



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Scuola di Scienze Matematiche,  
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica  
Curriculum in Tecnologie Chimiche

# **Sintesi, caratterizzazione e interazione con proteina modello di un nuovo Au(I)-Carbene.**

# **Synthesis, characterisation and interaction with model protein of new Au(I)-Carbene.**

**Relatore**  
Luigi Messori

**Correlatore**  
Lara Massai

**Candidato**  
Enrico Corlianò

Anno Accademico 2014/2015

## **Indice generale**

### **1. INTRODUZIONE**

#### **1.1 Complessi metallici in medicina**

#### **1.2 Platino**

#### **1.3 Oro**

#### **1.4 Proteine come possibili target farmacologici**

##### **1.4.1 Tioredossina**

##### **1.4.2 Atox1**

#### **1.5 Metallo carbeni e complessi eterociclici**

##### **1.5.1 Struttura e caratteristiche generali degli n-eterociclo carbeni**

### **2. SCOPO**

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Materiali**

#### **3.2 Metodi e strumentazione**

##### **3.2.1 Spettroscopia Uv-Vis**

##### **3.2.2 Spettrometria di massa**

##### **3.2.3 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H-NMR}$ )**

#### **3.3 Procedura di sintesi**

##### **3.3.1 Preparazione Oro-Trifenilfosfina**

##### **3.3.2 Preparazione complesso Oro-Carbene (complesso EC)**

### **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

#### **4.1 Spettroscopia Uv-Vis**

##### **4.1.1 Stabilità del composto in Ammonio Acetato**

#### **4.2 Spettrometria di massa**

##### **4.2.1 Stabilità dei composti in $\text{CDCl}_3$**

**4.3 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H-NMR}$ )**

**4.3.1 Spettro Atox1 con Bromuro di etil-metil Imidazolo**

**4.3.2 Spettro Oro-Trifenilfosfina con Atox1**

**4.3.3 Spettro complesso EC con Atox1**

**5. CONCLUSIONI**

**6. BIBLIOGRAFIA**

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Complessi metallici in medicina

L'utilizzo di composti a base di metalli in ambito medico risale al XVI secolo, periodo a cui fanno riferimento documenti che testimoniano il ricorso a tali mezzi per il trattamento di casi di cancro. Attualmente molti metalli, trovano utilizzo in medicina; l'argento è usato come agente antimicrobico e gli oro complessi, sono tutt'ora gli unici in grado di fermare la degenerazione dell'artrite reumatoide. Un metallo che ha dato il via all'enorme utilizzo e sviluppo di farmaci antitumorali con base metallica è il platino<sup>1</sup>.

La scoperta relativa all'efficacia del cisplatino (CDDP), su cellule tumorali, è stata accidentale. Lo scienziato Barnett Rosenberg, durante uno dei suoi studi in laboratorio su batteri *Escherichia Coli*, si accorse che, residui di platino, dovuti a processi elettrolitici, attaccavano alcune cellule di quella colonia. che colpì Rosenberg, fu che il batterio ebbe una crescita in lunghezza ma non ebbe divisione cellulare. Successivamente furono fatte delle analisi chimiche in ambito un po' più generico e queste, evidenziarono due complessi molto attivi dal punto di vista biologico; Il cis-diamminotetracloroplatino (IV) e, il cis-diamminodichloroplatino (II) – Cisplatino. In realtà, il gruppo di ricercatori, aveva ritrovato un complesso di coordinazione già sintetizzato e descritto nel lontano 1845, noto come il cloruro di Peyrone. Nel 1968, a seguito di ulteriori prove contro vari batteri, il cisplatino è stato somministrato per via intraperitoneale a topi recanti tumore, e straordinariamente si osservò un regressione della massa tumorale.<sup>1,2</sup>

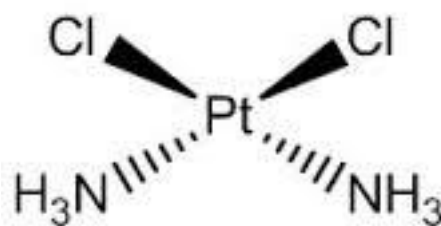


Fig.1 Cis-Platino

### 1.2 I complessi del Platino

Il Platino è un metallo che ha come stati di ossidazione principali il +2 e il +4; è però molto importante anche la chimica dello stato +1, dove rientrano in gioco i legami metallo-metallo, e quella nello stato di ossidazione 0, nella quale sono sempre coinvolti legami con CO, fosfine terziarie o altri leganti  $\pi$ -acidi.<sup>3</sup>

$Pt^{2+}, d8$

Lo ione  $Pt^{2+}$  forma generalmente complessi planari quadrati o pentacoordinati e

diamagnetici; del tipo, ad esempio,  $ML_4^{2+}$ ,  $ML_3X^+$ , cis e trans  $ML_2X_2$ ,  $MLX_3^-$  ed  $MX_4^{2+}$  in cui, X è un legante monovalente negativo ed L è un legante neutro. Il  $Pt^{2+}$  coordina preferenzialmente l'azoto, gli alogeni, il cianuro e gli atomi donatori pesanti (P, As, S e F). Il forte legame che si instaura tra gli atomi donatori pesanti è dovuto, in larga parte, alla formazione di legami metallo-legante di tipo  $\pi$  per sovrapposizione di orbitali pieni  $d\pi$  ( $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$ ) del metallo, con orbitali  $d\pi$  vuoti dei gusci di valenza dell'atomo pesante donatore. Anche gli ioni cianuro, i nitrogruppi e l'ossido di carbonio si coordinano impegnando legami  $\pi$ , che in questi casi derivano dalla sovrapposizione degli orbitali  $d\pi$  pieni del metallo con orbitali  $p\pi$  molecolari di antilegame vuoti dei leganti. In questi complessi si riscontra una notevole somiglianza tra Ni, Pd e Pt. I complessi di Pt (II) sono abbastanza più stabili rispetto agli analoghi complessi di Pd (II) ma, la maggior parte delle altre caratteristiche, sono simili. Grazie anche alla loro inerzia cinetica, i complessi di Pt (II) e Pt (IV), hanno avuto un ruolo molto importante nello sviluppo della chimica dei composti di coordinazione.

*Pt<sup>4+</sup>, d6*

Benchè siano noti composti di Pd (IV), essi generalmente sono meno stabili di quelli di Pt (IV). Il numero di coordinazione è sempre 6. Le reazioni di sostituzione sui complessi del Pt (IV), sono notevolmente accelerate dalla presenza di specie del Pt (II). Inoltre, questi composti in soluzione subiscono reazioni fotochimiche indotte dalla luce.

Tutte queste scoperte, hanno portato alla rinascita della chimica inorganica ed alla sintesi di nuovi complessi analoghi del Cis-Pt (II) ed ad un più approfondito studio degli elementi con caratteristiche simili, quali il Palladio e Oro. I primi trattamenti sull'uomo si verificarono in tempi notevolmente brevi, si parla infatti degli inizi anni 70'. Comunque, gran parte dei primi impegni nella progettazione di nuovi farmaci di Platino, mirava a rendere la terapia più sicura per i pazienti cercando di limitare gli imprevedibili effetti.

Un 'altro fattore importante riguarda il parametro della selettività. Questi complessi infatti, non distinguono le cellule sane dalle tumorali. Inoltre, dopo vari cicli di sottoposizione al complesso in questione, il tumore sviluppa una certa resistenza al farmaco, rallentando ed in certi casi di inibendo, l'azione di esso.<sup>1</sup>

*Come agisce il Cis-Platino?*

Attualmente ci sono prove evidenti riguardo al meccanismo di azione del complesso;<sup>4</sup> Il Cis-Platino reagisce grazie alla perdita di un Cloro, a favore della formazione di un legame di tipo covalente tra l'atomo metallico ed il DNA, formando poi degli addotti. Tutto ciò provoca dei meccanismi a cascata i quali portano all'attivazione di varie vie di trasduzione del segnale. Ancora oggi c'è un continuo dibattito su quale dei vari addotti platino-DNA, sia quello biologicamente più responsabile di questa attivazione. Questi addotti provocano varie azioni sul DNA, con il risultato finale di attivare il processo di

“apoptosi”. Con questo termine si indica una forma di morte cellulare programmata. Si tratta di un processo ben distinto rispetto alla necrosi cellulare, e in condizioni normali contribuisce al mantenimento del numero di cellule di un sistema. Possiamo a questo punto affermare che il Cis-Platino, è stato il farmaco che ha avuto il maggior impatto clinico riguardo al cancro, in particolare per pazienti affetti da tumori testicolari e ovarici.<sup>3</sup> Tuttavia, come già accennato in precedenza, vi è da segnalare la sua tossicità, riscontrata con particolare evidenza nei reni e nel tratto gastrointestinale. La prima necessità era dunque quella di ricercare composti analoghi con minori effetti collaterali senza pregiudicare l'attività antitumorale. A tal proposito, verso la metà degli anni 80', fu sintetizzato un composto chiamato Carbo-Platino, che presentava un gruppo uscente con diversa stabilità rispetto allo ione cloruro. Dopo numerosi studi clinici, si osservò che questo composto, rispetto al Cis-Platino, non presentava effetti nefrotossici pur mantenendone le stesse caratteristiche sia dal punto di vista di meccanismo che di efficacia. Nonostante ciò, moltissime altre forme tumorali erano in grado di sviluppare una certa resistenza all'azione di questi composti. Vi era dunque anche la necessità di capire come si sviluppava tale resistenza sia dal punto di vista biologico che chimico. In quel momento si fecero due ipotesi: La prima, riguardava una modifica quantitativa causata dalle cellule della massa tumorale, di addotti Platino-DNA che il complesso formava, rendendo così insufficiente l'azione di esso. La seconda invece, riguardava il mancato verificarsi del processo di apoptosi a causa del mancato accumulo di Platino nell'addotto con l'aumentare degli cicli di somministrazione del farmaco. Dal punto di vista chimico queste situazioni erano molto più difficili da spiegare perchè il processo stesso di azione antitumorale di questi complessi, non era del tutto definito ai tempi. Attualmente sappiamo che il Cis-Platino è un complesso altamente polare, ed entra nelle cellule in modo relativamente lento rispetto ad altre classi di molecole usate come farmaci contro il cancro. L'assorbimento di Cis-Platino è influenzato da fattori quali la concentrazione di ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , pH, e la presenza di agenti riducenti.

*Come si può instaurare un meccanismo di resistenza?*

Negli ultimi anni, è stato visto che un ruolo determinante per l'azione del Cis-Platino è svolto da un trasportatore di molecole all'interno della membrana plasmatica, il CTR1. L'abbassamento quantitativo di questo, si è rivelato essere responsabile di un conseguente aumento di circa 2-3 volte la resistenza al farmaco. Questo accade perché purtroppo, tra i responsabili di questo abbassamento vi sono vari metalli tra cui proprio il Platino.

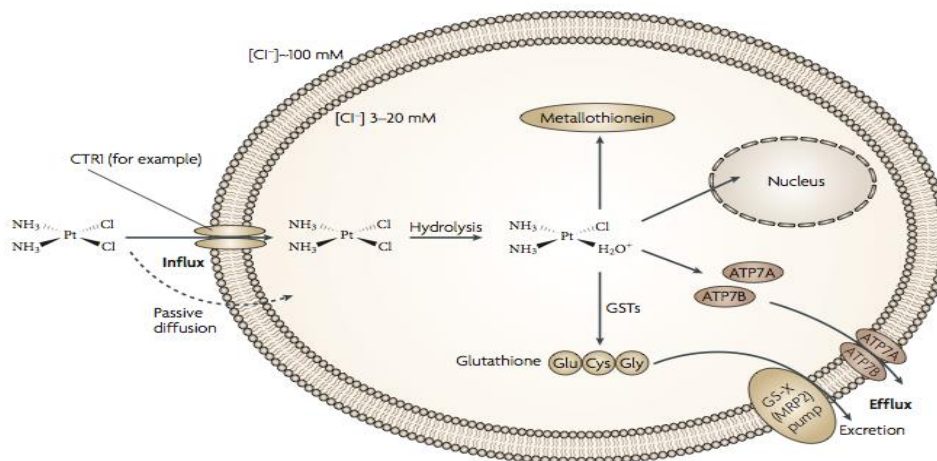


Fig.2 Schema meccanismo di resistenza

In questa rappresentazione grafica possiamo osservare come la resistenza del tumore ai farmaci Cis-Platino e Carbo-Platino sia mediata da livelli inadeguati di metallo che giungono al DNA. Ciò accade perché il Platino per entrare all'interno delle cellule, necessita dell'utilizzo di vari trasportatori. Uno ruolo significativo viene svolto dal CTR1. Una volta all'interno delle cellule tumorali, il complesso viene attivato mediante l'aggregazione di molecole d'acqua. Nel citoplasma, le specie acqua-attive reagiscono preferenzialmente con aminoacidi quali la cisteina e la metionina. Questo accade in virtù del fatto che essi contengono un atomo di Zolfo con il quale vi è una elevata affinità. Queste specie sono il Glutatione Tripeptide e/o metallothioneine generiche. A causa del fatto che, in alcune cellule tumorali resistenti al Platino, i livelli di queste specie sono elevati, il metallo è "rastrellato" nel citoplasma prima che possa andarsi a legare con il DNA. Si genera una resistenza indotta che andrà poi sommata ad una intrinseca, presente anche dopo che sono stati formati gli addotti di platino-DNA. La sopravvivenza cellulare può avvenire per varie cause, tra le principali possiamo nominare i processi di riparazione del DNA, la rimozione spontanea di addotti o i meccanismi di tolleranza generici. Attorno agli anni 90', vi è stato un calo riguardo allo sviluppo dei farmaci chemioterapici a base di platino perché nonostante fossero stati studiati molti altri composti, nessuno di essi, presentava sostanziali progressi rispetto al Cis-Platino e al Carbo-Platino. Per questo motivo, gli scienziati, si dovettero ingegnare, per trovare delle nuove strategie contro i meccanismi di resistenza ai farmaci.

Con l'inizio del nuovo millennio si arrivò a sintetizzare un composto nuovo,

sempre a base di Platino, che effettivamente apportava numerosi miglioramenti: l' Oxali-Platino.

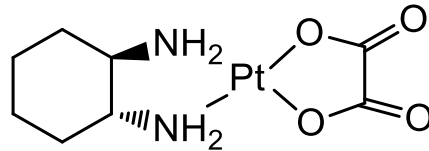


Fig.3 Oxaliplatino

Questo è un derivato più solubile in acqua rispetto al Cis-Platino, con diversa sensibilità e inoltre, il suo accumulo nella cellula tumorale, è meno dipendente dal trasportatore CTR1. Grazie al confronto diretto tra trattamenti con e senza Oxali-Platino, è stato osservato che questo composto, era efficace contro molti tipi di tumori in particolar modo con quelli in metastasi nel colon.

Dal Carbo-Platino e dal Cis-Platino, sono stati sviluppati altri composti molto importanti tra cui il Satra-Platino e il Pico-Platino.

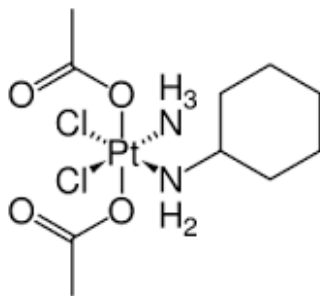


Fig.4 Satra-Platino

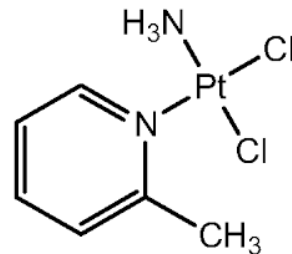


Fig.5 Pico-Platino

*Quali sono state le strategie per migliorare l' efficienza farmacologica?*

Una strategia adottata è stata quella di utilizzare agenti per il trasporto del composto farmacologico, direttamente nella cellula tumorale. Tutto ciò può essere stato favorito anche dall' utilizzo sinergico di copolimeri maggiormente biocompatibili, come ad esempio l' idrossipropil-metacrilammide (HPMA). Questa terapia di combinazione farmaco-copolimero sta prendendo ampio campo anche se l'effettiva efficacia non è comparabile con l' attività monoterapica, ma è comunque molto importante per la minore citotossicità.



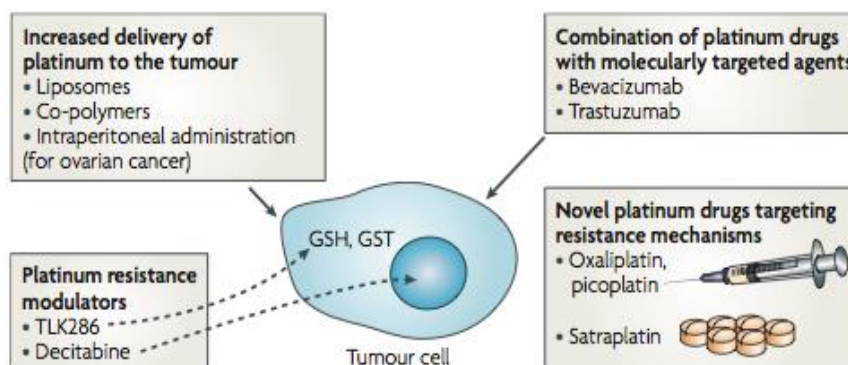


Fig. 6 Schema di strategia contro un meccanismo resistenza

### 1.3 I complessi dell' Oro

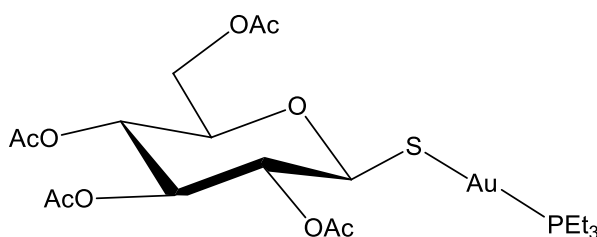


Fig. 7 Auranofin

Dopo l'introduzione di auranofin in clinica per il trattamento dell' artrite reumatoide (1985) e la scoperta delle sue proprietà antiproliferative in vitro, i composti dell' Oro, sono stati valutati come una possibile fonte di nuovi e più efficaci farmaci antitumorali con base metallica. Questo interesse è stato anche alimentato, dalla constatazione che tali complessi di solito, manifestano un profilo farmacologico molto diverso rispetto ai già consolidati farmaci antitumorali di Platino<sup>5</sup>

In passato è stato dimostrato che gli effetti citotossici dell' Oro sul DNA sono minori rispetto ai complessi di Platino; ciò è dovuto, probabilmente, sia alla diversa natura del metallo, che al diverso meccanismo di azione. (l' Oro ha la capacità di formare legami metallo-metallo molto forti). Inoltre, un altro fattore positivo si può ritrovare in ambito ossido riduttivo; l' Oro di per se è abbastanza stabile, ma con leganti forti può facilmente cambiare stato di ossidazione. Sono stati studiati in particolare gli stati di ossidazione 1 e 3 in soluzione, ed è stato visto che il cambiamento può avvenire anche in base alle condizioni fisiologiche.<sup>3,4</sup> Come abbiamo già anticipato, i principali stati di ossidazione dell' Oro sono  $Au^+$ ,  $Au^{3+}$  e  $Au^0$ .

## $Au^+$ , $d10$

Lo ione  $Au^+$  esiste linearmente coordinato (sistema in cui si trova principalmente), tricoordinato e tetracoordinato. E' un catione soft, quindi preferisce leganti soft come  $CN^-$ , tioli e alogeni. In medicina sono importantissimi i medicinali Aurotiomalato, Aurotioglucosio ed il già citato farmaco Auranofin, un composto che è stato sviluppato in ambito chemioterapico grazie all'evoluzione dei precedenti complessi  $Au^+$ . Le soluzioni acquose di questi composti sono state intensamente investigate e ci indicano che i leganti tiolati, sono solitamente più labili rispetto ai leganti fosfinici. Le specie cationiche in soluzione, si dimostrano essere fortemente reattive sulle biomolecole. Studi voltammetrici,<sup>6,7</sup> hanno evidenziato che Auranofin e più in generale i composti d' Oro, hanno un potenziale sufficientemente elevato, per poter garantire una facile riduzione, all' interno dell' ambiente cellulare.

## $Au^{3+}$ , $d8$

La geometria più frequente è quella planare quadrata tetraedrica. La lunghezza dei legami di  $Au^{3+}$  è minore rispetto a quella dell'  $Au^+$ . I complessi penta ed esacoordinati si ritrovano con lunghezze dei legami assiali più lunghi. Il comportamento dal punto di vista reattivo dei complessi di  $Au^{3+}$  è *borderline*, nel senso che mostra sia una preferenza per i leganti di tipo soft ma anche per elementi più hard come l' Azoto. Lo stato di ossidazione (III) dell' Oro, è fortemente ossidante a meno che non sia stabilizzato dai leganti nominati sopra. I composti di nostro interesse dell'  $Au^{3+}$  possono essere raggruppati in quattro classi principali:

### 1) Complessi mononucleari di $Au^{3+}$

I classici complessi mononucleari di  $Au^{3+}$ , sono planari quadrati con ligandi tipici quali alogenuri e azoto. (ad esempio  $AuCl_4^-$ ,  $[Au(Dien)Cl]Cl_2$ ,  $[Au(Cyclam)](ClO_4)_2$ ,  $[Au(Phen)Cl_2]Cl$ )<sup>8</sup>. I leganti azotati inducono una significativa stabilizzazione dei complessi  $3+$ , mentre gli alogenuri, avendo interazioni più deboli con i complessi di  $Au^{3+}$ , fanno sì che questi, si attivano più facilmente in ambiente acquoso.

### 2) $Au^{3+}$ Porfirine

Il legante porfirina, stabilizza notevolmente l' oro posto al centro di questi complessi diminuendo drasticamente la sua reattività ossido-riduttiva.<sup>9</sup> E' stato ipotizzato che il target primario per questi complessi, sia il DNA anche se studi recenti, hanno evidenziato interazioni con funzioni mitocondriali.<sup>10</sup>

### 3) Composti organometallici di $Au^{3+}$

Sono caratterizzati da almeno un legame diretto Oro-Carbonio e tutto questo è

causa di una stabilizzazione dell'Oro con numero di ossidazione 3+. Inoltre questi complessi, sono stabili in condizioni fisiologiche e risultano essere significativamente tossiche in linee cellulari tumorali umane <sup>11</sup>

#### 4) Complessi dinucleari di Au<sup>3+</sup>

Questi composti contengono un motivo strutturale comune che consiste in un Au<sub>2</sub>O<sub>2</sub> "diamond core" collegato a due leganti bipyridinici, in una disposizione approssimativamente planare [auxo6]. Questi composti hanno recentemente mostrato stabilità apprezzabile sotto condizioni simil-fisiologiche e manifestato importanti effetti antiproliferativi verso linee cellulari tumorali umane.

*Come agiscono e quali conseguenze hanno i complessi dell'Oro sul metabolismo umano?*

Pochi dati sono disponibili per quanto riguarda il metabolismo dei composti di Au<sup>+</sup>, Au<sup>3+</sup> e più in particolare, la loro distribuzione intracellulare ed il loro destino. A causa della elevata affinità dell'atomo di Au<sup>+</sup> per leganti, quali Zolfo e Selenio, proteine recanti catene laterali accessibili quali cisteina, metionina o selenocisteina, costituiscono bersagli preferenziali per i composti di Au<sup>+</sup>. Tuttavia, sono possibili anche coordinazioni con gruppi meno semplici come l'imidazolo e l'istidina. Farmaci Oro(I) - tiolici e Oro(I) - fosfinici sono in grado di reagire con il tripeptide glutatione o con proteine come l'albumina e metallotioneine.

Grazie ai numerosi studi in vitro che sono stati condotti su composti di Oro negli ultimi dieci anni sono state formulate una serie di ipotesi sulle loro possibili modalità di azione. Tuttavia, i meccanismi molecolari responsabili dei loro effetti biologici sono in gran parte ancora sconosciuti. Comunque, i risultati ottenuti in questi anni, ci hanno dato la possibilità di identificare le probabili cause, al riguardo della citotossicità di questi composti all'interno del corpo umano. In particolare, sono stati ipotizzati danni diretti al DNA, modifiche del ciclo cellulare, danni mitocondriali, inibizione del proteasoma e la modulazione di chinasi specifiche. Nel complesso, da studi meccanicistici finora effettuati è stato possibile definire tre classi principali per questi complessi, secondo la loro modalità di azione su bersagli biologici.

- 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 grandi 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 redox (come ad esempio Auoxo6).

## 1.4 Proteine come possibili target farmacologici

E' possibile che i relativi effetti citotossici indotti da composti d' Oro, possano derivare dalla loro capacità di interferire con i vari processi cellulari e i vari bersagli biologici. Uno dei target principali per i composti di Au, sono le proteine.<sup>3,12</sup>

### 1.4.1 Tioredossina

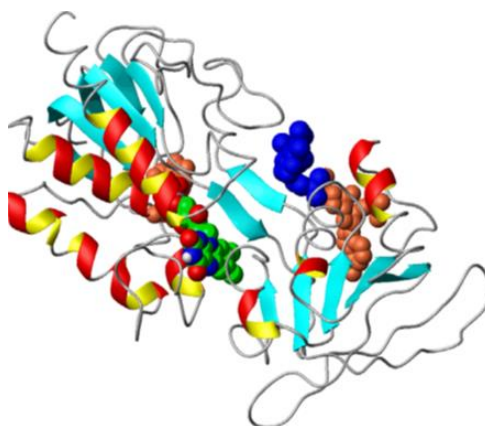


Fig. 8 Tioredossina

Una menzione particolare va fatta per la TIOREDOSSINA (trx), una piccola proteina composta da 105 amminoacidi, che funge da maggiore arma antiossidante in molti tipi di cellule. Possiede inoltre, proprietà enzimatiche legate ai cicli di ossidoriduzione e potrebbe essere in grado di spiegare le alterazioni delle funzioni mitocondriali osservate durante i trattamenti con Oro composti. La tioredossina reduttasi (trxR) rappresenta uno dei pochi enzimi, esistenti in natura, in grado di possedere all' interno della propria struttura, un atomo di Selenio, sotto forma dell'amminoacido seleno-cisteina (SeCys). Questo residuo, è il penultimo della sua struttura amminoacidica ed è preceduto da una cisteina; la genesi controllata di una TRX troncata negli ultimi tre amminocidi (-Cys-SeCys-Gly), produce un enzima che non è funzionale, nonostante che il dominio contenente NADPH2, non venga affatto condizionato. Per questo motivo, la sua attività enzimatica, è anche fortemente compromessa negli animali, con carenze di Selenio. Tra le varie funzioni che la tioredossina svolge nella cellula vi è la riduzione di ribonucleotidi per la sintesi del DNA attraverso l' enzima ribonucleotide reduttasi (RR) e per le specie reattive dell'ossigeno (ROS) . Inoltre, è in grado di ridurre, e quindi attivare, fattori di trascrizione che sono tutti coinvolti nella regolazione di vari aspetti della crescita e la sopravvivenza cellulare, tra cui NF-kB, AP-66 1,67 SP-1, e p53. I livelli di espressione della tioredossina citosolitica (TRX1) sono

aumentati al verificarsi di diversi carcinomi umani, e sono legati a fattori che coinvolgono l' aggressività del tumore, e di inibizione della apoptosi. Per tali motivazioni, vi è grande interesse per il sistema tioredossina, in quanto potrebbe rivelarsi un eccellente bersaglio per nuovi farmaci antitumorali sia Oro (I) che Oro (III).

#### 1.4.2 Atox

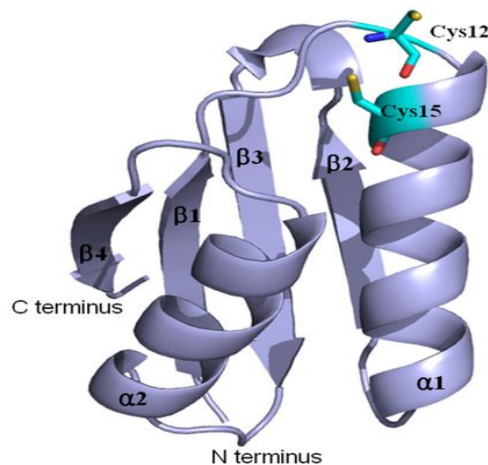


Fig. 9 Atox

E' una proteina citoplasmatica coinvolta nei processi di endocitosi dello ione  $\text{Cu}^+$ . In particolare la funzione di quest'enzima si esplica con il trasporto degli ioni del rame dal citoplasma alle proteine ATPasi presenti nella faccia trans dell'apparato del golgi. Attraverso la sua struttura l'Atox presenta funzioni di antiossidante nei confronti dei componenti ROS presenti nell'organismo. È una molecola difficile da trattare in ambienti esterni alla cellula in quanto la presenza di gruppi di cisteina richiede l'imposizione di un ambiente riducente per evitare la formazione di ponti disolfuro. (forma ossidata). Studi recenti hanno evidenziato che tutte queste proteine adibite al trasporto degli ioni rame, interagiscono con complessi oro carbenici. Uno di questi studi ha analizzato l'interazione tra Atox1 e tre composti di Oro quali Auxo6,  $\text{Au}_2\text{phen}$  ad Aubypic e Auranofin. I risultati ottenuti hanno confermato che i composti d' Oro di questo tipo, interferiscono con il sistema di trasporto del rame a livello intracellulare e questa osservazione, contiene evidentemente numerose implicazioni dal punto di vista farmacologico.<sup>13</sup>

#### 1.5 Metallo carbeni e complessi N-eterociclici

Tra i nuovi composti utilizzati come potenziali farmaci antitumorali vi sono i complessi metallo-carbenici e i complessi N-eterociclici. Tali composti hanno

recentemente acquisito una notevole importanza per la loro struttura la quale si presta efficacemente come farmaco, oltre che per la loro rapida sintesi. Inoltre, la maggior parte di questi composti, ha mostrato una citotossicità superiore nelle cellule tumorali, rispetto al Cis-Platino.<sup>14</sup>

I carbeni N-eterociclici (NHCs) sono un'interessante classe di leganti con proprietà simili alle fosfine. Essi sono generalmente derivati dai cosiddetti carbeni persistenti, che sono composti stabili di atomi di carbonio bivalenti. Dal momento che sono fortemente stabilizzate da sostituenti  $\pi$ -donatori, i complessi NHCs sono buoni  $\sigma$ -donatori. I composti NHC si sono rivelati carrier di ligandi per i complessi metallici, sia per la loro ottima struttura, sia per la loro ottima reattività. La loro grande reperibilità, la veloce sintesi e ottimizzazione, l'elevata stabilità, sono solo alcuni degli innumerevoli motivi che rendono questi composti idonei, per il loro sviluppo in termini farmacologici. Una maggiore attenzione verso questi composti, è stata posta comunque, solo in tempi recenti.<sup>15</sup> Tutto è cominciato grazie all'isolamento e la caratterizzazione di un composto carbene N-eterociclico nel 1991. I carbeni N-eterocicli sono composti neutri, contenenti un atomo di carbonio bivalente con un guscio di valenza di sei elettroni. Sono stati studiati una serie metallo-ligandi per NHCs, che hanno trovato varie applicazioni in alcune delle più importanti trasformazioni catalitiche dell'industria chimica, e loro reattività, ha consentito l'apertura di nuove aree di ricerca<sup>16</sup>

### 1.5.1 Struttura e caratteristiche generali dei carbeni n-eterociclici

Gli NHCs, vengono definiti come una specie di eterociclici, contenenti un carbonio carbenico e almeno un atomo di Azoto all'interno della struttura ad anello.

Sono molte le classi di composti carbenici che rispettano questi criteri, e che si differenziano per i vari modelli di sostituzione, per le misure degli anelli e per il grado di stabilità degli eteroatomi.

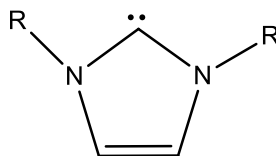


Fig. 10 Struttura di un carbene n-eterociclico

Gli effetti elettronici e sterici, complessivi, di queste caratteristiche strutturali possono spiegarci in qualche modo la loro notevole stabilità. Gli NHCs generalmente dispongono di sostituenti altamente ingombranti, adiacenti al carbonio carbene, che aiutano a stabilizzare cineticamente le specie, in modo da sfavorire stericamente, la dimerizzazione all'olefina corrispondente (Equilibrio Wanzlick). La stabilizzazione elettronica fornita dagli atomi di

azoto, è un fattore ancora più importante. Questi composti sono in netto contrasto rispetto ai carbeni più classici in quanto, mostrano una configurazione elettronica fondamentale di singoletto, con il più alto orbitale molecolare occupato (HOMO) e il più basso non occupato (LUMO), meglio descritti come una coppia solitaria ibridata  $sp^2$ , con una occupazione dell'orbitale p del carbonio  $C^2$  (Fig. 2b sull'articolo ovviamente). Gli adiacenti atomi di Azoto, sigma elettron attrattori e i pi greco elettron donatori, stabilizzano la struttura sia dal punto di vista induttivo, abbassando l'energia delle orbitale s occupato, che dal punto di vista mesomero, donando densità elettronica nell'orbitale p vuoto. La natura ciclica dei composti NHCs aiuta anche a favorire lo stato di singoletto, forzando il carbonio carbene, ad assumere una disposizione di tipo  $sp^2$ . La struttura dello stato fondamentale si riflette sulla lunghezza di legame  $C^2 - N$  (di 1.37 Å), osservata in alcuni composti (IAD), che si situano tra quelle del suo corrispondente sale di imidazolo (IAdH1, 1.33 Å) ed il suo analogo  $C^2$  saturo (IAdH2, 1.49 Å), il che sta a significare che i legami  $C^2 - N$  possiedono parziale carattere di un doppio legame. Questi principi generali di stabilizzazione del carbene, si applicano a tutte le classi di NHC, anche se l'importanza relativa di ogni effetto varia da composto a composto. I composti NHCs, derivano da composti eteroaromatici, per questo, hanno un grado di stabilizzazione parzialmente aromatico (circa 25kcal/mol), anche se ciò, non vale per ogni tipologia di carbene. Specie simili stabilizzate con un solo atomo di Azoto, possono essere formata a partire dal centro carbene in delle posizioni diverse da  $C^2$ . Questi carbeni "anormali", per i quali una struttura neutra, non zwitterionica, del carbene, sono generalmente più elettron-donatori rispetto ai loro analoghi "normali". Il modello dimensionale e il sostituente del eterociclo azotato può avere un grande effetto sulle proprietà del carbene. Gli anelli a 5 termini rappresentano la stragrande maggioranza di questi composti, anche se vi possono essere NHCs con misure più piccole o più grandi. Questi ultimi composti portano ad un aumento della schermatura sterica causa del maggiore angolo di legame  $N^1C^2N^3$ , che spinge i sostituenti azotati, più vicino al centro carbene. Misure degli anelli più grandi hanno anche un effetto elettronico che causa vincoli geometrici, che impongono delle variazioni strutturali e del grado di stabilizzazione dell'eteroatomo. La struttura elettronica dello stato fondamentale di NHCs fornisce un quadro generale, utile per la comprensione della loro reattività. In contrasto con la tipica elettrofilicità della maggior parte dei carbeni di transizione, il doppietto situato nel piano dell'anello eterociclico di NHCs, rende nucleofili, questi composti. La principale conseguenza di questa caratteristica è la propensione di NHCs ad agire come sigma-donatori ed a legarsi con una vasta gamma di specie metalliche e non metalliche. Quindi, la straordinaria forza e le disinte caratteristiche di queste interazioni, l'influenza sulla stabilità, la struttura e la reattività dei complessi che ne derivano, spiegano il grande interesse, per i composti NHCs.

### *Quali sono i più recenti complessi oro carbeni studiati?*

Due nuovi composti oro carbenici sono stati sintetizzati e studiati come potenziali farmaci antitumorali: Il chlorido (1-butil-3-metil-imidazolo-2-ilidene) oro (I) e il bis (1-butil-3-metil-imidazolo-2-ilidene) oro (I). Questi composti sono costituiti da un oro (I) al centro, linearmente coordinato sia ad un N-eterociclico carbene (NHC) che ad un legante cloruro (per il primo composto) o di due leganti NHC identici (per il secondo composto). Sono state ottenute strutture cristallizzate per entrambi i composti, ed i dati strutturali emersi, rispecchiavano le aspettative. L'obbiettivo di tale studio era volto a scoprire se, la presenza di due leganti carbenici, fosse in grado di portare al composto proprietà biologiche distinte da quelle del complesso monocarbenico. Aldilà delle evidenti differenze strutturali questi due composti manifestavano in vitro, la stessa azione citotossica su cellule di carcinoma ovarico umano. Inoltre, entrambi i complessi sono stati in grado di superare la resistenza al Cis-Platino ed hanno evidenziato un alta stabilità in tamponi acquosi a pH fisiologico. Dopodichè è stata valutata la loro reattività con alcune proteine (citocromo C e lisozima) e i risultati hanno evidenziato il fatto che nessun addotto si è formato anche rispetto ad un lungo periodo di incubazione; al contrario, entrambi i composti hanno legato il Rame chaperone Atox-1 (proteina recante una caratteristica sequenza CXXC). Anche il complesso bis-carbene [Au (caffaina-2-ilidene)<sub>2</sub>][BF<sub>4</sub>] è stato studiato recentemente in modo da valutarne l'effettive proprietà antiproliferative e, di conseguenza, il meccanismo. Tale composto, infatti, sembrava essere selettivo per linee di cellule di cancro ovarico umano e scarsamente tossico in organi sani. Successivamente, con lo scopo di individuare i suoi target principali, sono stati esaminati più da vicini due dei più generici obbiettivi biologici: il G-quadruplex DNA, che rappresenta una struttura di ordine superiore del DNA, ed un suo enzima chiave, la poli-adenosina difosfato - ribosio polimerasi 1 (PARP-1). Queste scelte erano basate sul fatto che, entrambe le strutture, andavano a far parte di tutti quei meccanismi, che modificavano la resistenza delle cellule tumorali. I risultati, indicarono che il complesso sotto esame, agiva come un efficiente e selettivo ligando sul G-quadruplex pur essendo un modesto PARP-1 inibitore. Tutto ciò poteva quindi quanto meno fornirci, spunti preliminari, verso il meccanismo molecolare che sta alla base del suo comportamento antiproliferativo. Va sottolineato il fatto che ancora una volta, è stato confermato che grazie alla regolazione della reattività e della chimica redox dei composti d' Oro, attraverso l'ottimizzazione di una opportuna struttura organometallica, si può ottenere maggiore selettività farmacologica<sup>17</sup>.

### **Au-Fosfine**

Negli ultimi anni sono stati sintetizzati e studiati una serie di composti Au(I) contenenti ligandi fosfinici con attività antitumorali<sup>18</sup>, con lo scopo di individuare il ruolo del ligando fosfonico nel meccanismo di azione.



## 2. SCOPO

Un farmaco ampiamente utilizzato nella terapia antitumorale è il cisplatino (il principale target è il DNA), il quale causa gravi effetti collaterali e induce fenomeni di resistenza cellulare. Per superare questi problemi, compresa la resistenza indotta, sono stati sviluppati nuovi platino-complessi (oxaliplatino, carboplatino etc.. Negli ultimi anni sono stati inoltre studiati nuovi metallo composti (oro, rame, rutenio...) allo scopo di individuare farmaci che avessero un diverso target molecolare: le proteine. Lo scopo è quello di individuare un target più selettivo nei confronti della cellula tumorale in modo tale da limitare la tossicità di questi complessi nei confronti delle cellule sane.

I carbeni N-eterociclici (NHC) hanno suscitato notevole interesse poiché presentano una elevatissima stabilità e possono coordinarsi con un'ampia gamma di metalli, in particolare notevole interesse hanno suscitato i complessi di oro Au(I)-NHC come possibili target mitocondriali.

Negli ultimi anni una serie di studi ha portato alla sintesi di complessi Au-NHC con ligandi fosfinici<sup>19,20</sup>, ed ad oggi, numerosi composti di Au(I), contenenti fosfine hanno mostrato elevata attività antitumorale.

Il gruppo di ricerca presso cui è stato svolto questo lavoro di tesi, si è occupato di sintetizzare e valutare le interazioni biologiche di un complesso Au-NHC con legante fosfinico come potenziale agente antitumorale.

È stato sintetizzato il composto PPh<sub>3</sub>-Au-(NHC) e ne è stata valutata la stabilità in soluzione acquosa. Si è inoltre studiata l'interazione del complesso con una possibile proteina target Atox1: questo al fine di comprendere meglio il meccanismo di azione di questo complesso e dei complessi Au(I) con ligandi fosfinici. Attraverso la comprensione di questi meccanismi sarà infatti possibile progettare molecole metallo-organiche in grado di essere sempre più efficaci, per il loro utilizzo nelle terapie antitumorali. La ricerca è stata condotta mediante l'utilizzo di spettrofotometria UV-vis, spettroscopia di risonanza magnetica nucleare e spettrometria di massa.

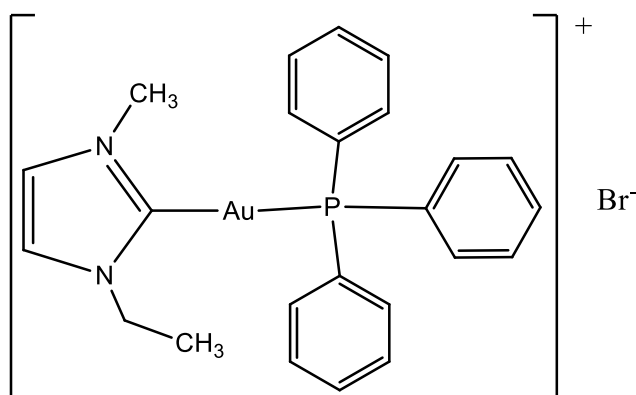


Fig. 11 Complesso PPh<sub>3</sub>-Au-NHC (complesso EC)

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Materiali**

Reagenti chimici comuni sono stati comprati da SIGMA-ALDRICH Co. LLC (Milano, Italia)

- Trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) Sigma-Aldrich T84409
- Acido tetracloro aurico ( H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>)
- Bromuro di 1-Etil-3-metilimidazolo Sigma-Aldrich 89483
- Ag<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sigma85260
- Cloroformio deuterato (CDCl<sub>3</sub>)
- DMSO (dimetilsolfossido): Merk-Millipore - 8.02912.
- Atox1 è stato acquistato dalla Giotto Biotech, clonato da c-DNA umano, espresso in E.Coli, residuo 1-68 aa.
- Buffer: Ammonio Acetato (Amm. Ac.) (A1542) 20 mM, pH 6,8 - SIGMA-ALDRICH Co. LCC.

#### **3.2 Metodi e Strumentazione**

##### **3.2.1 UV-vis**

Lo spettrofotometro UV-vis è uno strumento utilizzato in chimica per fare misurazioni di spettroscopia di assorbimento (per analisi quantitative, qualitative, studi cinetici e titolazioni), ovvero quando un fotone ultravioletto o visibile viene assorbito dalla molecola che stiamo analizzando, questa passa dallo stato fondamentale ad uno stato eccitato.

Lo spettrofotometro UV-vis in genere è costituito da:

- una sorgente luminosa che fornisce lunghezze d'onda che coprono lo spettro ultravioletto-visibile (lampade a filamento di tungsteno per il visibile, lampada al deuterio o Xenon per la radiazione ultravioletta);
- un monocromatore che isola una singola lunghezza d'onda di interesse (composto da specchi concavi e da reticoli di riflessione);
- alloggiamento del campione (un porta campione per introdurre le cuvette);
- il rivelatore, serie di dispositivi fotosensibili che sfruttano l'effetto fotoelettrico (fotocelle a vuoto o gas, fotomoltiplicatori, fotodiodi) sul quale incide il raggio emergente dalla soluzione in esame;
- un sistema di amplificazione della corrente emessa dalla fotocella;

- un galvanometro per la misura di tale corrente elettrica.

Dunque ciò che si va poi ad analizzare è lo spettro UV-vis che è un grafico che presenta sulle ascisse la lunghezza d'onda (in nanometri) e sulle ordinate la percentuale di assorbanza. Gli spettri di assorbimento elettronico sono stati usati per studiare le proprietà chimiche del composto in soluzione. Tali spettri sono caratterizzati da bande di altezza variabile in relazione all'intensità di assorbimento. La regione UV-vis utilizzata nella spettroscopia di assorbimento si estende all'incirca dai 200 agli 800 nm. Quando una radiazione di frequenza opportuna incontra una molecola nel suo stato fondamentale, la radiazione può essere assorbita e la molecola passa nel suo stato eccitato ( $M + h\nu \rightarrow M^*$ ). In particolar modo quando la radiazione cade nella regione del visibile le molecole possono andare incontro a transizioni elettroniche e passare ad uno stato elettronico eccitato. Le molecole rimangono nel loro stato eccitato per un tempo che dipende dai processi di rilassamento a cui le molecole vanno incontro fino a tornare allo stato fondamentale. I vari stati elettronici molecolari, diversamente da quelli atomici, possiedono intervalli energetici relativamente ampi a causa della sovrapposizione tra livelli vibrazionali e rotazionali. Ciascun livello elettronico è quindi a sua volta suddiviso energeticamente. In definitiva le transizioni elettroniche si traducono in bande di assorbimento nello spettro UV-vis e i gruppi di molecole capaci di assorbire la radiazione UV o il visibile sono detti cromofori. La spettrofotometria UV-vis consente di effettuare valutazioni sia quantitative che qualitative; per effettuare analisi qualitative si fanno passare, una alla volta, le singole radiazioni monocromatiche di un raggio policromatico a spettro continuo, attraverso la sostanza in esame, la quale assorbirà in modo diverso, cioè con diversa intensità, le diverse lunghezze d'onda. Riportando i valori in un grafico lunghezza d'onda - assorbimento, si ottiene lo spettro della sostanza esaminata. La posizione delle bande di assorbimento permette di identificare una sostanza, per confronti diretti con campioni noti o tramite banche dati di spettri, o di controllarne il grado di purezza.

L'assorbimento di radiazioni UV-vis è in genere dovuto all'eccitazione di elettroni di legame e quindi la lunghezza d'onda delle bande di assorbimento possono essere correlate ai tipi di legami presenti nella specie in esame. Le transizioni possono essere classificate nel seguente modo:

- $\sigma$ ,  $\pi$ , n: ioni e molecole organiche con un certo numero di anioni inorganici;
- d, f: ioni di metalli di transizione;
- transizioni LMTC (ligand to metal charge transfer) o MLTC (metal to ligand charge transfer): complessi organici che presentano un assorbimento per trasferimento di carica metallo – ligando o viceversa.

Gli spettri di assorbimento UV-vis analizzati per questo lavoro di tesi sono stati registrati con uno spettrofotometro UV-vis Varian Cary 50 BIO (Figura 12); studiati per valutare la stabilità nel tempo dei composti metallici in soluzione e per valutare eventuali interazioni con le proteine target. Spettri di assorbimento registrati nel range di lunghezza d'onda dai 200 agli 800 nm.

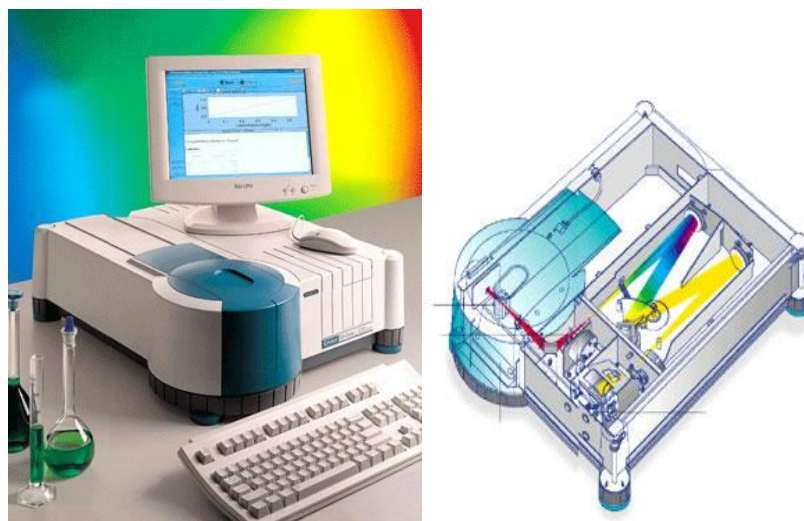


Fig. 12: Spettrofotometro UV-vis Varian Cary 50 Bio

### *Preparazione dei campioni per analisi UV-Visibile*

Gli spettri elettronici sono stati registrati diluendo 3 $\mu$ l di soluzione stock  $10^{-2}$  M dei complessi in DMSO, in buffer Amm. Ac. 20mM pH 6.8, per arrivare ad una concentrazione finale dei campioni  $10^{-5}$ M. Gli spettri sono stati registrati in un arco di tempo di 72h, range della lunghezza d'onda 200-800nm.

### **3.2.2 Spettrometro di massa**

La spettrometria di massa risulta essere uno strumento molto importante nello studio di potenziali metallo farmaci antitumorali, per la caratterizzazione delle loro interazioni con target biologici.

La spettrometria di massa è in grado di fornire informazioni riguardanti:

- la composizione qualitativa e quantitativa di analitici sia organici che inorganici in miscele complesse;
- la struttura di una vasta gamma di specie molecolari complesse;
- i rapporti isotopici degli atomi nei campioni;
- la struttura e la composizione di superfici solide.

La particolarità di tale metodo di analisi è data dalla quantità di campione estremamente limitate che servono per effettuare l'analisi.

Lo spettrometro di massa è lo strumento alla base della spettrometria di massa, permette di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo attraversare loro un fascio di elettroni ad energia nota. Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo

schemi tipici in funzione della loro struttura chimica. Si ottiene così uno spettro di massa, grafico dell'intensità di corrente di ioni rivelata dal detector in funzione del rapporto massa/carica selezionato dall'analizzatore. Ciò è tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica e alle condizioni di ionizzazione a cui è stato sottoposto (gli spettrofotometri di massa sono sotto alto vuoto per mantenere valori di pressione molto bassi in tutte le componenti dello strumento per permettere agli ioni di muoversi liberamente).

Lo spettrometro di massa è composto da (Figura 13):

- una sorgente, che volatilizza e ionizza il campione;
- un analizzatore che misura il rapporto massa/carica degli ioni prodotti;
- un detector che rivela gli ioni che arrivano dall'analizzatore.

Il campione viene introdotto nella fonte di ionizzazione dello strumento e viene quindi ionizzato. Successivamente gli ioni vengono separati nell'analizzatore dello spettrometro in base al loro rapporto massa/carica ed identificati. Quindi appena il segnale arriva al rilevatore si ottiene lo spettro di massa.

Gli spettri di massa analizzati per questo lavoro di tesi sono stati registrati con Spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ-Orbitrap ( ThermoScientific, San Jose, CA, USA) (Figura 14).

La natura di molti addotti proteina-complesso o proteina-metallo che si formano in soluzione, sono studiati tramite le analisi ESI-MS per ottenere informazioni su siti di legame o siti conformazionali dati dall'interazione con le proteine target in modo che si possa caratterizzare la reattività dei metallo farmaci presi in esame. In generale le ESI-MS ci permettono di studiare la natura specifica del legame proteina-metallo, formazione e reversibilità dell'addotto, pseudo-cinetiche della formazione dell'addotto, cambi di conformazione e determinazione dei siti di legame <sup>21</sup>. Studi ESI-MS sono stati utilizzati per la caratterizzazione della reattività di metallo-farmaci con l'ausilio di un ampio range di proteine. Ad esempio citocromo c, essenziale per il trasporto degli elettroni nei mitocondri e coinvolto nell'apoptosi, la calmodulina, proteina legante il calcio o il glutatione-S-transferasi, enzima coinvolto nel mantenimento dello stato redox intracellulare.

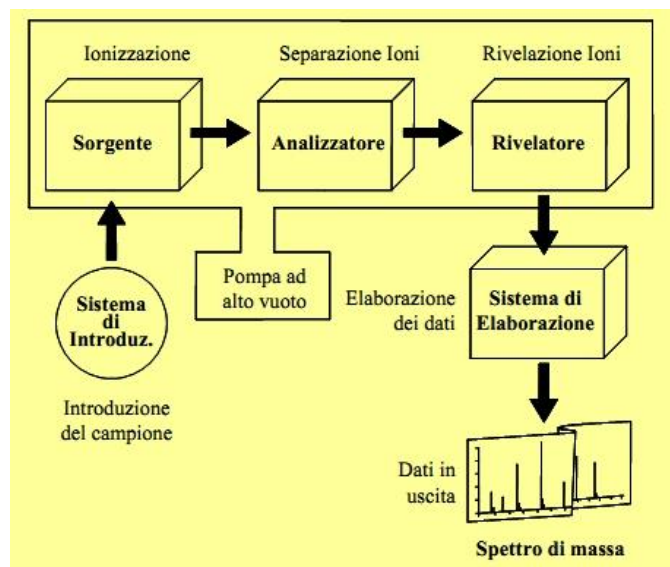


Fig. 13: Schema generale del funzionamento dello spettrometro di massa



Fig. 14: Spettrometro di massa (C.I.S.M)

#### *Preparazione del campione per analisi Spettrometro di massa*

Per le interazioni con la proteina Atox1, i campioni sono stati preparati aggiungendo rispettivamente 450  $\mu\text{L}$  di Bromuro di etil-metil Imidazolo, 127  $\mu\text{L}$  di Oro-Trifenilfosfina e 73  $\mu\text{L}$  di complesso EC ed a ciascun campione, sono stati aggiunti 0,5  $\mu\text{L}$  di Atox1 portando poi il volume finale a 40  $\mu\text{L}$  con Ammonio Acetato. Infine, i campioni sono stati incubati in una “gloves bag” sotto Azoto overnight.

### 3.2.3 Spettroscopia di risonanza magnetica $^1\text{H}$ -NMR

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H}$ -NMR) è basata sulle proprietà magnetiche dei nuclei degli atomi (Figura 15). Dunque ciò che si va ad analizzare sono gli spin di questi atomi. Lo spettro risultante ci permette di ricavare:

- l'integrale (per capire quanti protoni sono presenti nella molecola)
- il chemical shift (per capire l'intorno chimico di ogni protone)
- la molteplicità e le costanti di accoppiamento (per capire come sono disposti i vari protoni nella molecola).

L'integrale ci permette di contare i protoni durante l'attribuzione di una formula bruta. I nuclei, per la presenza degli elettroni, risentono di un campo magnetico effettivo che è minore di un campo magnetico applicato e le frequenze di risonanza di un composto sono legate alla distribuzione elettronica sulla molecola. Dunque il chemical shift è influenzato dalla presenza di tutti quei sostituenti che modificano tale distribuzione.

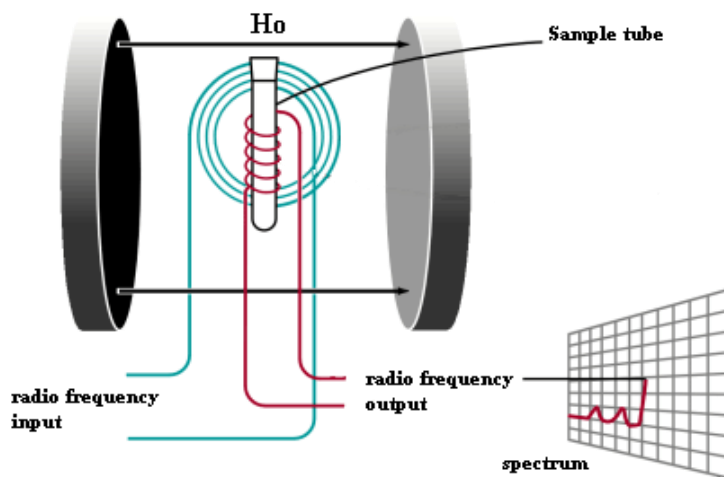


Fig. 15: Schema generico spettroscopia a risonanza magnetica nucleare

Preparazione del campione per analisi con Spettroscopia di risonanza magnetica  $^1\text{H}$ -NMR

Per la preparazione del campione ho pesato circa 4mg di complesso in una eppendorf, che è stato solubilizzato poi in 1 mL(~) di Cloroformio deuterato ed infine ho trasferito la soluzione in un tubo nmr.

### **3.3 Procedura di sintesi**

#### **3.3.1 Preparazione Oro-Trifenilfosfina**

Il composto  $\text{ClAuPPh}_3$  è stato ottenuto facendo reagire Acido Tetracloro aurico (1.5mmol) e trifenilfosfina (3.2 mmol). Inizialmente ho trasferito 839,06 mg (3,2 mmol) di  $\text{PPh}_3$  in un pallone da 100 mL ed ho aggiunto 10 mL di etanolo. Successivamente sono stati aggiunti 1,5 mL (1,5 mmol) di  $\text{HAuCl}_4$  goccia a goccia all' interno del pallone. La reazione è stata condotta sotto costante agitazione, fino a che non si è osservato un precipitato bianco. Successivamente il prodotto è stato filtrato tramite una beuta codata e lavato tre volte con piccole aggiunte di etanolo. Infine, il prodotto è stato messo in essiccatore overnight. Terminato questo processo è stato pesato il prodotto il cui peso è stato di 330,8 mg.

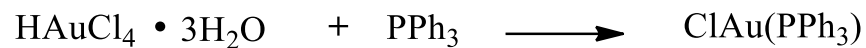
#### **3.3.2 Preparazione complesso $\text{PPh}_3\text{-Au-NHC}$**

Sono stati pesati 40 mg (0.081mmol) di Oro-Trifenilfosfina e 15,54 mg di bromuro di 1-etil-3metilimidazolo (0.081 mmol) e 9,38 mg di  $\text{AgO}_2$  ( 0.040 mmol); rapporto stechiometrico 1:1:0.5. Una volta aggiunti i composti solidi, sono stati messi nel pallone 7 mL di DCM e tenuta in agitazione per 5 h. E' stata quindi aggiunta  $\text{AuPPh}_3$  alla miscela ed è stato tenuto sotto agitazione overnight. Successivamente il liquido è stato filtrato su cotone per tre volte, mediante piccole aggiunte di DCM. Una volta filtrato, il liquido è stato evaporato tramite una corrente di Azoto. Infine il complesso è stato pesato tramite bilancia elettronica con il risultato finale di 50,4 mg di composto.



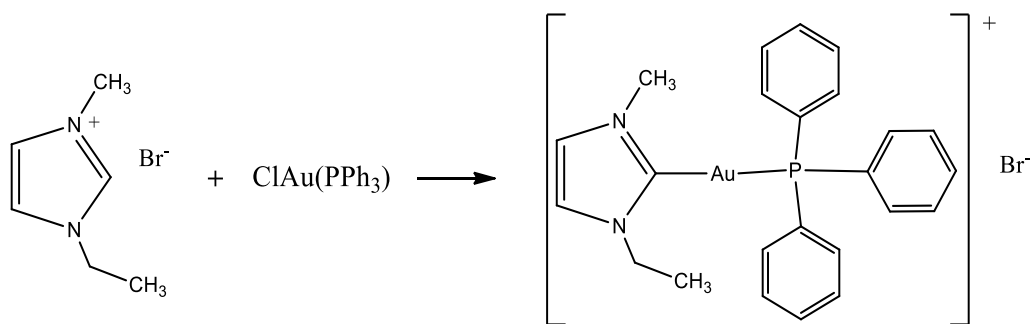
#### 4 RISULTATI E DISCUSSIONI

- La prima sintesi effettuata è stata quella riguardante il composto  $\text{ClAuPPh}_3$  grazie alla reazione tra due reagenti quali Acido Tetracloro Aurico e  $\text{PPh}_3$ <sup>22</sup>.



La resa finale è stata del 44,66%.

- La seconda sintesi effettuata è stata quella riguardante la formazione del complesso  $\text{PPh}_3\text{-Au-NHC}$  grazie alla reazione tra Bromuro etil-metil imidazolo e  $\text{ClAuPPh}_3$ .



Durante questa sintesi abbiamo effettuato il processo di filtrazione in maniera differente rispetto alla sintesi di letteratura<sup>19</sup>, in quanto è stato utilizzato del cotone anziché la Celite. La resa finale è stata di 95,83%.

## 4.1 Spettroscopia UV-Vis

### 4.1.1 Stabilità del composto in Ammonio Acetato

È stata valutata la stabilità del complesso  $\text{PPh}_3\text{-Au-NHC}$  in Ammonio Acetato nell'arco di 72h. Il nostro complesso va incontro a reazione di idrolisi, l'1-etil-3-metilimidazolo si stacca dal complesso lasciando libera  $\text{Au-PPh}_3$ .

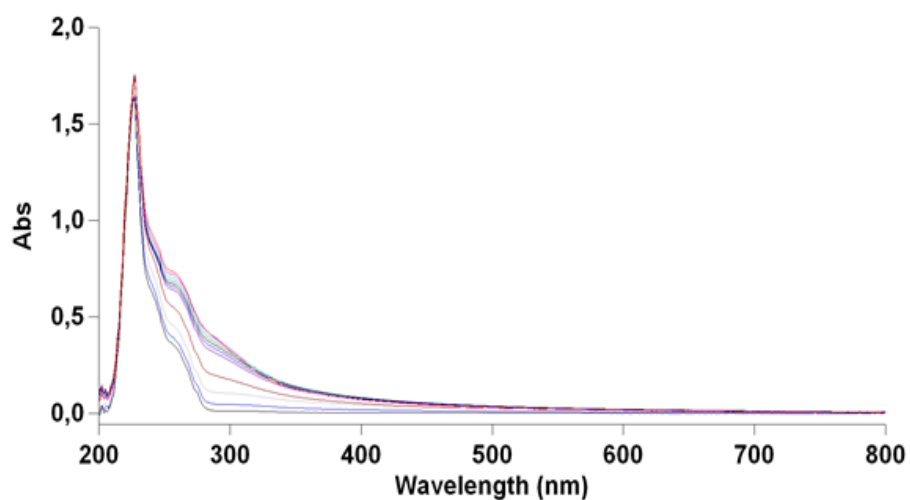


Fig. 17: Spettro elettronico  $\text{PPh}_3\text{-Au-NHC}$  ( $10^{-5}$  M) in buffer Amm. Ac., 72 h

## 4.2 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H-NMR}$ )

### 4.2.1 Stabilità dei composti in $\text{CDCl}_3$

Gli spettri sono stati registrati con una soluzione ad una concentrazione dei complessi pari a  $10^{-3}$  M in un volume totale di 500  $\mu\text{l}$ .

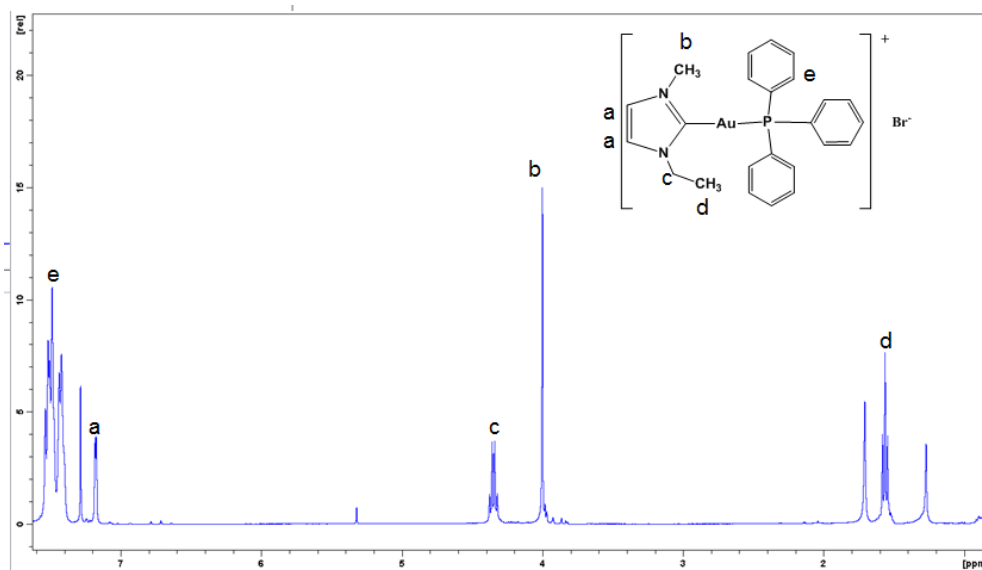


Fig. 18: Spettro elettronico 1H-NMR stabilità complesso EC in CDCl<sub>3</sub>.

1H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)  $\delta$ =7.53-7.32(m, 15H, PPh<sub>3</sub>),  $\delta$ =7.17(d, 2H, NHC),  $\delta$ =4.37-4.32(q, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $\delta$ =4.00(s, 3H, N-CH<sub>3</sub>),  $\delta$ =1.58-1.54(t, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),

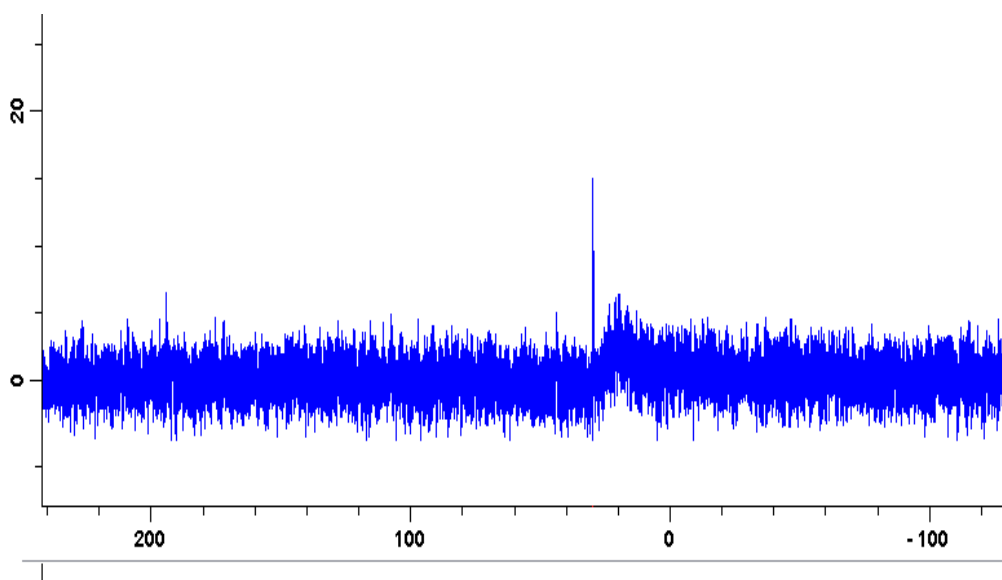


Fig. 19 Spettro elettronico 31P-NMR in CDCl<sub>3</sub> del complesso EC

31P-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)  $\delta$ =29.9(PPh<sub>3</sub>)

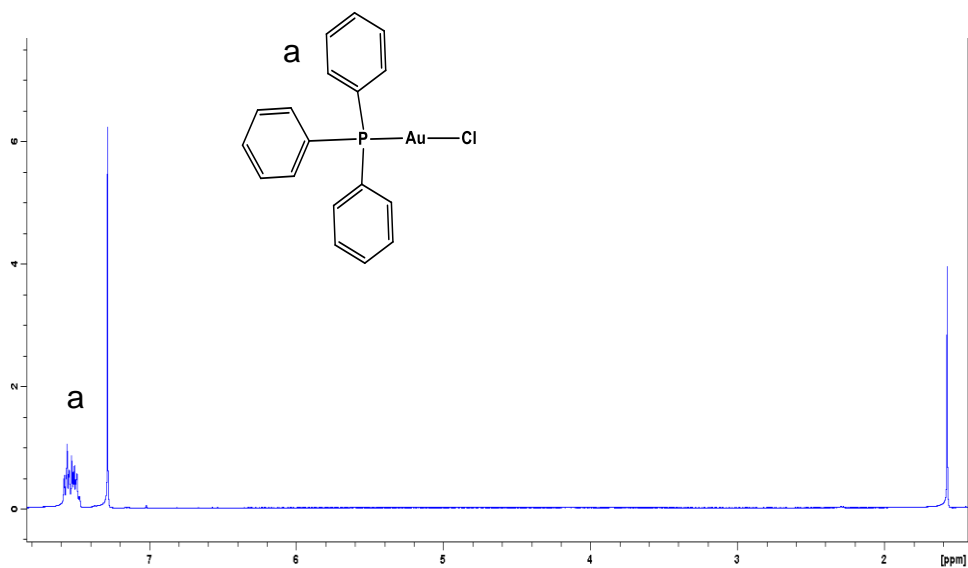


Fig. 20 Spettro elettronico  $^1\text{H-NMR}$  stabilità  $\text{ClAuPPh}_3$  in  $\text{CDCl}_3$

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz}) \delta=7.56-7.50(\text{m}, 15\text{H}, \text{PPh}_3)$

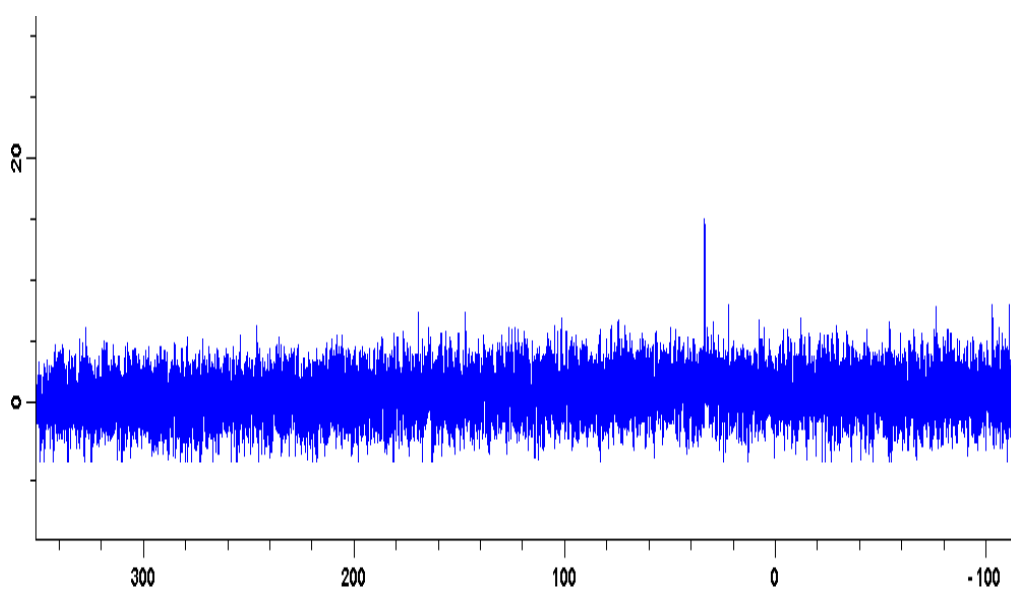


Fig. 21 Spettro elettronico  $^{31}\text{P-NMR}$  in  $\text{CDCl}_3$  della  $\text{ClAuPPh}_3$

$^{31}\text{P-NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz}) \delta=33.3(\text{PPh}_3)$

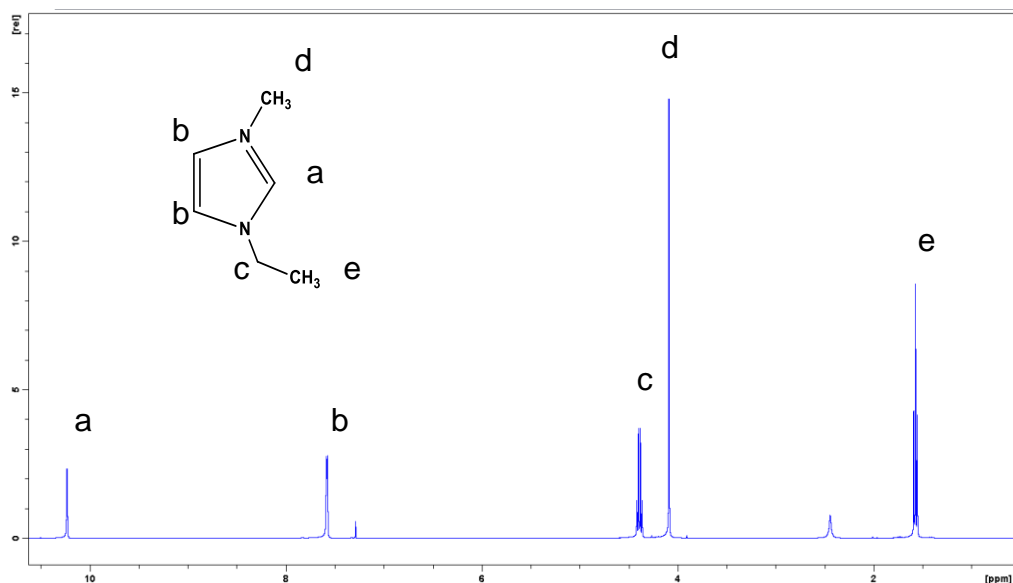


Fig. 22: Spettro elettronico <sup>1</sup>H-NMR stabilità bromuro di etil-metil imidazolo in CDCl<sub>3</sub>

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)  $\delta=10.23$ (s, 1H, NCH),  $\delta=7.58-7.57$ (d, 2H, NHC),  $\delta=4.41-4.36$ (q, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $\delta=4.08$ (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>),  $\delta=1.59-1.55$ (t, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

### 4.3 Spettrometria di massa

#### 4.3.1 Spettro Atox1 con Bromuro di etil-metil Imidazolo

Si può notare che in questo caso sono presenti due picchi, entrambi però, sono relativi alla nostra proteina. Il picco a 7268,71 è il classico picco dell' Atox1 senza metionina, il secondo picco rappresenta sempre la nostra proteina in cui non è stata processata la metionina.

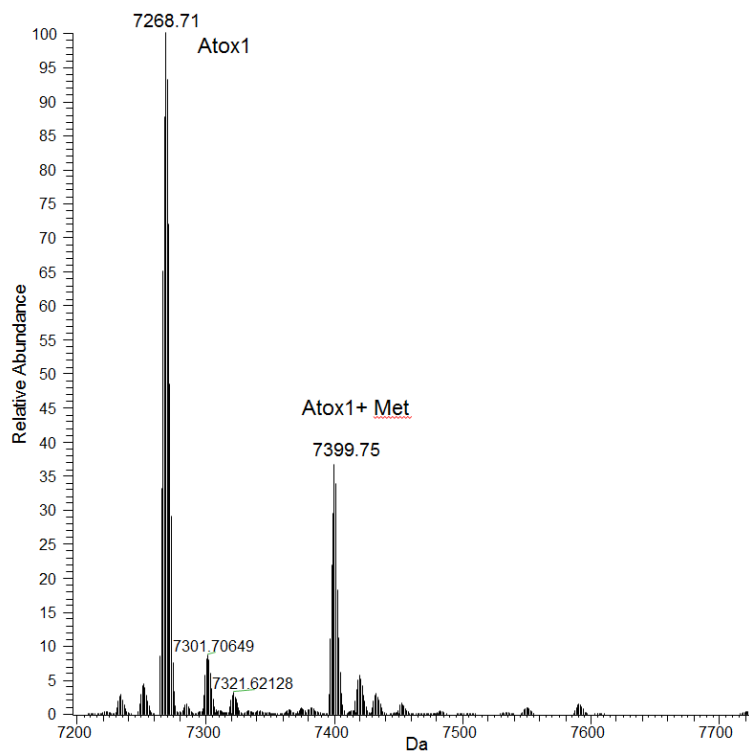


Fig. 23: Atox e Bromuro di etil-metil imidazolo in Ammonio Acetato  $1 \times 10^{-4}$  M

#### 4.3.2 Spettro Oro-Trifenilfosfina con Atox1

Il complesso ha reagito con Atox1 formando 4 addotti.

Il picco a 7268,71 Da, è Atox1.

Il secondo picco che si trova a 7465,67 (in verde) è relativo all' addotto formatosi tra proteina e Au(I).

Il picco a 7661,64 (in rosso) è un picco molto intenso, relativo all' addotto tra proteina con due ioni di Au(I).

Il quarto picco a 7923,73 (in azzurro) è relativo alla formazione di un addotto tra Atox1, Au(I) e Oro-Trifenilfosfina.

Il picco a 8119,69 (in viola) è relativo all' addotto dato da Atox1, due ioni di Au(I) ed Oro-Trifenilfosfina.

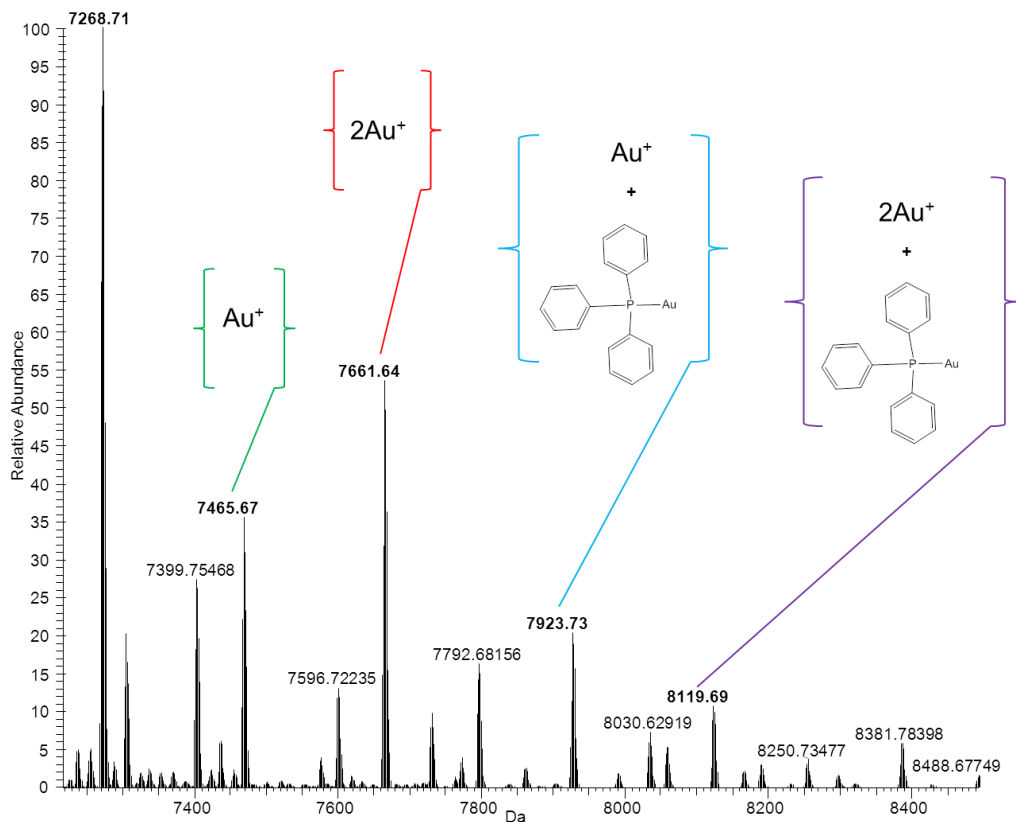


Fig. 24: Spettro elettronico spettrometria di massa interazione ClAuPPh<sub>3</sub> con Atox1 in Ammonio Acetato  $1 \times 10^{-4}$  M

### 4.3.3 Spettro complesso EC con Atox1

Il picco che si trova a 7465,67 (in viola) è relativo all' addotto formatosi tra proteina e Au(I).

In questo caso si ha la formazione di un nuovo picco dato dall'interazione con Atox e Au-NHC a 7572,57 (in verde).

Il picco a 7661,64 (in giallo) è il picco relativo all' addotto tra proteina con due ioni di Au(I).

Gli ultimi picchi a 7727,76 (in azzurro) e 7923.73 (in rosso) si riferiscono rispettivamente all' addotto Atox1/Oro-Trifenilfosfina e Atox1/Au(I)/Oro-Trifenilfosfina.

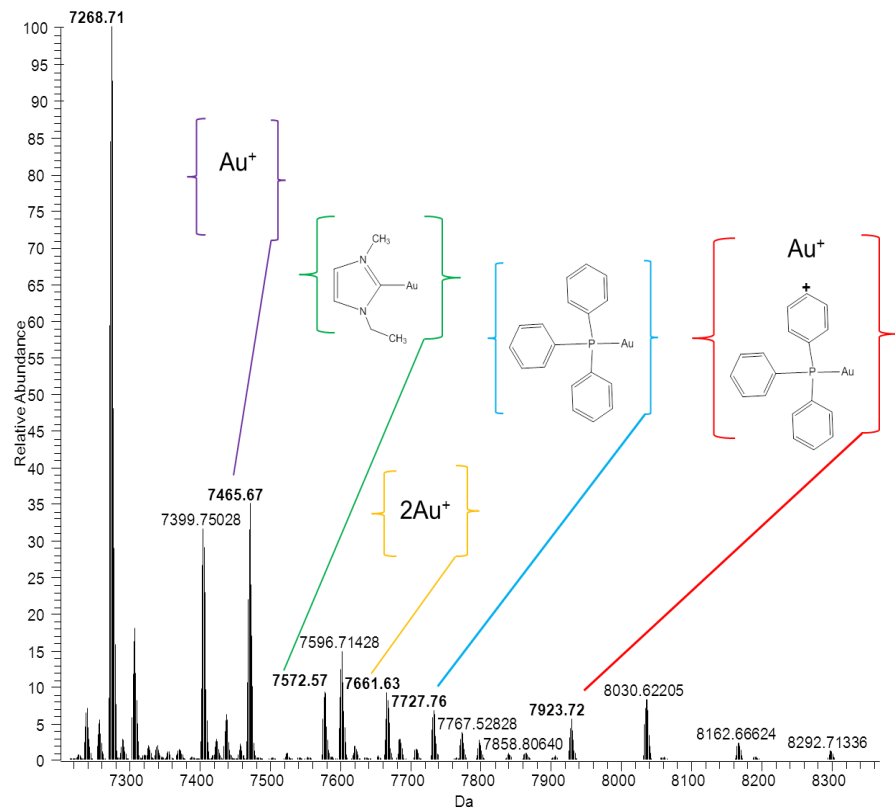


Fig. 25: Spettro elettronico spettrometria di massa interazione complesso EC con Atox1 in Ammonio Acetato  $1 \times 10^{-4}$  M.



## 5. CONCLUSIONI

Durante questo lavoro di tesi è stato sintetizzato il complesso  $\text{PPh}_3\text{-Au(I)-NHC}$ , è stata valutata la sua stabilità in soluzione e l'interazione con un target biologici: Atox1.

Questo complesso in soluzione acquosa subisce reazione di idrolisi, sembra che l'imidazolo si stacchi, lasciando libera  $\text{AuPPh}_3$ . Tale ipotesi è supportata dai risultati ottenuti con la spettrometria di massa, in cui è evidenziato che l'addotto è formato dalla proteina e una serie di frammenti, ma non si trova mai il complesso intero. Può essere che la rottura del complesso sia significativa per il meccanismo di azione in quanto i vari frammenti potrebbero interagire sia con target diversi che con medesimo target in maniera sinergica tra loro. Inoltre la presenza di due sistemi diversi, ligando fosfinico e NHC, potrebbe portare ad ottenere un complesso con potenziali attività antitumorali - generalmente dovute alla presenza delle fosfine - ma con una maggiore selettività nei confronti delle cellule tumorali invece che contro le cellule sane. Questo sarà valutabile dopo una serie di test biologici che andranno sviluppati in futuro.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Kelland. *Nature*, 2007, Volume 7, 573
- [2] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, 1965, 205-698.
- [3] C. Wilkinson. *Advanced Inorganic Chemistry A Comprehensive Text*, 1984, 22H, 976-1009
- [4] S. Nobili, E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Gold Compounds As Anticancer Agents*, 2010, 551-572
- [5] L. Messori, L. Marchetti, L. Massai, F. Scaletti, A. Guerri, I. Landini, S. Nobili, G. Perrone, E. Mini, P. Leoni, M. Pasquali, C. Gabbiani. *Inorg. Chem.* 2014, 53, 2396-2403
- [6] A. Casini, G. Kelter, C. Gabbiani, M. A. Cinellu, G. Minghetti, D. Fregona, H. Fiebig, L. Messori. *J Biol Inorg Chem* (2009) 14:1139–1149
- [7] S. J. Berners-Price. *Gold-Based Therapeutic Agents: A New Perspective*, 2011, (7),197-216
- [8] L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell, P. Zanello, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 3541–3548.
- [9] C.M. Che, R.W.Sun, W.Y. Yu, C.B. Ko, N. Zhu, H. Sun, *Chem. Commun. (Camb)* 2003, 14, 1718–1719.
- [10] Y. Wang, Q.Y. He, R.W. Sun, C.M. Che, J.F. Chiu, *Cancer Res.*, 2005, 65, 11553–11564.
- [11] L. Messori, G. Marcon, M.A. Cinellu, M. Coronello, E. Mini, C. Gabbiani, P. Orioli *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 6039–6043.
- [12] J. L. Hickey, R. A. Ruhayel, P. J. Barnard, M. V. Baker, S. J. Berners-Price, A. Filipovska. *J. AM. CHEM. SOC.* 2008, 130, 12570–12571
- [13] C. Gabbiani, F. Scaletti, L. Massai, E. Michelucci, M. A. Cinellu, L. Messori, *Medicinal Gold Compounds form Tight Adducts with the Copper Chaperone Atox-1: Biological and Pharmacological Implications Chem. Commun.* ,2012,48,11623-11625.
- [14] W. Liu, R. Gust. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 755
- [15] L. Oehninger, R. Rubbiani and I. Ott. *D: Trans.*, 2013, 42, 3269

- [16] M. N. Hopkinson, C. Richter, M. Schedler, F. Glorius. *Nature*, 2014, Volume 210, 214
- [17] B. Bertrand, L. Stefan, M. Pirrotta, D. Monchaud, E. Bodio, P. Richard, P. Le Gendre, E. Warmerdam, M. H. de Jager, G. M.M. Groothuis, M. Picquet e A. Casini. *Inorg. Chem.* 2014, 53, 2296–2303
- [18] E. R.T. Tiekink Gold derivatives for the treatment of cancer *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42 (2002) 225–248
- [19] R. Rubbiani, S. Can, I. Kitanovic, H. Alborzinia, M. Stefanopoulou, M. Kokoschka, S. Mönchgesang, W. S. Sheldrick, S. Wölfl, and I. Ott, Comparative in Vitro Evaluation of N-Heterocyclic Carbene Gold(I) Complexes of the Benzimidazolylidene Type *J. Med. Chem.* 2011, 54, 8646–8657
- [20] M. V. Baker , P. J. Barnard, S. J. Berners-Price, S. K. Brayshaw, J. L. Hickey, B. W. Skelton, A. H. White Synthesis and structural characterisation of linear Au(I) N-heterocyclic carbene complexes: New analogues of the Au(I) phosphine drug Auranofin *Journal of Organometallic Chemistry* 690 (2005) 5625–5635
- [21] C. G. Hartinger, M. Groessl, S. M. Meier, A. Casini and P. J. Dyson; 2013
- [22] N. J. DeStefano, J. L. Burmeister Cooperative Electronic Ligand Effects in Pseudohalide Complexes of Rhodium (I), Iridium (I), Gold (I), and Gold (III) *Inorganic Chemistry*, Vol.10, No. 5, 1971