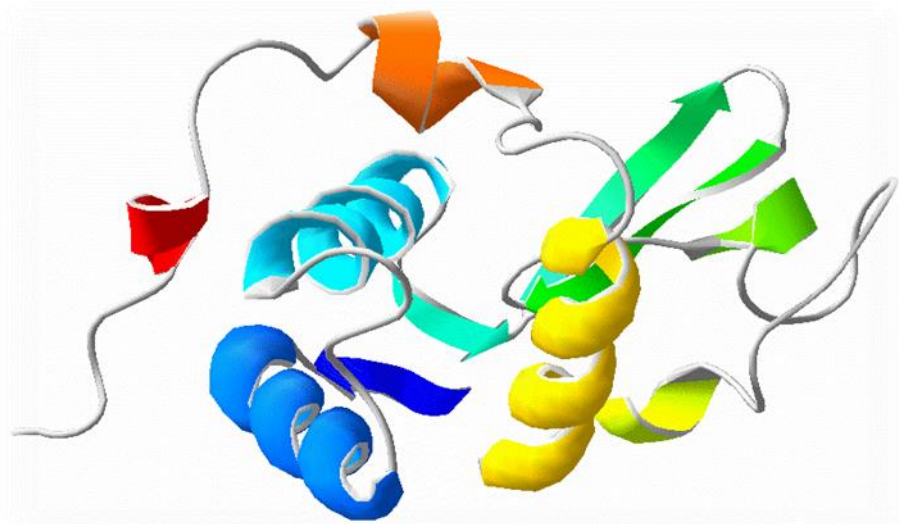
Risultati riportati nella *sezione 3.1.3*.

## **5.5. Preparazione dei campioni per spettrometria di massa**

Per verificare la formazione di addotti tra i complessi e proteine modello e tra complesso ed oligonucleotide è stata utilizzata la spettrometria di massa ad alta risoluzione. Nello specifico come proteine ed oligonucleotide modello sono stati utilizzati:

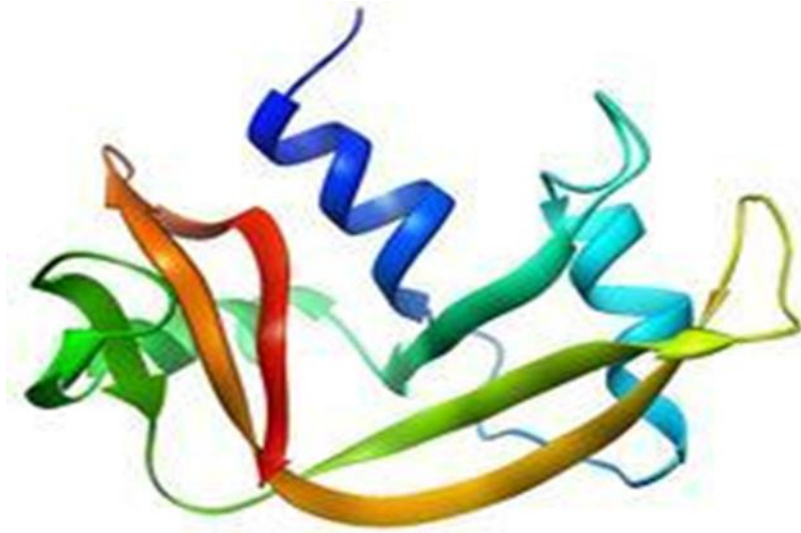
- Lisozima (14304.8 Da), il campione utilizzato è della tipologia HEWL (Hen Egg White Lysozyme). È un enzima presente nei tessuti animali,

dotato di attività battericida, abbondantemente presente in numerose secrezioni animali ed umane, come ad esempio le lacrime e la saliva; si trova anche in concentrazioni elevate nell'albume dell'uovo. Data la sua massa ridotta e l'abbondanza di siti carichi positivamente su di esso, il lisozima risulta adatto ad analisi di tipo ESI-MS. Inoltre possedendo la caratteristica di formare cristalli con relativa facilità, risulta essere un modello ideale per studiare la geometria degli addotti metallo farmaco-proteina mediante diffrazione a raggi X.



**Fig. 5.7.** *Rappresentazione della struttura del lisozima.*

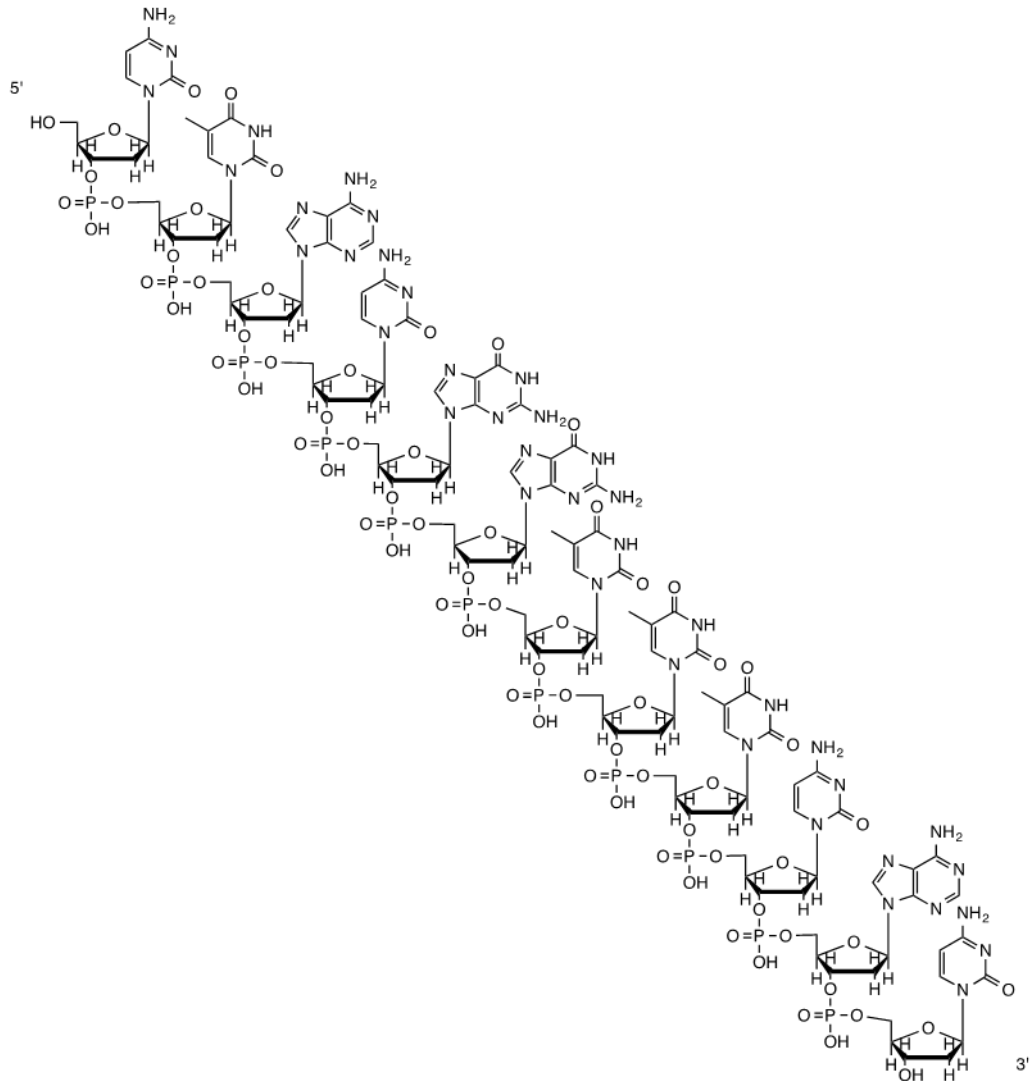
- Ribonucleasi A (13681 Da) è un enzima appartenente alla classe delle idrolasi, che degradano l'RNA idrolizzando i legami fosfodiesterici liberando oligo- e mononucleotidi. Nello specifico, le RNasi svolgono la funzione di regolarizzazione della produzione di proteine in quanto, sono in grado di degradare i filamenti di m-RNA.



**Fig. 5.8.** *Rappresentazione della struttura della ribonucleasi.*

- ODN2 (3596 Da) è un oligonucleotide di DNA costituito da 12 nucleotidi di sequenza 5'--CTACGGTTTCAC--3'. È stato impiegato per valutare l'efficacia del complesso metallico nel formare addotti con un frammento di DNA, il quale subisce una deformazione che ne impedisce la replicazione.





**Fig. 5.9.** Rappresentazione della sequenza dell'oligonucleotide impiegato.

A partire da soluzioni stock di proteine ed oligonucleotide  $10^{-3}$  M in acqua milli-Q, le soluzioni dei complessi PtCl<sub>2</sub>(DACH), PtBr<sub>2</sub>(DACH) e PtI<sub>2</sub>(DACH) in tampone ammonio acetato 20 mM pH=6.8 sono state incubate con proteina ed oligonucleotide a 37 °C per 24, 48 e 72 h. Poiché il bromo-analogo risultava poco solubile nel tampone è stata aggiunta, alla soluzione, una piccola aliquota di solvente organico, il dimetilsolfossido.

Nelle soluzioni finali le proteine e l'ODN2 avevano una concentrazione di  $10^{-4}$  M, mentre per quanto riguarda il complesso, questo aveva una concentrazione  $3 \cdot 10^{-4}$  M (rapporto stechiometrico 1:3). Per aumentare la possibilità di interazione del complesso, questo è stato impiegato in eccesso, in particolare con una concentrazione tre volte maggiore rispetto a quella

della proteina, mentre con l'oligonucleotide era in rapporto stechiometrico 1:2.

Le acquisizioni degli spettri di massa dei nostri 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. La necessità di una fonte di ionizzazione estremamente soft, in grado quindi di limitarsi a caricare le specie proteiche analizzate, ha portato all'adozione di un sistema ESI (*electrospray ionization*).

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.

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.

Spettri e relativi risultati riportati nella *sezione 3.2*.

## 5.6. Preparazione dei campioni per misure di IC<sub>50</sub>

L'IC<sub>50</sub> indica la concentrazione di farmaco che produce un effetto tale da causare il dimezzamento delle cellule vitali entro un certo tempo prestabilito (nel nostro caso a 24 h dall'inizio dell'esposizione al farmaco). Il protocollo sperimentale di valutazione della citotossicità di un farmaco è finalizzato, in questo caso, alla determinazione dei valori di IC<sub>50</sub> dei tre complessi sintetizzati riferiti alle linee cellulari umane di carcinoma del colon-retto HCT116, HCT8 e

HT29 e ad un controllo, nel caso specifico, HEK293, ovvero cellule umane renali sane.

Per la determinazione dell'IC<sub>50</sub> sono stati preparati dei cluster da 96 pozzetti, contenenti un numero di campioni di cellule su cui verificare l'effetto citotossico dei farmaci tale da ottenere sette diverse condizioni sperimentali che corrispondono a sei diverse concentrazioni standard dei farmaci più il controllo, ciascuna delle quali viene eseguita in duplicato. Per ciascun pozzetto sono stati preparati dei campioni di 100 µL, contenenti ciascuno un numero di cellule iniziale pari a 10<sup>4</sup>.

L'esperimento di citotossicità si suddivide in 3 giorni, i quali comprendono una fase di preparazione delle cellule, una fase di trattamento delle cellule con il farmaco a diverse concentrazioni ed una fase di smontaggio dell'esperimento. Partendo da una piastra di mantenimento sono state prelevate delle aliquote opportune di cellule, ciascuna contenente il numero iniziale richiesto, ognuna è stata depositata in un diverso pozzetto del cluster e lì diluita con il terreno di coltura RPMI 1640 in modo da ottenere il volume finale di 100 µL (il terreno utilizzato deve essere privo di antibiotici ed antifungini dato che potrebbero interferire con l'attività del farmaco). Il cluster così preparato è stato incubato per 24 h a 37 °C in ambiente umidificato contenente una percentuale di CO<sub>2</sub> pari al 5%.

Successivamente sono stati pesati 3.18 mg di PtCl<sub>2</sub>(DACH), 3.92 mg di PtBr<sub>2</sub>(DACH) e 4.71 mg di PtI<sub>2</sub>(DACH) con i quali sono state preparate tre soluzioni acquose stock con concentrazione 1 mM. Partendo da queste sono state poi ricavate sei soluzioni da ciascun farmaco a concentrazione 200 µM, 100µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM, diluendo con il terreno RPMI 1640. Concluse le prime 24 h di incubazione il terreno in cui sono stati tenuti i campioni è stato sostituito con 100 µL delle soluzioni diluite del farmaco; per il pozzetto di controllo si è proceduto esclusivamente alla sostituzione del terreno presente con terreno RPMI 1640 nuovo. Si lascia il cluster nuovamente in incubazione per 24 h nelle medesime condizioni ambientali.

Infine si procede con la fase di distacco delle cellule mediante soluzione di tripsina 1x (50 µL per ciascun pozzetto) ed alla conta vitale di ogni campione cellulare con il Trypan blue. La conta delle cellule vitali viene effettuata tramite l'utilizzo della camera di Burker, costituita da un vetrino rettangolare con lati di 7.5 cm e 3.5 cm e spessore 4 mm. Tale strumento presenta due

celle contenenti ciascuna un reticolo di conta, composto da 9 quadrati di lato 1 mm delimitati fra di loro da 3 righe parallele. Le celle vengono coperte da un vetrino copri-oggetto fissato da due morsetti laterali, che ricopre i due reticoli lasciando uno spazio fra camera e vetrino per l'introduzione del campione di cellule da analizzare. Prima di caricare il campione nelle celle è necessario diluire la sospensione cellulare con una soluzione di Trypan blue, che serve per colorare selettivamente le cellule morte, consentendo la distinzione con quelle vive; quindi si caricano 10  $\mu$ L di sospensione cellulare in ciascuna cella. Per il conteggio delle cellule è necessario porre la camera di Burker sul piatto di un microscopio ottico con il quale vengono visualizzati i reticoli delle celle. Per ciascuno di questi si effettua la conta delle cellule in almeno 3 dei 32 quadrati delimitati dalle 3 linee parallele scelti a seconda della distribuzione delle cellule. Per ciascun quadrato vengono conteggiate sia le cellule contenute nei 16 quadrati piccoli che quelle presenti in due dei lati formati dalle 3 righe parallele delimitanti il quadrato grande, dove la scelta dei lati è arbitraria ma deve rimanere la stessa per tutti i quadrati analizzati. Quindi si ricava il numero di cellule presenti in 1 mL di sospensione cellulare tramite l'equazione:

$$\text{Cellule/mL} = N \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

Dove N indica la media del numero di cellule fra i quadrati grandi considerati, mentre il fattore di diluizione può essere dedotto dalla quantità di Trypan blue utilizzato per diluire il campione. I dati della conta vitale vengono quindi riportati su foglio Excel, da qui vengono calcolate tramite le rispettive funzioni, il numero medio di cellule relative ad ogni concentrazione testata, la media normalizzata per il controllo, l'errore standard sulla media e l'effetto relativo ad ogni concentrazione (la percentuale di cellule morte rispetto al controllo). La colonna relativa alle concentrazioni del farmaco e quella relativa all'effetto vengono riportate sul foglio di lavoro di Calculusyn, il software elaborato da Chou e Talalay, eseguirà un *fitting* dei dati sperimentali ottenuti secondo un modello assimilabile a quello mediante *fitting* con equazione di Hill. Verranno quindi forniti il valore di IC<sub>50</sub>, l'intervallo di confidenza al 95% all'interno del quale esso è determinato, ed il parametro "R", indicante la

bontà del modello matematico applicato ad i dati ottenuti. L'analisi condotta è stata considerata valida solo con  $R \geq 0.85$ .

I risultati sono discussi nel *paragrafo 3.3*.