



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Química Inorgánica

**Síntesis, caracterización y estudios de hidrólisis de
complejos *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-amina)(¹⁵N-amina')]
por RMN 2D [¹H, ¹⁵N] HSQC
Citotoxicidad y fotoquímica de complejos
de Pt^{II} y Pt^{IV}**

Tesis doctoral
Memoria que presenta
Leticia Cubo Martín

Madrid, 2008



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Química Inorgánica

**Synthesis, characterization and hydrolysis studies
of *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-amine)(¹⁵N-amine')] complexes
by 2D [¹H, ¹⁵N] HSQC NMR
Cytotoxicity and photochemistry of
Pt^{II} and Pt^{IV} complexes**

PhD dissertation
Leticia Cubo Martín

Madrid, 2008

Para la realización del presente trabajo he disfrutado durante dos años y medio de una beca de Formación de Personal Investigador concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

Este trabajo forma parte de los siguientes proyectos de investigación subvencionados:

- » Diseño, síntesis y evaluación de nuevos antitumorales con estructuras no clásicas. (SAF2006-03296)

- » Diseño y evaluación farmacológica de nuevos antitumorales: complejos de *trans*-platino(II) y (IV). (SAF2003-01700)

A mis padres

Ítaca

Si vas a emprender el viaje hacia Ítaca,
pide que tu camino sea largo,
rico en experiencias, en conocimiento (...)
visita muchas ciudades de Egipto
y con avidez aprende de sus sabios.
Ten siempre a Ítaca en la memoria
Llegar allí es tu meta.
Mas no apresures el viaje (...)
Ítaca te regaló un hermoso viaje.
Sin ella el camino no hubieras emprendido.
Mas ninguna otra cosa puede darte (...)

Ithaca

As you set out for Ithaca
hope your road is long one
full of adventure, full of discovery (...)
and many you visit Egyptian cities
to learn and go on learning from their scholars.
Keep Ithaca always in your mind.
Arriving there is what you're destined for.
But don't hurry the journey at all.
Ithaca gave you the marvellous journey.
Without her you wouldn't have set out.
She has nothing left to give you now.

K.Kavafis

Table of contents /Índice

List of abbreviations and acronyms	13
Lista de abreviaturas y acrónimos.....	15
Chapter 1	17
1.1 General introduction	19
1.2 Objectives and outline	37
1.3 Experimental, results and discussion	41
1.3.1 Synthesis, characterization of <i>trans</i> -Pt ^{II} and Pt ^{IV} complexes and cytotoxicity studies in SF268, MCF-7 and NCI-H460 cancer cell lines	43
1.3.1.1 Introduction	45
1.3.1.2 Experimental	47
1.3.1.2.1 Materials	47
1.3.1.2.2 Instrumentation	47
1.3.1.2.3 Synthesis of <i>cis</i> -Pt ^{II} complexes.....	48
1.3.1.2.4 Synthesis of <i>trans</i> -Pt ^{II} complexes	49
1.3.1.2.5 Synthesis of <i>trans</i> -Pt ^{IV} complexes.....	50
1.3.1.2.6 Structural determination by X-ray diffraction.....	52
1.3.1.2.7 Biological studies.....	59
1.3.1.3 Results and discussion	61
1.3.1.3.1 Synthesis of ¹⁵ N labelled Pt ^{II} complexes.....	61
1.3.1.3.2 Characterization by X-ray diffraction	62
1.3.1.3.3 Cytotoxicity	63
1.3.2 Aquation studies of <i>trans</i> -Pt ^{II} complexes by 2D [¹ H, ¹⁵ N] HSQC NMR and conductimetry	67
1.3.2.1 Introduction	69
1.3.2.2 Experimental	73
1.3.2.2.1 Materials.....	73

1.3.2.2.2 Instrumentation	73
1.3.2.2.3 Methods	74
1.3.2.2.4 Synthesis	77
1.3.2.3 Results and discussion	81
1.3.2.3.1 Synthesis.....	81
1.3.2.3.2 Hydrolysis studies by 2D [¹ H, ¹⁵ N] HSQC NMR.....	81
Assignments.....	81
p <i>K</i> _a determination	86
Kinetic studies and calculations of rate constants.....	86
Half-Life Calculations	90
Speciation profile under physiological conditions.....	92
1.3.2.3.3 Aquation studies by conductimetry.....	93
Hydrolysis-Conductivity	93
Rate constants from conductivity.....	94
1.3.3 Photoactivation of <i>trans</i>-Pt^{II} complexes in aqueous solution and photoinduction reactivity with nucleobases	97
1.3.3.1 Introduction.....	99
1.3.3.2 Experimental	101
1.3.3.3 Results and discussion.....	103
1.3.3.3.1 Photoactivation of <i>trans</i> -Pt ^{II} complexes in aqueous solution	103
1.3.3.3.2 Photoinduced reactivity of <i>trans</i> -Pt ^{II} complexes with nucleobases.....	105
Reactivity of complex <i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)] with 5'-GMP.....	107
Reactivity of complex <i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)] with 5'-AMP.....	111
Reactivity of complex <i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)] with 9MetAde.....	114
Reactivity of complex <i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)] with 5'-CMP	117
1.3.4 Photochemistry and electrochemistry studies of dihydroxido <i>trans</i>-Pt^{IV} complexes.....	121
1.3.4.1 Introduction.....	123
1.3.4.2 Experimental	125
1.3.4.2.1 Sample preparations	125
1.3.4.2.2 Techniques	125

1.3.4.2.3 Irradiation.....	125
1.3.4.2.4 Cyclic voltammetry.....	126
1.3.4.3 Results and discussion	127
1.3.4.3.1 Photochemistry.....	127
1.3.4.3.2 Electrochemistry.....	130
Conclusions.	263
Capítulo 2. Introducción general, objetivos y planteamiento ...	133
2.1 Introducción general.....	135
2.2 Objetivos y planteamiento	151
Capítulo 3. Síntesis, caracterización y citotoxicidad de complejos <i>trans</i>-Pt^{II} y Pt^{IV} en las líneas celulares tumorales SF268, MCF-7 y NCI-H460	155
3.1 Introducción	157
3.2 Experimental	159
3.2.1 Materiales	159
3.2.2 Instrumentación	159
3.2.3 Síntesis de complejos <i>cis</i> -Pt ^{II}	160
3.2.4 Síntesis de complejos <i>trans</i> -Pt ^{II}	161
3.2.5 Síntesis de complejos <i>trans</i> -Pt ^{IV}	163
3.2.6 Estructuras de Rayos-X.....	165
3.2.7 Estudios bioquímicos.....	171
3.3 Resultados y discusión	173
3.3.1 Síntesis	173
3.3.2 Caracterización por RMN.....	174
3.3.3 Determinación estructural por difracción de Rayos-X.....	177
3.3.4 Citotoxicidad.....	179

Capítulo 4. Estudios de hidrólisis de complejos <i>trans</i>-Pt^{II} por RMN 2D [¹H, ¹⁵N] HSQC y conductimetría	183
4.1. Introducción	185
4.2 Experimental	193
4.2.1 Materiales	193
4.2.2 Instrumentación	194
4.2.3 Métodos	194
4.2.4 Síntesis	197
4.3 Resultados y discusión	201
4.3.1 Síntesis	201
4.3.2 Caracterización por RMN de los compuestos <i>cis</i> - y <i>trans</i> -[¹⁵ N-Pt ^{II}]	202
4.3.3 Estudios de hidrólisis	206
4.3.3.1 Asignación de señales y determinación de los valores de p <i>K</i> _a	207
4.3.3.2 Cinética de hidrólisis y cálculo de constantes de velocidad	216
Tiempos de vida media de las especies	221
Productos de hidrólisis y porcentajes bajo condiciones fisiológicas	223
4.3.3.3 Estudios de hidrólisis por conductimetría	223
Hidrólisis-conductividad	223
Cálculo de las constantes de velocidad de hidrólisis	224
Capítulo 5. Fotoactivación de la hidrólisis de complejos <i>trans</i>-Pt^{II} y fotorreacciones con nucleobases	227
5. 1 Introducción	229
5. 2 Experimental	231
5. 3 Resultados y discusión	233
5.3.1 Fotoactivación de la hidrólisis	233
5.3.2 Fotorreacciones de complejos <i>trans</i> -Pt ^{II} con nucleobases	236
5.3.2.1 Reacción del complejo <i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)] con 5'-GMP	238
5.3.2.2 Reacción del complejo <i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)] con 5'-AMP	243
5.3.2.3 Reacción del complejo <i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)] con 9MetAde	246
5.3.2.4 Reacción del complejo <i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)] con 5'-CMP	249

Capítulo 6 Fotoquímica y electroquímica de complejos dihidroxo <i>trans</i>-Pt^{IV}	251
6.1 Introducción	253
6.2 Experimental	255
6.2.1 Preparación de muestras	255
6.2.2 Técnicas de caracterización	255
6.2.3 Irradiación.....	255
6.2.4 Voltametría cíclica	256
6.3 Resultados y discusión	257
6.3.1 Fotoquímica	257
6.3.2 Electroquímica	259
Conclusions	263
Conclusiones	267
Appendix/Apéndice	271
Agradecimientos	287
Curriculum Vitae	289

List of abbreviations and acronyms

AMD473	<i>cis</i> -amminedichlorido(2-methylpyridine)platinum(II); ZD0473; picoplatin
5'-AMP	adenosine 5'-monophosphate
BBI/BBO	broadband inverse/broadband observe probes
b.p	boiling point
bs	broad signal
but	buthylamine
<i>cis</i> -DDP	<i>cis</i> -diamminedichloridoplatinum(II), <i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂], cisplatin
5'-CMP	cytidine 5'-monophosphate
CNIO	Spanish National Cancer Research Centre
d	doublet
dd	doublet of doublets
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dien	diethylenetriamine
dma	dimethylamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
d of q	doublet of quartets
d of sept	doublet of septuplets
DRX	X-ray diffraction
en	ethylenediamine
ESI-MS	electrospray ionization-mass spectrometry
FCS	fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
5'-GMP	guanosine 5'-monophosphate
GSH	glutathione
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	concentration of a compound that induces 50% growth inhibition in cells compared to untreated cells
INEPT	Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer
ipa	isopropylamine
JM-216	bis(acetato)amminedichlorido(cyclohexylamine)platinum(IV), satraplatin
k_1, k_2	equation constants
k_{-1}, k_{-2}	reaction constants

K_1, K_2	equilibrium constants
LC	Liquid Chromatography
m	multiplet
ma	methylamine
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
m/z	mass to charge ratio
NCI	National Cancer Institute
^{15}N -dma	^{15}N -dimethylamine
^{15}N -ipa	^{15}N -isopropylamine
^{15}N -ma	^{15}N -methylamine
PBS	phosphate buffered saline
ppm	parts per million
pra	propylamine
QNP	probe $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$
s	singlet
SAR	Structure-Activity Relationship
sept	septuplet
t	triplet
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
<i>trans</i> -DDP	<i>trans</i> -diamminedichloridoplatinum(II), <i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, transplatin
TXI	triple-resonance inverse probe $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$
$t_{1/2}$	half-life

Lista de abreviaturas y acrónimos

AMD473	<i>cis</i> -aminodicloro(2-metilpiridina)platino(II), picoplatino, ZD0473
5'-AMP	adenosina-5'-monofosfato
BBI	sonda multinuclear inversa de banda ancha
BBO	sonda multinuclear directa de banda ancha
but	butilamina
<i>cis</i> -DDP	cisplatino, <i>cis</i> -diaminodicloroplatino(II), <i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]
5'-CMP	citidina-5'-monofosfato
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
d	doblete
dd	doblete de dobletes
dien	dietilenetriamina
dma	dimetilamina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dc	doblete de cuartetos
DRX	Difracción de Rayos-X
dsp	doblete de septupletes
en	etilendiamina
ESI-MS	espectrometría de masas de ionización por electrospray
FCS	suero de ternera fetal
FDA	Food and Drug Administration
5'-GMP	guanosina-5'-monofosfato
GSH	glutación (γ -glutamyl-L-cisteinilglicina)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	concentración de una droga que induce el 50% de la inhibición del crecimiento celular en comparación a un experimento control sin droga
INEPT	Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer
ipa	isopropilamina
JM-216	bis(acetato)aminodicloro(ciclohexilamina)platino(IV), satraplatino
k_1/k_2	constantes de acuación
k_{-1}/k_{-2}	constantes de anación
K_1/K_2	constantes de equilibrio
LC	Liquid Chromatography

m	multiplete
ma	metilamina
MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetildiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
m/z	relación masa carga
NCI	National Cancer Institute
¹⁵ N-dma	¹⁵ N-dimetilamina
¹⁵ N-ipa	¹⁵ N-isopropilamina
¹⁵ N-ma	¹⁵ N-metilamina
PBS	solución salina de tampón fosfato
p.e	punto de ebullición
ppm	partes por millón
pra	propilamina
QNP	sonda tetranuclear ¹ H/ ¹³ C/ ¹⁵ N/ ³¹ P
s	singlete
sa	señal ancha
SAR	relación estructura actividad
sp	septuplete
t	triplete
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
<i>trans</i> -DDP	<i>trans</i> -diaminodicloroplatino(II), <i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂], transplatino
TXI	sonda trinuclear inversa ¹ H/ ¹³ C/ ¹⁵ N
t _{1/2}	tiempo de vida media

Chapter 1

1.1 *General introduction*

Cancer

The origin of the word cancer is credited to the Greek physician Hippocrates (ca. 460 B. C.), considered the "father of medicine". Hippocrates used the terms *carcinoma* and *carcinoma* to describe non-ulcer forming and ulcer-forming tumors. In Greek, these words refer to a crab, most likely applied to the disease because the finger-like spreading projections from a cancer, called to mind the shape of a crab.

Cancer is a disease caused by normal cells changing so that they grow in an uncontrolled way. The uncontrolled growth causes a tumor. If not treated, the tumor can cause metastasis by invading normal tissues nearby or by causing pressure on other body structures. There are over 200 different types of cancer because there are over 200 different types of body cells.

Tumors can be benign or malignant. Malignant tumors are made up of cancer cells. They usually grow faster than benign tumors, spread through the surrounding tissues and other parts of the body. It is the ability to spread that makes a cancer dangerous.

Studies suggested that the origin or some causes of cancer may lie outside the body and, more importantly, that cancer could be linked to identifiable and even preventable causes.

Metal complexes as therapeutics

The concept of chemotherapy (defined as the use of drugs to injure an invading mechanism without injury to the host) was first introduced by Paul Ehrlich (Nobel Prize in Medicine in 1908), for the use of a chemical of known composition that treated parasites.

The interest in uses and application of inorganic chemistry in medicine is in expansion. The field of Inorganic Chemistry in medicine may be usefully divided into two main categories: i) drugs (ligands) that target metal ions and ii) metal compounds as drugs or diagnostic agents where the central metal ion is usually the key feature of the mechanism of action.

In the first category, the design of the ligands that will interact with free or protein-bound metal ions is a recent focus.¹ For example, chelating ligands for

¹ Liu, Z. D.; Hider, R. C. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 151

General introduction

copper and zinc are being investigated as potential treatment for Alzheimer's disease.²

On the other hand, medicinal applications of metals can be traced back almost 5000 years, and currently, there is much interest in the design of metal-based drugs and imaging agents.³ One of the biggest challenges, in this field, lies in the control of the toxicities of metal compounds⁴ and hence in understanding the responsible species.⁵ A wide variety of metal compounds are already in clinical use (Figure 1.1). These include mineral supplements containing e.g. transition metals thought to be essential for mammalian life (Cr, Mn, Fe, Co). Widely used too are antacids, many of which are simple inorganic salts. Lithium salts are effective for controlling mood and are used on a large scale for the treatment of manic depression. Gold as $K[Au(CN)_2]$ was introduced at the turn of the 20th century for the treatment of tuberculosis and was replaced by gold(I) thiolates, which were later used (about 1930) for the treatment of rheumatoid arthritis. Platinum compounds have been successfully applied as anticancer agents in the last 40 years. And finally, there is a current interest in the development and use of ruthenium as antitumor agents.⁶ All this, illustrates that exciting times lie ahead for those interested in "metals in medicine".



Figure 1.1 A periodic table of medicines in clinical use[Ⓟ]

² Bush A. I. *Neurobiol. Aging*. **2002**, *23*, 1031

³ Bruijninx, P. C. A.; Sadler, P. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 197

⁴ Stoughton, R. B.; Friend, S.H. *Nature Rev. Drug Discovery*. **2005**, *4*, 345

⁵ Reedijk, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 236

⁶ Berners-Price, S. J.; Sadler, P. J. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *151*, 1

[Ⓟ] Picture courtesy of Prof. Peter Sadler

Discovery of cisplatin

The accidental discovery, over 40 years ago in the Barnett Rosenberg's Laboratory, of the anticancer properties of cisplatin, represents a major landmark in the history of successful anticancer drugs.

cis-diamminedichloridoplatinum(II) (*cis*-DDP) (Figure 1.2) was chemically described in 1845,⁷ but its antitumor properties were only found accidentally by Rosenberg in 1965.^{8,9} While investigating the influence of an electric field on the growth of the *Escherichia coli* bacteria, Rosenberg saw that cells stopped dividing and displayed strong filamentous growth. This effect was shown not to be due to the electric field but rather, to electrolysis products arising from the platinum electrodes. Detailed chemical analysis identified two active *cis* isomer complexes: [PtCl₂(NH₃)₂] and [PtCl₄(NH₃)₂]. In 1971, the first patients were treated with cisplatin and it was approved by the U.S. FDA in 1978.¹⁰

Cisplatin (Platinol[®], Bristol-Myers Squibb) is today one of the most widely used agents in the treatment of solid tumors, and particularly effective against testicular cancer.

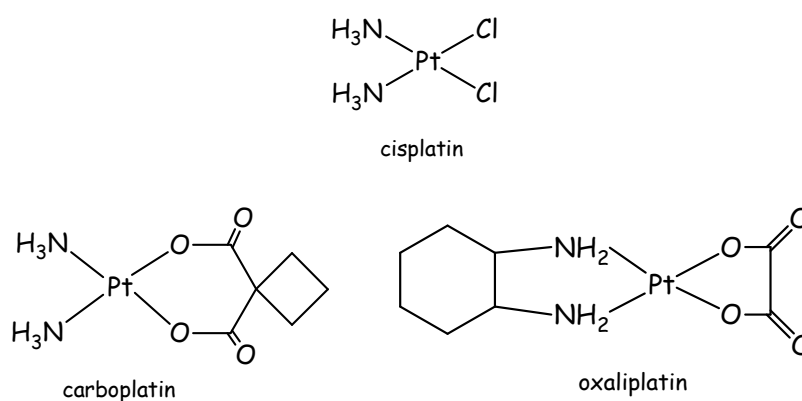


Figure 1.2 Platinum anticancer drugs in worldwide clinical use

⁷ Peyrone, M. *Ann. Chem. Pharm.* **1845**, *51*, 1

⁸ Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Krigas, T. *Nature*. **1965**, *205*, 698

⁹ Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. *Nature*. **1969**, *222*, 385

¹⁰ *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, ed. Lippert, B., Wiley-VCH, Zurich, **1999**

Platinum complexes in cancer therapy

The clinical use of cisplatin against cancer is however severely limited by dose-limiting side-effects such as nephrotoxicity*, ototoxicity[‡] and myelosuppression.^{§,11,12,13} In addition to the high systemic toxicity, inherent or acquired resistance is a second problem often associated with cisplatin that limits its clinical use.

Clearly, the efficacy of cisplatin was impressive and the research for new platinum derivatives was greatly stimulated. Cleare and Hoeschele¹⁴ investigated a series of platinum complexes and two years after the first patient had been treated with cisplatin in a clinical trial, they published the following structure-activity relationships (SAR) for platinum-based agents (Figure 1.3): a) the platinum complexes should contain two (or one bidentate) labile leaving ligands; b) two more kinetically (or one bidentate) inert am(m)ine ligands should be coordinated to the Pt^{II} centre; and c) the complexes should be neutral and should have a *cis* configuration.

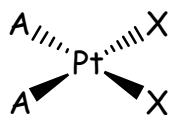


Figure 1.3 Structure of *cis*-platinum complex, where X = leaving groups, A = carrier ligands

The design and synthesis of new platinum analogues that can circumvent the drawbacks of cisplatin therapy constitutes a broad area of research.¹⁵ The search was initially pursued at the Institute for Cancer Research in the U.K. Carboplatin (*cis*-diammine-[1,1-cyclobutanedicarboxylato]platinum(II)), which was developed by Bristol-Myers Squibb, emerged from these investigations (Figure 1.2).¹⁶ Carboplatin was selected, mainly, because of its lower non-haematological toxicity compared with cisplatin. Unfortunately, it exhibits cross-resistance with cisplatin.

* nephrotoxicity: is a poisonous effect of some substances on the kidney

‡ ototoxicity: is defined as the tendency of certain therapeutic agents to cause functional impairment and cellular degeneration of the inner ear and the eighth cranial nerve

§ myelosuppression: a decreased bone-marrow function that results in lower numbers of red blood cells, white blood cells and platelets

¹¹ Cvitkovic, E.; Spaulding, J.; Bethune, V.; Martin, J.; Whitmore, W. F. *Cancer*. **1977**, *39*, 1357

¹² Hayes, D. M.; Cvitkovic, E.; Golbey, R. B.; Scheiner, E.; Helson, L.; Krakoff, I. H. *Cancer*. **1977**, *39*, 1372

¹³ Vonhoff, D. D.; Schilsky, R.; Reichert, C. M.; Reddick, R. L.; Rozencweig, M.; Young, R. C.; Muggia, F. M. *Cancer Treat. Rep.* **1979**, *63*, 1527

¹⁴ Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D. *Bioinorg. Chem.* **1973**, *2*, 187

¹⁵ Kelland, L. *Nature Rev.* **2007**, *7*, 573

¹⁶ Desoize, B.; Madoulet, C. *Eur. Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2002**, *42*, 317

The dose limiting toxicity is chiefly myelosuppression[§] and thrombocytopenia[‡]. The combination of carboplatin with paclitaxel is of great interest, since toxicity is reduced.

Oxaliplatin (1*R*,2*R*-diaminocyclohexane oxalato-platinum(II)) was originally described by Kidani at the University of Nagoya, Japan¹⁷ and developed primarily in France (Figure 1.2). This drug was selected for development because of its higher efficacy and lower toxicity *in vivo* preclinical studies compared with cisplatin. And most importantly, it has no cross-resistance with cisplatin. The best results have been obtained in the treatment of colorectal cancer. Synergy has been observed with leucovorin and fluorouracil.

Cisplatin, carboplatin and oxaliplatin are to date the only metal-based anticancer agents in worldwide clinical use (Table 1.1). These metal complexes are used in about 50% of all tumor therapies and display a remarkable therapeutic activity in a series of solid tumors.¹⁸ However, the clinical success of platinum drugs is limited by the main drawbacks associated with this kind of therapy. Thousands *cis*-DDP's analogues have been synthesised and investigated in preclinical settings *in vitro* and *in vivo* with the aim of overcoming the side effects associated with cisplatin chemotherapy.¹⁹ Nearly 40 platinum complexes have been investigated in clinical trials up to now.¹⁸ But, the chance to find more active platinum complexes with a simple set of ligands has nearly vanished. Consequently, two main routes build actually the basis for the platinum-based drug discovery process: a) synthesis of platinum complexes containing ligands with the specific function of improving tumor selectivity; and b) development of non-classic platinum complexes clearly violating the classic structure activity relationships.

Regarding the non-classical compounds, it needs to be mentioned the non-classical compound *cis*-[PtCl₂(NH₃)(2-picoline)]^x (Figure 1.4, picoplatin) which is a sterically hindered platinum complex^{20,21} and exhibits evidence of antitumor activity in phase II trials,²² although its structure does not follow the SAR's defined.

[‡] A decrease in the number of platelets in the blood

¹⁷ Kidani, Y.; Inagaki, K.; Iigo, M.; Hoshi, A.; Kuretani, K. *J. J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1315

¹⁸ Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2008**, *2*, 183

¹⁹ Jamieson E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467

^x developed by Poniard Pharmaceuticals

²⁰ Holford, J. *Anticancer Drug Design.* **1998**, *13*, 1

²¹ Holford, J.; Beale, P. J.; Boxall, F. E.; Sharp, S. Y.; Kelland, L. R. *Eur. J. Cancer.* **2000**, *36*, 1984

²² Gore, M. E.; Atkinson, R. J.; Thomas, H.; Cure, H.; Rischin, D.; Beale, P.; Bougnoux, P.; Dirix, L.; Smit, W. M. *Eur. J. Cancer.* **2002**, *38*, 2416

General introduction

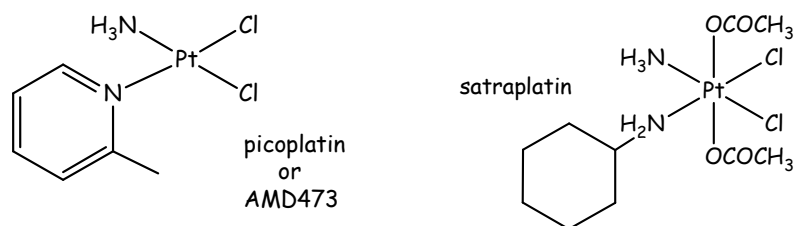


Figure 1.4 Structures of Pt-antitumor drugs in clinical trials or recently for clinical use

In clinical practice, cisplatin and all the 'second-generation' platinum drugs are administered by intravenous infusion. The ability to deliver an oral drug is fundamental because would allow much greater flexibility in dosing, and increases the potential for the use of platinum drugs, especially in palliative care. However, the physical properties of cisplatin and the 'second-generation' platinum drugs rule out the possibility of an orally formulation.²³ The search for oral bioformulation in platinum drugs thus, becomes an important area of chemical development. This led to the identification of a new class of Pt^{IV} compounds with suitable properties for oral administration and high antitumor activity, because of their better solubility.

In this context, satraplatin (Figure 1.4, JM-216; *cis,trans,cis*-[PtCl₂(OAc)₂(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)])^{*}, an octahedral Pt^{IV} complex, was until very recent date[†] candidate in an advanced clinical stage. Satraplatin has been broadly evaluated in large number of cells^{24,25,26} and its metabolism process also studied.^{27,28}

A timeline of the milestones in the development of platinum drugs for cancer therapy is shown in Table 1.1.

²³ Hasegawa, Y.; Morita, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 5511

^{*} developed by Spectrum Pharmaceuticals/GPC Biotech

[†] www.fiercebiotech.com/story/gpc-shares-crater-on-phase-iii-cancer-failure/2007-10-31

²⁴ Kelland, L. R.; Abel, G.; McKeage, M. J.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Murrer, B. A.; Harrap, K. R. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2581

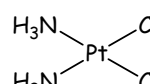
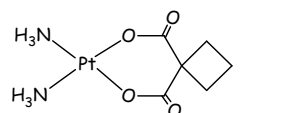
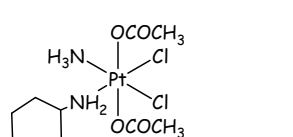
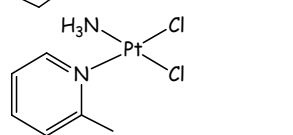
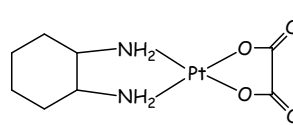
²⁵ Kelland, L. R.; Murrer, B. A.; Abel, G.; Giandomenico, C. M.; Mistry, P.; Harrap, K. R. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 822

²⁶ Harrap, K. R. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2761

²⁷ Kelland, L. R. in *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, ed. Lippert, B., VHCA, Wiley-VCH, Zurich, Switzerland, **1999**, pp. 497-521

²⁸ Ellis, L. T.; Er, H. M.; Hambley, T. W. *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 793

Table 1.1 Chronology or landmarks in the history of platinum drugs for cancer therapy ^ψ

	1965	▶ discovery of the biological properties of cisplatin in bacteria
	1968	▶ cisplatin showed to be active against a mouse model of cancer
	1971	▶ first patient treated with cisplatin
	1978	▶ regulatory approval of cisplatin (testicular and bladder cancer)
	1982	▶ first patient treated with carboplatin
	1985	▶ description of the various cisplatin-induced adducts formed on DNA
	1989	▶ regulatory approval of carboplatin (ovarian cancer)
	1991	▶ identification of the role of elevated glutathione in causing tumor resistance to cisplatin
	1992	▶ correlation of increased nucleotide-excision repair with lower responses to platinum-based chemotherapy in patients with ovarian cancer
	1993	▶ first patient treated with an orally administered platinum drug JM-216 (satraplatin)
	1997	▶ first patient treated with AMD473 (picoplatin)
	1999	▶ identification of the molecular defect in nucleotide-excision repair that causes hypersensitivity of some testicular cancers to cisplatin
	2002	▶ identification of the role of the copper transporter CTR1 in transporting cisplatin into cells. Initial U.S. FDA approval of oxaliplatin (colorectal cancer)
	2006	▶ approval of bevacizumab in non-small-cell-lung cancer used in combination with carboplatin and paclitaxel
	2007	▶ satraplatin was evaluated by the U.S. FDA for prostate cancer until 2008

^ψ Table adapted from ref 15

Mechanism of action and biological targets of cisplatin

The mechanisms of cellular uptake and efflux of cisplatin are still not fully understood. Early studies suggested that cisplatin enters the cell mainly by passive diffusion.¹⁹ More recently, a growing body of evidence has revealed a direct link between the cellular management of copper and platinum concentrations. In the past few years, the plasma membrane transporter CTR1 has been shown to have a substantial role in cisplatin influx.²⁹ And, more recently, it has been published that the interaction between platinum complexes and copper transport proteins could be a step in the mechanism of platinum anticancer drug.³⁰

The interaction of platinum complexes with metallodrug-proteins such as cytochrome c has been explored by Messori *et al.* Recent studies have been carried out in order to analyze if the protein-bound platinum fragments and its specific side of platination play an important role in the mechanism and toxicity of platinum metallodrugs.^{31,32}

Once the neutral cisplatin enter into the cell, it has to be activated before it can bind to its target of DNA. This occurs by intracellular activation through aquation to mono-aqua and diaqua species ($[\text{PtCl}(\text{OH}_2)(\text{NH}_3)_2]^+$, $[\text{Pt}(\text{OH}_2)_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$) and it is facilitated at chloride concentrations below 100 mM, as found inside cells.³³ The positively charged active species interact with the cellular nucleophiles.³⁴

Although, inside the cell there are many molecules which compete for cisplatin binding, such as small molecules and ions (peptides, proteins, thiol-containing etc.), DNA is the primary biological target of the drug.³⁵ There are convincing evidences that its cytotoxic properties are a consequence of bifunctional-DNA adduct formation.³⁶ The coordination of cisplatin occurs mainly through the N-7 position of the imidazole ring of the purine bases of DNA-guanine (G), affording monofunctional adducts which evolve to bifunctional in a later step. This adduct formation preference is exposed to the major groove of the double helix and not involved in base-pair hydrogen bonding. The adducts

²⁹ Wang, D.; Lippard, S. J. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, *4*, 307

³⁰ Arnesano, F.; Scintilla, S.; Natile, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9062

³¹ Casini, A.; Gabbiani, C.; Mastrobuoni, G.; Messori, L.; Moneti, G.; Pieraccini, G. *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 413

³² Gabbiani, C.; Casini, A.; Mastrobuoni, G.; Kirshenbaum, N.; Moshel, O.; Pieraccini, G.; Moneti, G.; Messori, L.; Gibson, D. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 755

³³ Davies, M. S.; Berners-Price, S. J.; Hambley, T. W. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *79*, 167

³⁴ Reedijk, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 3611

³⁵ Jamieson E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467

³⁶ Zamble, D. B.; Lippard, S. J. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 435

formed by cisplatin are well characterized³⁷ and to date are as follows: 1,2-intrastrand (GpG) adducts between adjacent guanines; 1,2-intrastrand (ApG) adducts between an adjacent adenine (A) and guanine; 1,3-intrastrand adducts between purines separated by one or more intervening bases (GpNGp) (where N is another base); G-G interstrand adducts linking the two strands of the DNA double helix; monofunctional adducts coordinated to a single purine; and protein-DNA cross-links, where cisplatin coordinates a protein molecule and a nucleobase (Figure 1.5).

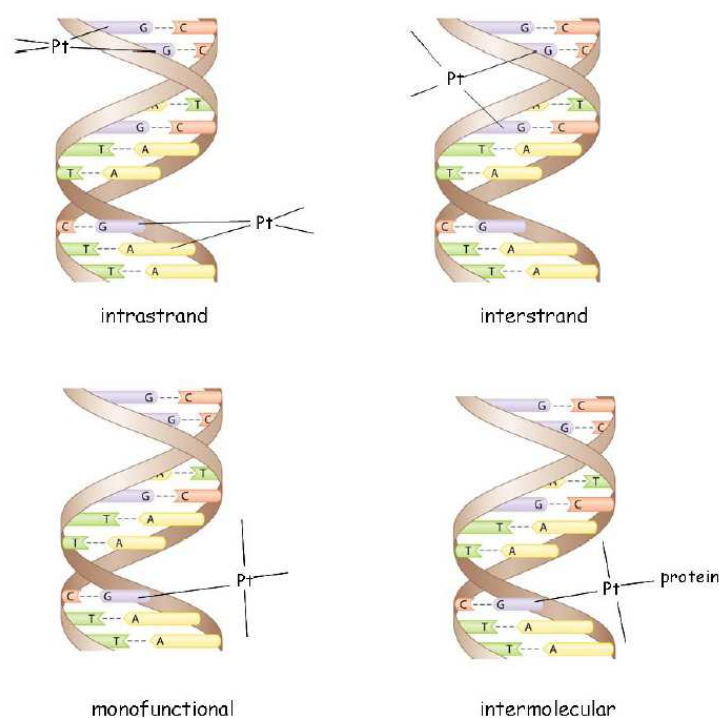


Figure 1.5 Structures of some adducts formed in the interaction of cisplatin with DNA

There is a continued debate about which of various platinum-DNA adducts might be the more biologically significant. The adducts cause distortions in DNA, including unwinding and bending, and there is no doubt, that the formation of DNA adducts activates various signal-transduction pathways;³⁸ for example, those

³⁷ Eastman, A. in *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a leading anticancer drug*, ed. Lippert, B., Wiley-VCH, Zurich, 1999, pp. 111-134

³⁸ Siddik, Z. H. *Oncogene*. 2003, 22, 7265

General introduction

involved in DNA-damage recognition and repair, cell-cycle arrest, and programmed cell death (apoptosis[†]).³⁷ However, there are still wide gaps in the full appreciation of the process that translate cisplatin-induced DNA damage into its characteristic drug-mediated cellular effects. An understanding of the mode of action is indeed desirable in refining therapeutic approaches that further enhance the antitumor activity of the platinum drug.

Resistance

Drug resistance is a major obstacle for the successful treatment of cancer with cisplatin. Although high response rates are often initially observed in patients, resistance frequently occurs, rendering subsequent therapy largely ineffective.

The patterns of cisplatin resistance vary considerably between tumor types.^{39,40,41,42} In general, resistance is multifactorial (Figure 1.6), in that several mechanisms are encountered simultaneously within the same tumor cell.³⁸ Thus, the high level of resistance is a net effect of several unrelated mechanisms which make difficulty to circumvent cisplatin resistance as a therapeutic strategy.

The major mechanisms involved in cisplatin resistance include:

- i) Reduced intracellular drug accumulation
- ii) High intracellular detoxification caused by the high levels detected in the glutathione and metallothionein
- iii) Tolerance increasing rate and repair of damaged DNA

Thus, the resistance might be mediated through two broad mechanisms. The first broad mechanism of resistance is a failure of a sufficient amount of platinum to reach the target DNA and the second is a failure to achieve cell death after platinum-DNA adducts formation.

[†] The term apoptosis was coined in a now-classic paper by Kerr, Wyllie, and Currie (*Brit J. Cancer* 26:239) in 1972 as a means of distinguishing a morphologically distinctive form of cell death which was associated with normal physiology. Apoptosis was distinguished from necrosis, which was associated with acute injury to cells. Apoptosis is characterized by nuclear chromatin condensation

³⁹ Muggia, F. M.; Los, G. *Stem. Cells*. **1993**, *11*, 182

⁴⁰ Jassem, J. *Ann Oncol*. **1999**, *10*, 77

⁴¹ Brabec, V.; Kasparkova, J. *Drug Resist. Updates*. **2002**, *5*, 147

⁴² Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Pérez, J. M. *Chem. Rev*. **2003**, *103*, 645

One strategy to overcome cisplatin resistance is to design platinum complexes with non conventional structures that specifically deals with some or even all of the above mentioned resistance mechanisms.

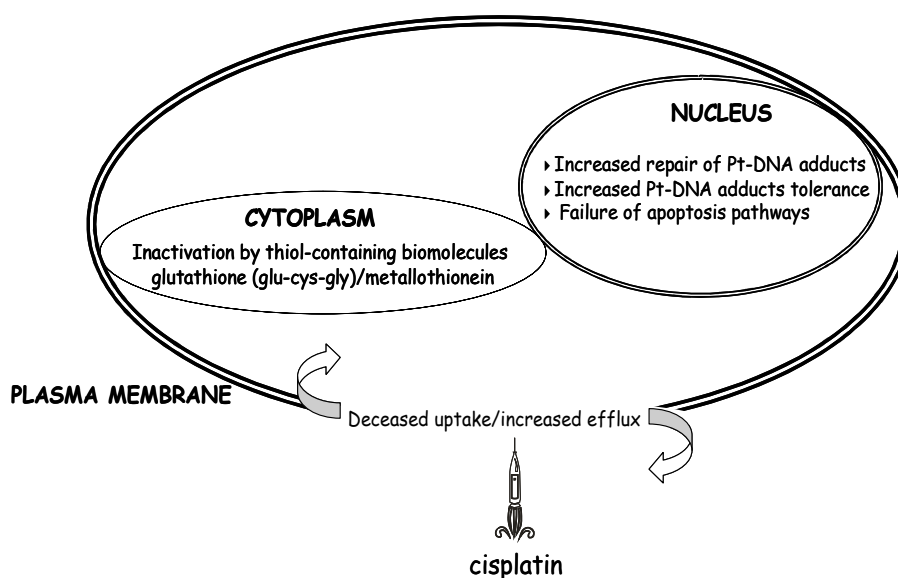


Figure 1.6 Major biochemical mechanism of resistance to cisplatin

Non conventional complexes as new drugs

The research of new platinum drugs active towards cisplatin resistant tumors was mostly focussing on compounds with *cis* geometry because of transplatin, the *trans*-isomer of cisplatin, was supposed to be inactive. However, several exceptions to this general rule have been published over the years.^{43,44}

Most of these active mononuclear *trans*-Pt^{II} complexes fall into four classes (Figure 1.7). The first three classes, all concerning Pt^{II} species, have general formula *trans*-[PtCl₂(L)(L')] in which: i) L = N-donor aromatic heterocycle and L' = ammine, sulphoxide or a second aromatic N-donor ligand^{45,43,46,47,48,}

⁴³ Van Beusichem, M.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 634

⁴⁴ Coluccia, M.; Nassi, A.; Loseto, F.; Boccarelli, A.; Mariggio, M. A.; Giordano, D.; Intini, F. P.; Caputo, P.; Natile, G. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 510

⁴⁵ Farrell, N.; Ha, T. T. B.; Souchard, J. P.; Wimmer, F. L.; Cros, S.; Johnson, N. P. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2240

⁴⁶ Farrell, N.; Kelland, L. R.; Roberts, J. D.; Van Beusichem, M. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 5065

⁴⁷ Zou, Y.; Van Houten, B.; Farrell, N. *Biochemistry.* **1993**, *32*, 9632

⁴⁸ Farrell, N. in *Metal Ions in Biological Systems*, ed. Sigel, H., Marcel Dekker Inc., New York, **1996**, vol 32, pp. 603-639

General introduction

ii) L = imino ligand (such as iminoethers and ketimines) and L' = ammine or a second molecule of imino ligand^{49,50,51,52,53} and iii) L = aliphatic amines and L' = a second aliphatic amine.^{54,55,56,57,58} These last mentioned studies were development in Prof. Navarro-Ranninger's group, codirector of the present Thesis dissertation. The remaining class includes Pt^{IV} complexes of general formula *trans*-[PtCl₂X₂(L)(L')] (X = hydroxido, carbamato, or carboxylato ligands; L, L' = ammine or amine).^{59,60}

In general, substitution of ammine ligands in the transplatin by more bulky ligands leads to compounds with higher *in vitro* tumor cell growth inhibitory potency, often active towards cisplatin resistant tumor cells, and in some cases also endowed with significant *in vivo* activity. From a mechanism point of view, the bulky ligands can retard substitution reactions of the two leaving chlorides, thus reducing the kinetic instability of *trans*-platinum compounds. On the other hand, DNA adducts formed by antitumor-active *trans*-platinum complexes are qualitatively different from those formed by cisplatin, thus demonstrating that cisplatin-like DNA adducts are not obligatory determinants for antitumor activity of platinum compounds.

⁴⁹ Coluccia, M.; Nassi, A.; Loseto, F.; Boccarelli, A.; Mariggio, M. A.; Giordano, D.; Intini, F. P.; Caputo, P.; Natile, G. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 510

⁵⁰ Coluccia, M.; Boccarelli, A.; Mariggio, M. A.; Cardelicchio, N.; Caputo, P. A.; Intini, F. P.; Natile, G. *Chem. Biol. Interact.* **1995**, *98*, 251

⁵¹ Coluccia, M.; Mariggio, M. A.; Boccarelli, A.; Loseto, F.; Cardelicchio, N.; Caputo, P. A.; Intini, F. P.; Pacifico, C.; Natile, G. in *Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy*, ed. Pinedo H. M. and Schornagel J. H., Plenum Press, New York, **1996**, pp. 27-35

⁵² Intini, F. P.; Boccarelli, A.; Francia, V. C.; Pacifico, C.; Sivo, M. F.; Natile, G.; Giordano, D.; De Rinaldis, P.; Coluccia, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 768

⁵³ Boccarelli, A.; Intini, F. P.; Sasanelli, R.; Sivo, M. F.; Coluccia, M.; Natile, G. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 829

⁵⁴ Montero, E. I.; Díaz, S.; González-Vadillo, A. M.; Pérez, J. M.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4264

⁵⁵ Pérez, J. M.; Montero, E. I.; González-Vadillo, A. M.; Álvarez-Valdés, A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 37

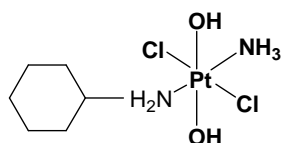
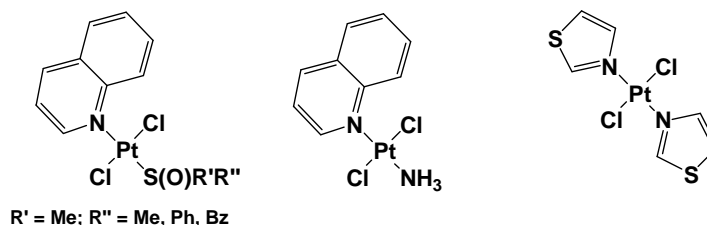
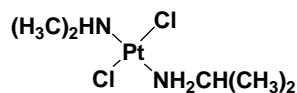
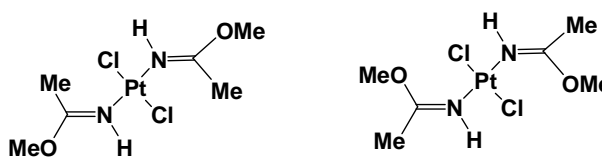
⁵⁶ Pérez, J. M.; Montero, E. I.; González-Vadillo, A. M.; Solans, X.; Font-Bardia, M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2411

⁵⁷ Pérez, J. M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2000**, *35*, 109

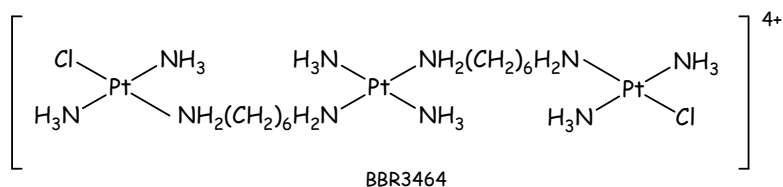
⁵⁸ Montero, E. I.; Pérez, J. M.; Schwartz, A.; Fuertes, M. A.; Malinge, J. M.; Alonso, C.; Leng, M.; Navarro-Ranninger, C. *ChemBioChem.* **2002**, *3*, 61

⁵⁹ Kelland, L. R.; Barnard, C. F. J.; Mellish, K. J.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Bryant, A.; Murrer, B. A.; Harrap, K. R. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5618

⁶⁰ Mellish, K. J.; Barnard, C. F. J.; Murrer, B. A.; Kelland, L. R. *Int. J. Cancer.* **1995**, *62*, 717

Kelland *et al.*, 1994Farrell *et al.*, 1992Navarro-Ranninger *et al.*, 1999Natile *et al.*, 1993Figure 1.7 Schematic drawing of the structural formulas of the active *trans*-Pt complexes

In addition, polynuclear complexes containing platinum in *trans* configuration have to be mentioned as a new series of active platinum complexes.



General introduction

Complex BBR3464 is the most investigated compound of this type and has been claimed as the first platinum compound within the polynuclear class to be studied in clinical trials. However, the clinical development of BBR3464 has been stopped after initial phase II trials because it has shown a relatively poor response rate.¹⁵

Some of the novel trends found in the bibliography regarding new metal-based anticancer agents are, for example:

ii) Polynuclear platinum cationic complexes with fluorescent linking ligands, which are a promising class of new platinum anticancer drugs, because can be monitored by electronic microscopy to investigate their cellular processing.^{61,62}

i) Metallosupramolecular architectures are also recent discoveries of new anticancer agents which illustrate non-covalent DNA interactions in drug design.⁶³

iii) Heterodinuclear DNA-targeting agents containing copper complexes of 3-Clip-Phen⁹ and platinum moiety is currently in progress by Prof Reedijk *et al.*⁶⁴ These compounds combine the abilities of the two separate active metallic centres.

Design, development and potential of Pt^{IV} anticancer complexes

The desires to develop an orally active platinum drug, to improve quality of patients' life, and to expand platinum chemotherapy to outpatient treatment, led to the design of several Pt^{IV} complexes.

The Pt^{IV} compounds have generated considerable interest, also because of their increased kinetic inertness allowing more of the drug to reach intact the cell, rather than reacting with extracellular biomolecules, such plasma proteins.⁶⁵

⁶¹ Jansen, B. A. J.; Wielaard, P.; Kalayda, G. V.; Ferrari, M.; Molenaar, C.; Tanke, H. J.; Brouwer, J.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 403

⁶² Kalayda, G. V.; Bart, B. A. J. A.; Molenaar, C.; Wielaard, P.; Hans J. T.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 414

⁶³ Hannon, M. J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 280

⁹ 3-Clip-Phen: 1-(1,10-phenanthrolin-3-yloxy)-3-(1,10-phenanthrolin-8-yloxy)propan-2-amine-Cl₂

⁶⁴ Hoog, P.; Boldron, C.; Gamez, P.; Sliedregt-Bol, K.; Roland, I.; Pitié, M.; Kiss, R.; Meunier, B.; Reedijk, J. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3148

⁶⁵ Hall, M. D.; Hambley, T. W. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 49

Modifications on the axial ligands can alter the complexes' ability to enter tumor cells before reduced to active Pt^{II} complexes. Some physicochemical properties of the *trans*-Pt^{IV} complexes, i.e., lipophilicity^{†,65} and reduction potential, depend on the nature of the axial ligands. Moreover, the axial ligands themselves can confer additional cytotoxicity upon release.

The investigations into the photochemistry of platinum diazide compounds recently developed by Prof Sadler *et al.* is an example of the potential of Pt^{IV} anticancer complexes and may lead to new routes for the synthesis of next generation drugs.^{66,67}

Despite this potential for drug design, no Pt^{IV} complex is to date an approved drug for clinical use. For this reason, an improved understanding of the chemistry, electrochemistry, and biological effect of the Pt^{IV} complexes is needed. Knowledge of the mechanism of action will allow the preparation of stable complexes with predictable structures, substitution rates, redox potentials, and the establishment of preliminary structure-activity relationships.

[†] lipophilicity (or hydrophobicity) as measured by the relative solubility in water and chloroform, partition between these solvents has been investigated as a factor relevant to chemotherapeutic activity of platinum complexes since the activity of cisplatin was discovered

⁶⁶ Mackay, F. S.; Woods, J. A.; Moseley, H.; Ferguson, J.; Dawson, A.; Parsons, S.; Sadler, P. J. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3155

⁶⁷ Bednarski, P. J.; Grünert, R.; Zielzki, M.; Wellner, A.; Mackay, F. S.; Sadler, P. J. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 61

1.2 Objectives and outline

1.2.1 Objectives

The objectives of this PhD project are based in the search for new antitumor $trans$ -Pt^{II} and Pt^{IV} complexes with non conventional structures, such as $trans$ -[PtCl₂(amine)(amine')] and $trans$ -[PtCl₂(OH)₂(amine)(amine')]. The hydrolytic mechanism of the Pt^{II} complexes and their final products in this process are also approached.

On the basis of the results obtained in previous cytotoxicity studies for $trans$ -Pt^{II} and Pt^{IV}, and with the aim of studying the steric hindrance effect on their cytotoxic activity, we have decided to synthesize, the following two complexes: $trans$ -[PtCl₂(dimethylamine)(methylamine)] and $trans$ -[PtCl₂(OH)₂(dimethylamine)(methylamine)] in which the amines ligands, dimethylamine and methylamine, are not as bulky as the isopropylamine ligand. We have also evaluated the effect of those novel complexes and some others previously reported ($trans$ -[PtCl₂(dimethylamine)(isopropylamine)], $trans$ -[PtCl₂(isopropylamine)(methylamine)] and theirs Pt(IV) counterparts) on the cytotoxic activity. We have performed the screening against various cancer cell lines used at the NCI for *in vitro* screens: MCF-7 (adenocarcinoma, from human mammary gland), NCI-H460 (large cell lung cancer from human), and SF268 (central nervous system epithelial cancer).

To investigate their behaviour in aqueous solution under physiologically relevant conditions, we have also synthesized and characterized the platinum ¹⁵N-labelled derivatives for: cis -[PtCl₂(¹⁵N-amine)₂] (amine = isopropylamine or dimethylamine) and $trans$ -[PtCl₂(¹⁵N-isopropylamine)(¹⁵N-methylamine)], $trans$ -[PtCl₂(¹⁵N-dimethylamine)(¹⁵N-methylamine)] and $trans$ -[PtCl₂(¹⁵N-dimethylamine)(¹⁵N-isopropylamine)] and used the 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectroscopy technique as a main tool. In addition, studies of conductimetry have been used to analyze the formation of the reactive platinum aquated species. Furthermore, a comparison with the values deduced from the 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectroscopy studies has been also approached.

Previous photochemical studies on cisplatin, transplatin and [Pt(en)Cl₂] have reported that irradiation induces substitution of chloro ligands by solvent molecules, either H₂O or DMSO.^{68,69} In order to examine the behaviour of the $trans$ -aliphatic amines Pt^{II} in aqueous solution at the presence of light, and whether the reaction of these complexes with nucleobases is affected by irradiation, we have studied the photolysis of these complexes and their photoreaction with nucleobases.

⁶⁸ Perumareddi, J. R.; Adamson, A. W. *J. Phys. Chem.* **1968**, *72*, 414

⁶⁹ Fry, H.; Deal, C.; Barr, E.; Cummings, S. D. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2002**, *150*, 37

Objectives and outline

It is widely believed that reduction of Pt^{IV} to Pt^{II} is essential for the anticancer activity of Pt^{IV} complexes.⁶⁵ To date, the Pt^{IV} complexes antitumoral activity *in vitro* has not shown to be clearly higher than their Pt^{II} counterparts, but it has been demonstrated by the pharmacokinetic studies of the three Pt^{IV} complexes in clinical trials that reduction potential might influence on their biological behaviour.⁶⁵

As the variation of the axial ligand, not only produced modifications in their potential but also in their solubility, uptake, and pharmacological properties, one more goal for this project, was the synthesis and the potential studies of the analogues Pt^{IV} complexes: *trans*-[PtCl₂(OH)₂(isopropylamine)(methylamine)], *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimethylamine)(methylamine)] and *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimethylamine)(isopropylamine)].

Based on the assumption, that reduction to Pt^{II} is essential for the anticancer activity of Pt^{IV} complexes, and based also on the knowledge of their ability to be photoreduced to the counterpart Pt^{II} species, we have also study the effect of the irradiation on *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimethylamine)(isopropylamine)] complex. Those results together with the potential studies might provide insights into the behaviour of these complexes.

1.2.2 Outline

This manuscript includes six chapters. Chapter 1 has been written in English and includes an initial general introduction, the objectives and purpose of this thesis, and the discussion. The discussion has been divided into five main parts:

- i. Synthesis, characterization of *trans*-Pt^{II} and Pt^{IV} complexes and cytotoxicity studies in SF268, MCF-7 and NCI-H460 cancer cell lines.
- ii. Aquation studies of *trans*-Pt^{II} complexes by 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR and conductimetry.
- iii. Photoactivation of *trans*-Pt^{II} complexes in aqueous solution and photoinduction reactivity with nucleobases.
- iv. Photochemistry and electrochemistry studies of dihydroxido *trans*-Pt^{IV} complexes.

Each of these parts consists of three sections: 1. Introduction, 2. Experimental and 3. Results. The conclusions of this project are presented at the end of the manuscript, first in English and followed the Spanish translation.

Chapters 2-6 have been writing in Spanish and follow the same structure used in the English version. References are numbering separately in the English version from the Spanish.

1.3 Experimental, results and discussion

1.3.1 Synthesis, characterization of *trans*-Pt^{II} and Pt^{IV} complexes and cytotoxicity studies in SF268, MCF-7 and NCI-H460 cancer cell lines

1.3.1.1 Introduction

Transplatin analogues with aliphatic amines, such as *trans*-[PtCl₂(amine)(amine')] and *trans*-[PtCl₂(NH₃)(amine)] (Figure 1.8) were reported, for first time, by our group of research and represent one class of *trans* antitumor-active platinum complexes.^{54,55,56}

The mentioned complexes exhibit similar and higher cytotoxic activity than cisplatin against cancer cell lines sensitive (Jurkat, Hela, Vero)^{*} and resistant (HL-60, Pam 212-ras)[§] to this drug, respectively⁵⁴ (Table A1 appendix).

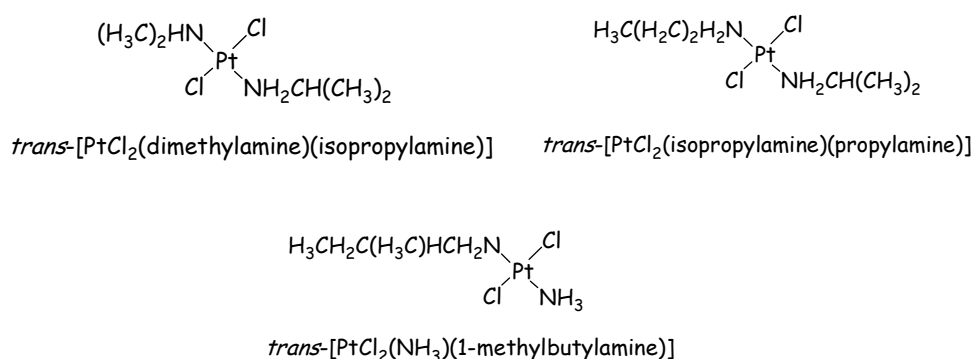


Figure 1.8 Structures of some active *trans*-Pt^{II} complexes with aliphatic amines

The cytotoxic activity of these reported complexes were analyzed with those of their corresponding *cis* analogues in tumor cell lines sensitive (CH1 and Pam 212)[†] and resistant to cisplatin (CH1-ras and Pam 212-ras).^{‡,§} The results indicated that *trans*-[PtCl₂(amine)(isopropylamine)] had better antitumor properties than its isomers *cis*-[PtCl₂(amine)(isopropylamine)]⁷⁰ (Table A1 appendix).

* Jurkat: human acute T-cell leukemia cell line; Hela: human cervix epithelial carcinoma cell line; Vero: Chlocebus kidney epithelial cell line

§ HL-60 human promyelocytic leukemia cell line with activation of *c-myc* and *N-ras* oncogene; Pam212-ras: murine keratinocytes transformed with the *H-ras* oncogene and resistant to cisplatin cell line

† CH1: human ovarian tumor cell line; Pam212: normal murine keratinocytes cell line

‡ CH1cisR: human ovarian tumor cell line resistant to cisplatin through enhanced DNA repair/tolerance

⁷⁰ Pantoja, E.; Álvarez-Valdés, A.; Pérez, J. M.; Navarro-Ranninger, C.; Reedijk, J. *Inorg. Chim. Acta.* **2002**, *339*, 525

In view of the results obtained for the complex *trans*-[PtCl₂(dimethylamine)(isopropylamine)], it was also tested in new cisplatin-sensitive (CH1 and A2780^x) and cisplatin-resistant (CH1cisR and A2780cisR^{*}) cancer cell lines (Table A1 appendix). The data showed that this complex:⁵⁸

- i) shows higher cytotoxic than cisplatin and transplatin
- ii) is able to circumvent cisplatin resistance
- iii) its ability to induce apoptosis is two-fold higher than cisplatin
- iv) the level of DNA interstrand cross-links (between complementary guanine and the complementary cytosine) induced by this complex is two and three time higher than those by cisplatin and transplatin, respectively

In addition, the antitumor properties of the *trans*-Pt^{IV} complex, *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimethylamine)(isopropylamine)] were also evaluated in comparison to its corresponding *trans*-Pt^{II} counterpart in cisplatin-sensitive and resistant human ovarian tumor cell lines. The results showed that *trans*-Pt^{IV} complex exhibits significant cytotoxicity against resistance 41McisR^ψ and CH1cisR[‡] ovarian tumor cell lines. The counterpart *trans*-Pt^{II} named *trans*-[PtCl₂(dimethylamine)(isopropylamine)] compound circumvents cisplatin resistance only in CH1cisR cells. This complex did not show *in vivo* antitumor activity in human ovarian carcinoma xenografts in mice, in contrast to its corresponding *trans*-Pt^{IV} counterpart.⁷¹

^x A2780: human ovarian tumor cell line

^{*} A2780cisR: cisplatin-resistant human ovarian tumor cell line

^ψ 41McisR: human ovarian tumor resistant to cisplatin cell line primarily through reduced drug accumulation

⁷¹ Pérez, J. M.; Kelland, L. R.; Montero, E. I.; Boxall, F. E.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 933

1.3.1.2 Experimental

1.3.1.2.1 Materials

Starting materials K_2PtCl_4 , methylamine, isopropylamine and dimethylamine were purchased from Prolabo, Chambers Hispania, S. L. and Sigma-Aldrich.

All solvents $CHCl_3$, THF, Et_2O and $(CH_3)_2CO$ were purchased from Sigma-Aldrich and purified by standard methods prior to use.⁷² The deuterated solvents $CDCl_3$, $DMSO-d_6$ and D_2O were obtained from SDS.

1.3.1.2.2 Instrumentation

The C, H and N analyses were performed on a LECO CHNS-932 microanalyzer.

For characterization of the complexes NMR spectra were recorded on either Bruker AMX-300 (1H 300.13 MHz, ^{13}C 75.47 MHz, ^{195}Pt 64.53 MHz) or DRX-500 (1H 500.13 MHz, ^{13}C 125.76 MHz) spectrometers. 1H and ^{13}C chemical shifts are reported relative to tetramethylsilane (Me_4Si) or to residual signals of deuterated solvents and ^{195}Pt NMR spectra are referenced to Na_2PtCl_6 as external reference.

Two methods and instruments were used to obtain X-ray structures:

Method A: Data collection for compound **2-IV** was performed on a Bruker Kappa APEX II CCD area-detector X-ray diffractometer. Cryocooling to 100K was carried out by using an Oxford Cryosystems 700 Series cryostream cooler. Intensity measurements were collected using graphite-monochromated Mo K_α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) from a sealed X-ray tube with a monocapillary collimator. The data were collected using 1.0° wide ω -scans or φ -scans, crystal-to-detector distance of 3.5 cm. The substantial redundancy in data allows semiempirical absorption corrections (SADABS) to be applied using multiple measurements of symmetry-equivalent reflections. The raw intensity data frames were integrated with the SAINT program, which also applied corrections for Lorentz and polarization effects. The software package SHELXTL version 6.10 was used for space group determination, structure solution and refinement. The structure was solved by direct methods or Paterson method (SHELXS-97), completed with difference Fourier syntheses, and refined with full-matrix least-

⁷² Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. in *Purification of Laboratory Chemicals*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997

squares using SHELXL-97 minimizing $\omega(F_0^2 - F_c^2)^2$. Weighted R factors (R_w) and all goodness of fit S are based on F^2 ; conventional R factors (R) are based on F . All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic displacement parameters. All scattering factors and anomalous dispersions factors are contained in the SHELXTL 6.10 program library.

Method B: Data collection for compounds **1** and **1-IV** was performed on an Enraf-Nonius Kappa CCD diffractometer using graphite-monochromated Mo-K α radiation ($\lambda = 0.71069 \text{ \AA}$). Data reduction and cell refinement were carried out using the programs DENZO and SCALE-PACK.⁷³ All the structures were solved by standard Patterson methods⁷⁴ and refined by full-matrix least-squares methods based on F^2 using the SHELXTL-PLUS,⁷⁵ SHELXL-97,⁷⁶ and WinGX⁷⁷ programs. Non-hydrogen atoms in the structures were refined anisotropically. Hydrogen atoms were placed in geometrically idealized positions according to molecular geometry considerations and refined with isotropic displacement parameters according to the riding model.

1.3.1.2.3 Synthesis of *cis*-Pt^{II} complexes

The syntheses of *cis*-[PtCl₂(amine)₂] complexes were based on previously procedures.⁵⁴

cis-[PtCl₂(dimethylamine)₂]

cis-[PtCl₂(dma)₂] was synthesised by treating K₂PtCl₄ (500 mg; 1.2 mmol) with 4 equivalents of dimethylamine (600 μ L; 4.8 mmol) in H₂O. The reaction was stirred at room temperature in dark conditions for 24 hours. The yellow residue was filtered off, washed with water, chloroform and air dried.

cis-[PtCl₂(dma)₂] yellow solid. Yield 60%. Elemental analysis CHN, found: C, 13.66; H, 3.93; N, 7.90. Calc for C₄H₁₄N₂Cl₂Pt: C, 13.48; H, 3.96; N, 7.86. δ_{H} (300.13 MHz; DMSO-d₆) 2.52 (6 H, d, J_{HH} 5.7, CH₃), 5.69 (1 H, bs, NH); δ_{C} (125.76 MHz; DMSO-d₆) 43.6.

⁷³ Otwinowski, Z.; Minor, W. DENZO and SCALEPACK, *Methods Enzymol.* **1997**, 276, 307

⁷⁴ Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr. A.* **1990**, 46, 467

⁷⁵ Sheldrick, G. M. SHELXTL-PLUS (VMS), Siemens Analytical X-Ray Instruments, Madison, WI, **1990**

⁷⁶ Sheldrick, G. M. SHELXL-97, program for crystal structure refinement, University of Goettingen, Germany, **1993**

⁷⁷ Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, 32, 837

***cis*-[PtCl₂(isopropylamine)₂]**

K₂PtCl₄ (500 mg; 1.2 mmol) was suspended in a mixture of THF-H₂O and isopropylamine (413 μL; 4.8 mmol) was added using a ratio 4:1 (amine:Pt). After stirring the mixture for 48 hours in the dark at room temperature, the yellow precipitate was collected, washed with water, chloroform and air dried.

cis-[PtCl₂(ipa)₂] yellow solid. Yield 82%. Elemental analysis CHN, found: C, 18.10; H, 4.56; N, 7.30. Calc for C₆H₁₈N₂Cl₂Pt: C, 18.75; H, 4.72; N, 7.29. δ_H(300.13 MHz; DMSO-d₆) 1.2 (6 H, d, J_{HH} 6.5, CH₃), 3.09 (1 H, sept, J_{HH} 6.5, CH), 4.74 (2 H, bs, NH₂); δ_C(125.76 MHz; DMSO-d₆) 23.52 (CH₃), 47.6 (CH).

1.3.1.2.4 Synthesis of *trans*-Pt^{II} complexes

We have synthesized: *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (**1**), *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] (**2**) and *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (**3**). The preparation of these *trans* complexes was achieved by literature procedures.⁵⁴ The synthesis and characterization of the new complex **2** have been performed, for first time in this PhD project.

***trans*-[PtCl₂(isopropylamine)(methylamine)] (**1**)**

cis-[PtCl₂(ipa)₂] (150 mg; 0.39 mmol) in deionised H₂O (4.5 mL) was mixed with 20 equivalents of methylamine (675 μL; 7.8 mmol). The mixture was stirred and heated to reflux T^a. Once a clear colourless solution was obtained, it was allowed to cool in an ice bath. Then, hydrochloric acid 35% (5.07 mmol in 447 μL) was added. The reaction mixture was heated to reflux T^a for 24 h. After cooling the product was collected by filtration, washed with water and dried in vacuum.

trans-[PtCl₂(ipa)(ma)] yellow solid. Yield 59%. Elemental analysis CHN, found: C, 13.55; H, 3.76; N, 7.96. Calc for C₄H₁₄N₂Cl₂Pt: C, 13.48; H, 3.96; N, 7.86. δ_H(300.13 MHz; CDCl₃) 1.33 (6 H, d, J_{HH} 6.5, CH₃-ipa), 2.57 (3 H, t, J_{HH} 6.5, CH₃-ma), 3.31 (1 H, sept, J_{HH} 6.5, CH), 3.41 (4 H, bs, NH₂-ipa and NH₂-ma); δ_C(75.47 MHz; CDCl₃) 23.97 (CH₃-ipa), 33.22 (CH₃-ma), 48.38 (CH); δ_{Pt}(64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2175.

***trans*-[PtCl₂(dimethylamine)(methylamine)] (**2**)**

cis-[PtCl₂(dma)₂] (150 mg; 0.42 mmol) was treated with 20 equivalents of methylamine (725 μL; 8.4 mmol) in H₂O (4.5 mL). The mixture was stirred and heated to reflux T^a. The solvent of the resulting colourless solution was removed, yielding a white solid. The final solid was then dissolved in water (3 mL) and

hydrochloric acid 35% (5.4 mmol in 480 μL) was added, and then the solution was refluxed for 24 h. The final pale yellow solid was filtered, washed with water and dried air.

trans-[PtCl₂(dma)(ma)] yellow solid. Yield 64%. Elemental analysis CHN, found: C, 10.48; H, 3.34; N, 8.14. Calc for C₃H₁₂N₂Cl₂Pt: C, 10.53; H, 3.53; N, 8.18. δ_{H} (300.13 MHz; CDCl₃) 2.55 (3 H, t, J_{HH} 6.5, CH₃-ma), 2.66 (6 H, d, J_{HH} 6, J_{HPt} 30.5, CH₃-dma), 3.21 (2 H, bs, NH₂), 3.84 (1 H, bs, NH); δ_{C} (75.47 MHz; CDCl₃) 33.44 (CH₃-ma), 43.46 (CH₃-dma); δ_{Pt} (64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2208.

***trans*-[PtCl₂(dimethylamine)(isopropylamine)] (3)**

cis-[PtCl₂(dma)₂] (320 mg; 0.89 mmol) was suspended in 3.2 mL of H₂O. Four equivalents of isopropylamine (309 μL ; 3.6 mmol) were added. The mixture was stirred to reflux T^a for 1 h to give a clear solution which was placed on ice and filtered. Hydrochloric acid 35% (11.57 mmol in 1020 μL) was added and the solution heated to reflux T^a for 20 h. The yellow product obtained was filtered off, washed with ice cold water and dried in vacuum.

trans-[PtCl₂(dma)(ipa)] yellow solid. Yield 77%. Elemental analysis CHN, found: C, 16.64; H, 4.10; N, 7.96. Calc for C₅H₁₆N₂Cl₂Pt: C, 16.22; H, 4.35; N, 7.56. δ_{H} (300.13 MHz; CDCl₃) 1.33 (6 H, d, J_{HH} 6.5, CH₃-ipa), 2.67 (6 H, d, J_{HH} 6, CH₃-dma), 3.18 (2 H, bs, NH₂), 3.29 (1 H, sept, J_{HH} 6.5, CH), 3.86 (1 H, bs, NH); δ_{C} (75.47 MHz; CDCl₃) 24.1 (CH₃-ipa), 43.3 (CH₃-dma), 48.9 (CH); δ_{Pt} (64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2212.

1.3.1.2.5 Synthesis of *trans*-Pt^{IV} complexes

We have synthesized and characterized the following *trans*-Pt^{IV} complexes: *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] (**1-IV**), *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] (**2-IV**) and *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)] (**3-IV**). This synthesis was adapted and modified from the method previously described.^{71,78}

Here, we described the synthesis and characterization of a new *trans*-Pt^{IV}, *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] (**2-IV**).

⁷⁸ Montero, E. I. in PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Química Inorgánica. Madrid, 2002

***trans*-[PtCl₂(OH)₂(isopropylamine)(methylamine)] (1-IV)**

trans-[PtCl₂(ipa)(ma)] (1) (70 mg; 0.2 mmol) was suspended in 850 μ L of H₂O and hydrogen peroxide solution 33% (412 μ L; 4.4 mmol) was added. The mixture was stirred and heated to reflux T^a in the darkness for 4 h. After cooling, the yellow solution was filtered and reduced to a minimum amount. Acetone was added and the solution was placed in an ice-bath to induce the precipitation; the resultant yellow solid was filtered and washed with acetone.

trans-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] yellow solid. Yield 45%. Elemental analysis CHN, found: C, 12.16; H, 4.07; N, 7.06. Calc for C₄H₁₆N₂Cl₂O₂Pt: C, 12.31; H, 4.13; N, 7.18. δ_{H} (300.13 MHz; D₂O) 1.27 (6 H, d, J_{HH} 6.5, CH₃-ipa), 2.27 (3 H, s, J_{HPt} 26, CH₃-ma), 3.28 (1 H, sept, J_{HH} 6.5, CH); δ_{C} (75.47 MHz; D₂O) 22.2 (CH₃-ipa), 29.9 (CH₃-ma), 47.6 (CH); δ_{Pt} (64.53 MHz; D₂O; Na₂PtCl₆) 749.

***trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimethylamine)(methylamine)] (2-IV)**

trans-[PtCl₂(dma)(ma)] (2) (287 mg; 0.84 mmol) was suspended in H₂O (3.5 mL) and excess of hydrogen peroxide solution 33% (1730 μ L; 18.5 mmol) added. The mixture was stirred and heated to reflux T^a for 2 hours in the dark. After cooling, the yellow solution was filtered and reduced to a minimum. Acetone was added and the solution was placed in an ice-bath to induce the precipitation. The yellow solid was collected, washed with acetone and dried under reduced pressure.

trans-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] yellow solid. Yield 50%. Elemental analysis CHN, found: C, 9.71; H, 4.04; N, 7.41. Calc for C₃H₁₄N₂Cl₂O₂Pt: C, 9.58; H, 3.75; N, 7.44. δ_{H} (300.13 MHz; D₂O) 2.33 (3 H, s, J_{HPt} 27, CH₃-ma), 2.66 (6 H, s, J_{HPt} 23, CH₃-dma); δ_{C} (75.47 MHz; D₂O) 30.4 (CH₃-ma), 41.9 (CH₃-dma); δ_{Pt} (64.53 MHz; D₂O; Na₂PtCl₆) 739.

***trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimethylamine)(isopropylamine)] (3-IV)**

trans-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)] (3) (220 mg; 0.59 mmol) in 2.5 mL of H₂O was treated with 22 equivalents of hydrogen peroxide solution 33% (1218 μ L; 13 mmol). The mixture was stirred and heated to reflux T^a for 1.5 hours in the dark. After cooling, the solution was reduced to a minimum and acetone was added and then the mixture was placed in an ice-bath to induce precipitation. The product was collected by filtration as a yellow solid, washed with acetone and dried under vacuum.

trans-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)] yellow solid. Yield 54%. Elemental analysis CHN, found: C, 14.66; H, 4.43; N, 6.81. Calc for C₅H₁₈N₂Cl₂O₂Pt: C, 14.85; H, 4.48; N, 6.93. δ_{H} (300.13 MHz; D₂O) 1.38 (6 H, d, J_{HH} 6.5, CH₃-ipa), 2.55 (6 H, s, J_{HPt} 23.5, CH₃-dma), 3.37 (1 H, sept, J_{HH} 6.5, CH); δ_{C} (75.47 MHz; D₂O) 22.2 (CH₃-ipa), 41.8 (CH₃-dma), 47.8 (CH); δ_{Pt} (64.53 MHz; D₂O; Na₂PtCl₆) 798.

1.3.1.2.6 Structural determination by X-ray diffraction

trans-[PtCl₂(isopropylamine)(methylamine)] (1)

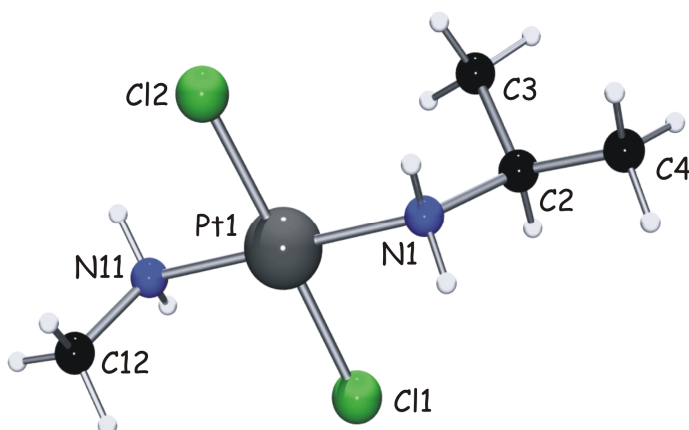


Figure 1.9 View of *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] with atom numbering scheme

Table 1.2 Hydrogen-bonding interactions of complex 1[‡]

Distances (Å)		Distances (Å)	
N1(H)···Cl1 ⁽ⁱ⁾	3.388(9)	N1(H)···Cl2 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	3.404(9)
N11(H)···Cl1 ⁽ⁱⁱ⁾	3.361(9)	N11(H)···Cl2 ^(iv)	3.359(10)

[‡]Symmetry operations: (i) x-1, y, z; (ii) x, y+1, z; (iii) x, y-1, z; and (iv) x+1, y, z

Table 1.3 Crystallographic data for compound 1

Formula weight (g mol ⁻¹)	356.16
Crystal system	monoclinic
Space group	P21/c
<i>Unit cell dimensions</i>	
<i>a</i> (Å)	6.0480(12)
<i>b</i> (Å)	6.0370(12)
<i>c</i> (Å)	28.637(6)
<i>α</i> (°)	90
<i>β</i> (°)	93.70(3)
<i>γ</i> (°)	90
<i>Z</i>	4
<i>V</i> (Å ³)	1043.4(4)
<i>D</i> _{calcd} , (g cm ⁻³)	2.267
<i>μ</i> (Mo Kα) (mm ⁻¹)	13.897
<i>F</i> (000)	656
<i>θ</i> range (°)	2.85 - 28.06
No. reflections collected	2267
No. reflections observed	1320
<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)	
No. parameters refined	81
<i>R</i> ₁ (obs. data)	0.0494
<i>wR</i> ₂ (obs. data)	0.0872
Goodness-of-fit, <i>S</i>	1.077
Residual <i>ρ</i> _{max} , <i>ρ</i> _{min} (e Å ⁻³)	1.695, -1.224

Table 1.4 Selected distances (Å) and angles (°) in complex 1

Distances (Å)		Angles (°)	
Pt1-N1	2.028(8)	N1-Pt1-Cl2	90.0(2)
Pt1-N11	2.036(9)	N1-Pt1-Cl1	90.5(2)
Pt1-Cl1	2.296(3)	N11-Pt1-Cl1	89.7(3)
Pt1-Cl2	2.290(3)	N11-Pt1-Cl2	89.8(3)
N1-C2	1.53(3)	N1-Pt1-N11	179.8(4)
C2-C4	1.500(10)	Cl1-Pt1-Cl2	178.44(12)
C2-C3	1.502(10)	Pt1-N11-C12	115.1(8)
N11-C12	1.437(15)	Pt1-N1-C2	120.8(10)

***trans*-[PtCl₂(OH)₂(isopropylamine)(methylamine)] (1-IV)**

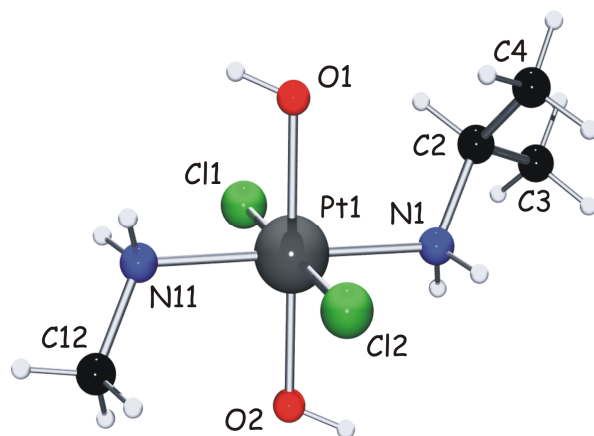


Figure 1.10 View of *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] with atom numbering scheme

Table 1.5 Crystallographic data for compound **1-IV**

Formula weight (g mol ⁻¹)	390.18
Crystal system	monoclinic
Space group	P21/c
<i>Unit cell dimensions</i>	
<i>a</i> (Å)	8.4160(17)
<i>b</i> (Å)	7.3210(15)
<i>c</i> (Å)	18.708(5)
<i>a</i> (°)	90
<i>β</i> (°)	115.99(2)
<i>γ</i> (°)	90
<i>Z</i>	4
<i>V</i> (Å ³)	1036.1(4)
<i>D</i> _{calcd} , (g cm ⁻³)	2.501
<i>μ</i> (Mo Kα) (mm ⁻¹)	14.02
<i>F</i> (000)	728
<i>θ</i> range (°)	2.42 - 22.19
No. reflections collected	1296
No. reflections observed	836
<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)	
No. parameters refined	100
<i>R</i> ₁ (obs. data)	0.0278
<i>wR</i> ₂ (obs. data)	0.0642
Goodness-of-fit, <i>S</i>	0.975
Residual <i>ρ</i> _{max} , <i>ρ</i> _{min} (e Å ⁻³)	0.693, -1.12

Table 1.6 Selected distances (Å) and angles (°) in complex **1-IV**

Distances (Å)		Angles (°)	
Pt1-O1	2.011(8)	O1-Pt1-O2	179.6(3)
Pt1-O2	2.016(8)	O1-Pt1-N1	92.7(4)
Pt1-N1	2.071(9)	O2-Pt1-N1	87.7(4)
Pt1-N11	2.075(9)	O1-Pt1-N11	88.0(4)
Pt1-Cl2	2.307(3)	O2-Pt1-N11	91.7(3)
Pt1-Cl1	2.312(3)	N1-Pt1-N11	179.0(4)
		O1-Pt1-Cl2	89.1(3)
		O2-Pt1-Cl2	90.7(2)
		N1-Pt1-Cl2	91.9(3)
		N11-Pt1-Cl2	88.9(3)
		O1-Pt1-Cl1	90.8(3)
		O2-Pt1-Cl1	89.4(2)
		N1-Pt1-Cl1	88.0(3)
		N11-Pt1-Cl1	91.3(3)
		Cl2-Pt1-Cl1	179.84(13)
		C2-N1-Pt1	119.0(8)
		C12-N11-Pt1	117.2(8)
		C4-C2-N1	110.8(12)
		C4-C2-C3	112.9(12)
		N1-C2-C3	108.7(11)

Table 1.7 Hydrogen-bonding interactions of complex **1-IV**[§]

Distances (Å)	
N11(H) ...O1 ⁽ⁱ⁾	2.802(12)
N1(H) ...O2 ⁽ⁱⁱ⁾	2.877(12)

[§] Symmetry operations: (i) -x, y-1/2, -z+1/2 and (ii) -x+1, y+1/2, -z+1/2

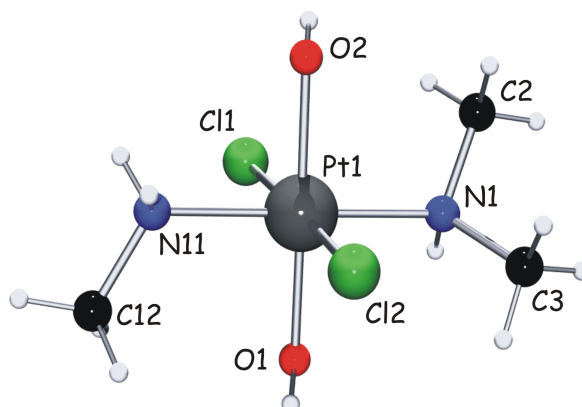
***trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimethylamine)(methylamine)] (2-IV)**Figure 1.11 View of *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] with atom numbering scheme

Table 1.8 Selected distances (Å) and angles (°) in complex 2-IV

Distances (Å)		Angles (°)	
Pt1-O1	1.989(2)	O1-Pt1-O2	178.83(8)
Pt1-O2	2.0146(19)	O1-Pt1-N11	94.38(9)
Pt1-N11	2.056(2)	O2-Pt1-N11	85.37(9)
Pt1-N1	2.081(2)	O1-Pt1-N1	85.29(9)
Pt1-Cl2	2.3045(7)	O2-Pt1-N1	94.93(9)
Pt1-Cl1	2.3104(7)	N11-Pt1-N1	177.91(9)
		O1-Pt1-Cl2	91.29(7)
		O2-Pt1-Cl2	89.85(6)
		N11-Pt1-Cl2	88.02(7)
		N1-Pt1-Cl2	94.05(7)
		O1-Pt1-Cl1	89.14(7)
		O2-Pt1-Cl1	89.71(6)
		N11-Pt1-Cl1	88.50(7)
		N1-Pt1-Cl1	89.43(7)
		Cl2-Pt1-Cl1	176.51(2)
		C12-N11-Pt1	117.08(19)
		C2-N1-Pt1	114.43(18)
		C3-N1-Pt1	116.80(19)
		C2-N1-C3	108.2(3)

Table 1.9 Crystallographic data for compound **2-IV**

Formula weight (g mol ⁻¹)	430.2
Crystal system	triclinic
Space group	P-1
<i>Unit cell dimensions</i>	
<i>a</i> (Å)	6.1970(3)
<i>b</i> (Å)	8.1633(5)
<i>c</i> (Å)	12.9784(7)
<i>α</i> (°)	77.605(3)
<i>β</i> (°)	82.586(2)
<i>γ</i> (°)	74.228(2)
<i>Z</i>	2
<i>V</i> (Å ³)	615.36(6)
<i>D</i> _{calcd} , (g cm ⁻³)	2.322
<i>μ</i> (Mo Kα) (mm ⁻¹)	11.832
<i>F</i> (000)	408
<i>θ</i> range (°)	3.22 - 28.28
No. reflections collected	3024
No. reflections observed	2832
<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)	
No. parameters refined	141
<i>R</i> ₁ (obs. data)	0.0165
<i>wR</i> ₂ (obs. data)	0.0374
Goodness-of-fit, <i>S</i>	1.062
Residual <i>ρ</i> _{max} , <i>ρ</i> _{min} (e Å ⁻³)	1.116, -1.165

Table 1.10 Hydrogen-bonding interactions of complex **2-IV**[∅]

	Distances (Å)
O3...O3 ⁽ⁱ⁾	2.755(5)
O3...O2	2.700(3)
O3...O5 ⁽ⁱⁱ⁾	2.780(4)
O4...O4 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	2.754(5)
O4...O2	2.761(3)
O4...O5	2.732(4)
O5...O3 ^(iv)	2.732(3)
N11...O5	2.892(3)
N11...O4 ^(v)	2.874(3)
N11...O1 ^(vi)	2.750(3)

1.3.1.2.7 Biological studies

Reagents and compounds

The medium, PBS, FCS and trypsin were purchased from Sigma-Aldrich. Solvents and buffers were obtained from Sigma-Aldrich, Merck, Panreac and BDH.

Cisplatin was purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions of the compounds at a concentration of 0.5 mM in 10 mM NaClO₄ were kept in the dark at 25°C.

Cell lines and cultures conditions

Cytotoxic assays in NCI tumor cell lines were carried out in the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) by Dr. Amancio Carnero.

The cell line panel consisted of three human cancer cell lines, adenocarcinoma from human mammary gland (MCF-7), large cell lung cancer from human (NCI-H460) and central nervous system epithelial cancer (SF268). All cell

[∅] Symmetry operations: (i) -x+1, -y, -z+2; (ii) -x, -y+1, -z+2; (iii) -x+1, -y+1, -z+2; (iv) x, y+1, z; (v) -x, -y+1, -z+2 and (vi) -x, -y+1, -z+1

lines were grown in DMEM supplemented with 10% FCS, fungizone and penicillin/streptomycin.

Cytotoxicity assessment

Cell survival in compounds treated cultures was evaluated by using an adaptation of the crystal violet-staining assay from NCI.

The compounds were tested on 96-well trays. Cells growing in a flask were harvested just before they became confluent, counted using a haemocytometer and diluted with media thus adjusting the concentration to the required number of cells per 0.2 mL (volume for each well). Cells were then seeded in 96-well trays at a density between 1000 and 4000 cells/well, depending on the cell size. Cells were left to plate down and grow for 24 hours before adding the compounds.

The drugs were weighed and diluted with H₂O to get them into solution to a concentration of 10 mM. From here a "mother plate" with serial dilutions was prepared from this at 200X the final concentration in the culture. The appropriate volume of the compound solution (usually 2 µL) was added automatically (Beckman FX 96 tip) to media to make it up to the final concentration for each drug.

The medium was removed from the cells and replaced with 0.2 mL of medium dosed with the drug. Each concentration was assayed in triplicate. A control well set was obtained with the cells untreated just before adding the drugs (seeding control, number of cells starting the culture).

Cells were exposed to the six compounds for 96 hours and then washed twice with phosphate buffered saline before being fixed with 10% glutaraldehyde. Cells were washed twice and fixed with crystal violet 0.5% during 30 minutes. Then washed extensively, solubilized with 15% acetic acid and absorbance measured at 595 nm.

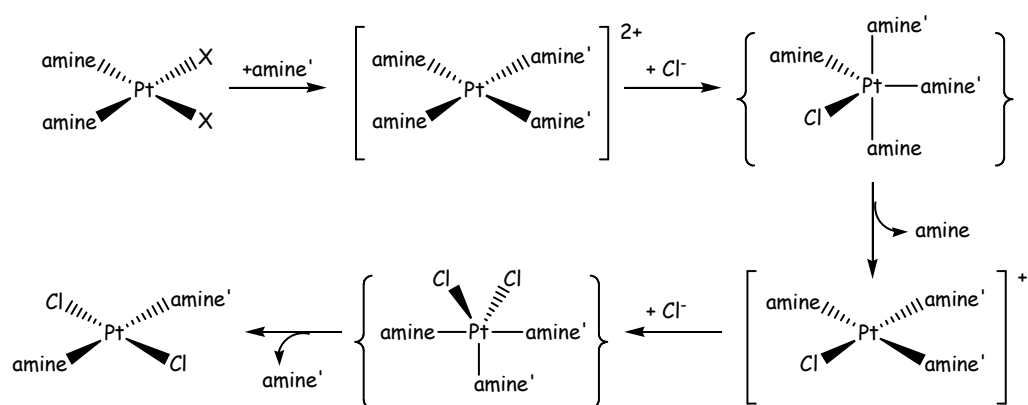
IC₅₀ values were calculated from curves constructed by plotting cell survival (%) versus compound concentration.

1.3.1.3 Results

1.3.1.3.1 Synthesis

The synthesis and characterization of *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] **1**, *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] **2**, *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] **3**, *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] **1-IV**, *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] **2-IV** and *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)] **3-IV** complexes were carried out. Previous synthesis of the appropriate *cis*-[PtCl₂(dma)₂] or *cis*-[PtCl₂(ipa)₂] complex is required.⁵⁴

The *trans* asymmetric Pt^{II} complexes were accomplished based on the *trans* effect and following the methodology published by our group of research.⁵⁴ The reaction involves direct substitution of both chloro ligands by amine to give intermediate *cis*-oriented tetraamine complex *cis*-[Pt(amine)₂(amine')₂]²⁺. Afterwards, this tetraamine complex is treated with hydrochloric acid to yield the desired *trans*-dichlorido complex. This well-established route exploits difference in the *trans* effect of halide and amine ligands in platinum complexes to achieve selective substitution and thus control the stereochemistry (Scheme 1.1).⁷⁹

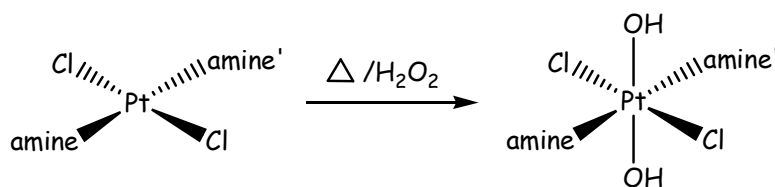


Scheme 1.1 Scheme of the synthesis pathways for *trans*-[PtCl₂(amine)(amine')] complexes

The *trans*-Pt^{IV} complexes are obtained from the *trans*-Pt^{II} complexes by oxidation with hydrogen peroxide. After the reaction, the stereochemistry of the

⁷⁹ Davies, J. A.; Hockensmith, C. M.; Kukushkin, V. Yu.; Kukushkin, Yu. N. in *Synthetic Coordination Chemistry: Theory and Practice*, Singapore, 1996, pp 452

trans-Pt^{IV} complexes is the same as the stereochemistry of the starting Pt^{II} complexes (Scheme 1.2).⁸⁰



Scheme 1.2 Synthesis of dihydroxido *trans*-Pt^{IV} complexes

1.3.1.3.2 Characterization by X-ray diffraction

trans-[PtCl₂(isopropylamine)(methylamine)] (1)

A view of *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] is depicted in Figure 1.9. The platinum atom is bound to two *trans* positioned methyl- and isopropylamine and two chloro ligands. Distances and angles around platinum and amines are as expected,⁵⁶ with distances Pt1-N1 2.028(8), Pt1-N11 2.036(9), Pt1-Cl1 2.296(3), and Pt1-Cl2 2.290(3); angles deviate slightly from right angle (Table 1.4). Geometrically, the methylamine ligand (C12) is placed over the plane defined by the square planar geometry of platinum (Pt1,Cl1,Cl2,N1,N11) with a dihedral angle (Pt1,N11,C12) of 89.97°, while the isopropylamine ligand is placed under this plane. Intermolecular interactions are observed involving chloro ligands and amino protons of neighbor molecules (Table 1.2). Crystal data and structure refinement are listed in Table 1.3.

trans-[PtCl₂(OH)₂(isopropylamine)(methylamine)] (1-IV)

A view of *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] is depicted in Figure 1.10. The platinum atom is bonded to two *trans* positioned methyl- and isopropylamine ligands, two hydroxido and two chloro ligands. Crystal structure data, bond lengths and bond angles are given in Table 1.5 and 1.6. The values of the distances are compared with those of the *cis,trans*-dichlorido-dihydroxido-

⁸⁰ Kelland, L. R.; Barnard, C. F. J.; Evans I. G.; Murrer, B. A.; Theobald, B. R. C.; Wyer, S. B.; Goddard, P. M.; Jones, M.; Valenti, M.; Bryant, A.; Rogers, P. M.; Harrap, K. R. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3016

bis(isopropylamine)-platinum,⁸¹ (ammine)-dichlorido-dihydroxy-((2,2,6,6-tetramethyl-1-oxypiperidin-4-yl)amine)-platinum(IV)⁸² and *cis,trans,cis*-dichlorido-dihydroxido-ammine-(2-picolinato)-platinum(IV)⁸³ complexes, but the angles can not be compared because the relative position of the ligands around the atom is different.

Geometrically, the methylamine ligand (C12) is placed over the planes defined by (Pt1,C11,C12,N1,N11) and (Pt1,O1,O2,N1,N11) with a dihedral angle (Pt1,N11,C12) of 65.54° and 25.16°, respectively, while the isopropylamine ligand is placed under these planes with a dihedral angle (Pt1,N11,C2) of 65.73° and 24.97°, respectively.

Intermolecular interactions are observed involving the oxygen of the hydroxide ligands and amino protons (Table 1.7)

***trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimethylamine)(methylamine)] (2-IV)**

A view of *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] is shown in Figure 1.11. Crystal data, and structure refinement is listed in Table 1.9. Distances and angles around platinum are similar than those of the complex **1-IV** (Table 1.8).

Geometrically, the methylamine ligand (C12) is placed over the plane defined by (Pt1,C11,C12,N1,N11) and on the plane defined by (Pt1,O1,O2,N1,N11) with a dihedral angle (Pt1,N11,C12) of 88.01° and 1.9°, respectively, while the dimethylamine ligand (C2 and C3) has the methyl group (C2) under the plane (Pt1,C11,C12,N1,N11) with a dihedral angle (Pt1,N1,C2) of 64.95° and slightly over the plane defined by (Pt1,O1,O2,N1,N11), with a dihedral angle (Pt1,N1,C2) of 25.47°.

Moreover, in this structure, there are three water molecules. The intermolecular interactions observed involving the complex and these water molecules are shown in Table 1.10.

1.3.1.3.3 Cytotoxicity

The main purpose of the cytotoxicity studies were to expand more data in this field, for the *trans*-Pt^{II} and Pt^{IV} complexes used in particular for this

⁸¹ Barnard, C. F. J.; Hydes, P. C.; Griffiths, W. P.; Mills, O. S. *J. Chem. Res.* **1983**, 302, 2801

⁸² Sen, V. D.; Tkachev, V. V.; Volkova, L. M.; Goncharova, S. A.; Raevskaya, T. A.; Konvalova, N. P. *Russ. Chem. Bull.* **2003**, 403

⁸³ Battle, A. R.; Choi, R.; Hibbs, D. E.; Hambley, T. W. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 6317

project. The cancer cell lines selected are used in NCI as models to identify novel potential anticancer drugs and include examples of adenocarcinoma from human mammary gland (MCF-7), large cell lung cancer from human (NCI-H460) and central nervous system epithelial cancer (SF268).

Previous studies have shown that complexes *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (**1**) and *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (**3**) exhibit a cytotoxic activity in cisplatin sensitive cells lines comparable to that of cisplatin and considerably higher than that of cisplatin in several cisplatin resistant tumor cells⁵⁴ (Table A1 appendix).

The cytotoxicity data of the complexes **1-3** in these new cancer cell lines are shown in Figure 1.12. Values are presented as IC₅₀ and based in its definition, the higher the value, the lower the cytotoxicity.

The most remarkable feature of these results is that the complex **2**, was more active than cisplatin in the MCF-7 cell line. In fact, the IC₅₀ value exhibited for complex **2** is 5-fold lower than cisplatin.⁸⁴ It is important to point out that, so far, this fact had been reported before in cisplatin-resistant cell line (Pam212-ras)⁵⁴ but not in a sensitive cell line for similar complexes. The results indicate that complex **2** also exhibit a cytotoxic activity in the same micromolar range as cisplatin in NCI-H460 cell line. The highest IC₅₀ values are for complex **1**, against NCI-H460 and complex **3**, against SF268 and MCF-7 cell lines. But, it is interesting to note that, even in these cases, the IC₅₀ values are in a micromolar range < 25 μM.

When all the *trans*-Pt^{II} complexes values are compared, it can be observed that complexes **2** and **3** exhibit similar cytotoxicity against the NCI-H460 cell line. This remark can be pointed out also for complexes **1** and **2** in the SF268 cell line. However, complex **2** is approximately 7- and 18 times more active than complexes **1** and **3** in the MCF-7 cell line.

The data reported here indicate that *trans*-Pt^{II} complexes are effective against the panel of tumor cell lines tested.

The results shown in Figure 1.12 indicate that complexes **1-IV**, **2-IV** and **3-IV** exhibit similar cytotoxicity against the SF268 cell line. Moreover, we can observe that complexes **2-IV** and **3-IV** exhibit comparable cytotoxicity data against the MCF-7 cell line, and also the complexes **1-IV** and **2-IV** are comparable to each other in NCI-H460 cell line. However, complexes **1-IV** and **3-IV** display a cytotoxic activity 4 times less active in the MCF-7 and NCI-H460 cell lines respectively than the others two complexes.

⁸⁴ Ramos-Lima, F. J. in PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Química Inorgánica. Madrid, 2006

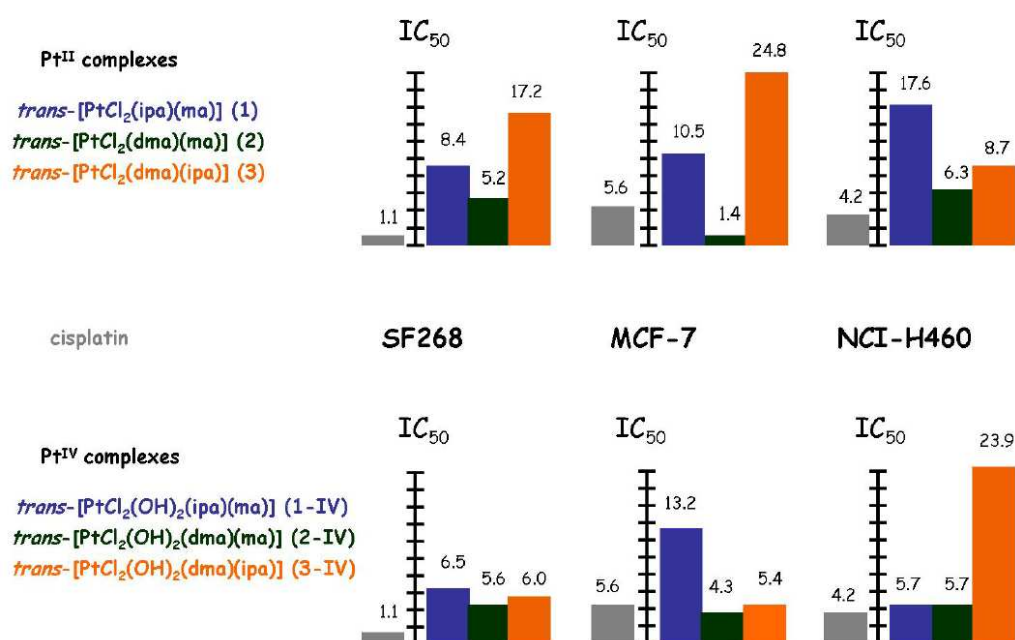


Figure 1.12 Diagram of cytotoxicity of pairs *trans*-Pt^{II}/Pt^{IV} complexes^o

When the activity of these complexes is compared with that of cisplatin, it can be observed that complexes **2-IV** and **3-IV** show a cytotoxic potency comparable with cisplatin in the MCF-7 cell line and also complexes **1-IV** and **2-IV** in the NCI-H460 cell line.

From the IC₅₀ values of each Pt^{II}/Pt^{IV} pair (Figure 1.12), we can observe that in the MCF-7 cell line complex **2** is 3 times more active than its counterpart of Pt^{IV} **2-IV**. Similar tendency is found for complexes **3/3-IV**, where the IC₅₀ exhibited for the oxidized complex is 3-fold higher than the Pt^{II} precursor value in the NCI-H460 cell line. However the cytotoxic activity of complex **1-IV** in the NCI-H460 cell line and **3-IV** in SF268 and MCF-7 cell lines are between 3-5 times more active than their Pt^{II} analogues. Finally, the pair **2/2-IV** shows similar activity in the SF268 and NCI-H460 cell lines. This is also observed for the pair **1/1-IV** in SF268 and MCF-7 cell lines

^o Mean values of two independent experiments performed in triplicate

Synthesis, characterization and cytotoxicity

In general, for this investigation we have not found a clear trend in the comparison of Pt^{II}/Pt^{IV} pair.^{59,71}

In the end, it is notable that complexes **2** and **2-IV** are the most active from the group of complexes evaluated in this work. The antitumor activity of these complexes seems to increase due to the use of less sterically hindered ligands. The presence of less sterically demanding amines in the structure of the complexes **2** and **2-IV** clearly has an effect on their biological activity.

1.3.2 Aquation studies of *trans*-Pt^{II} complexes by
2D [¹H, ¹⁵N] HSQC NMR and conductimetry

1.3.2.1 Introduction

In this section the aquation studies of *trans*-diamine Pt^{II} complexes by 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectroscopy and conductimetry is described. As follow basic results and general aspects of aqueous chemistry of platinum complexes, 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR technique, relation between hydrolysis-conductivity and previous studies of hydrolysis of platinum complexes are presented.

2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectroscopy

From the time that cisplatin was first introduced into the clinic, NMR methods have proved useful in the investigation of platinum drugs. Both ¹⁹⁵Pt and ¹⁵N NMR^{85,86} were used in early studies and made a major contribution in the understanding of the molecular mechanism of action from model studies involving reactions with amino acids (proteins) and nucleotides (DNA).

However, the ¹⁹⁵Pt and ¹⁵N NMR studies were limited by the inherent insensitivity of these nuclei until the introduction of 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR technique, which made possible to follow the reactions of cisplatin and related platinum anticancer complexes under physiologically relevant conditions.

The combined detection of ¹H and ¹⁵N in a 2D inverse NMR experiment is especially powerful. The major advantage of the technique is the sensitivity of detection, which is enhanced by a theoretical maximum of 306 (γ_H/γ_N)^{5/2} with respects to directly detected ¹⁵N.

Over the past years, inverse (¹H-detected) ¹⁵N NMR methods have been applied to a wide range of platinum anticancer drugs studies. These methods are widely applicable to any complex which has a ¹⁵N atom with a measurable spin-spin coupling to ¹H (i.e. ammine, primary and secondary amines, but not tertiary amines).

The ¹⁵N shift ranges for Pt^{II} and Pt^{IV} complexes as well as Pt-NH₃, Pt-NH₂ and Pt-NH linkages are distinct and simultaneous detection of the ¹H shift allows species with very similar ¹⁵N shifts to be distinguished. It has also the advantage that all Pt-NH species are detected simultaneously without the need for trapping out reaction intermediates.

⁸⁵ Macdonald, F. S.; Sadler, P. J. in *Biochemical Mechanisms of Platinum Antitumor Drugs*, eds. McBrien, D. C. H. and Slater, T. F., IRL Press, Oxford, **1986**, pp.361-381

⁸⁶ Ismail, I. M.; Kerrison, S. J. S.; Sadler, P. J. *Polyhedron*. **1982**, *1*, 57

Hydrolysis

The binding to DNA of platinum-based anticancer drugs with halide leaving groups involves numerous stages, including: aquation of the complex, preassociation with the DNA, monofunctional adduct formation, closure to a bifunctional adduct, distortion of DNA and recognition of this distortion (Figure 1.13). Most of the available evidences are consistent with aquation being the rate determining step.⁸⁷

An understanding of the aqueous chemistry of diamine Pt^{II} complexes is crucial for establishing their mechanism of action, since hydrolysis reactions of dichlorido Pt^{II} complexes activate them prior to platination of the target site (DNA) and H₂O ligands are more labile to substitution than OH⁻ ligands.⁸⁸ The relative amounts of all these hydrolysis species vary as a function of pH and Cl⁻ concentration.

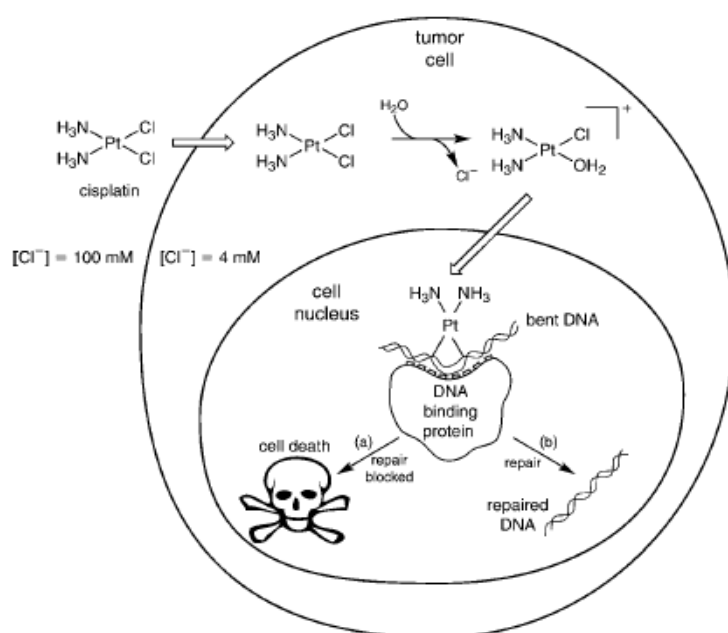


Figure 1.13 Schematic showing the cytotoxic pathway for cisplatin. After entering the cell, cisplatin is aquated, then binds to cellular DNA[‡]

Deprotonation of the aquated complexes to give hydroxido complexes is also important because these products have a lower charge and lower reactivity than aqua complexes. There have been a number of determinations of pK_a's of aquated

⁸⁷ Johnson, N. P.; Hoeschele, J. D.; Rahn, R. O. *Chem. Biol. Interact.* **1980**, *30*, 151

⁸⁸ Martin, R. B. in *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, ed. Lippert, B., Wiley-VCH, Zurich, **1999**, pp. 183-205

[‡] Adapted from Alderden, R. A.; Hall, M. D.; Hambley, T. W. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 728

platinum complexes reported,^{89,90,91} but only a few regarding *trans* complexes (discussed later).⁹²

Aquation reactions of cisplatin

By observation of both ¹H and ¹⁵N NMR chemical shifts in 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectra as a function of pH, the p*K*_a values of the monoqua and diaqua adducts of cisplatin were determined.⁸⁹ 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR was also used to determinate the rate and equilibrium constants for the first and second aquation steps of cisplatin by fitting the curves of the concentration changes of each species with time.⁹³

These studies showed that the aquation is dominated by the formation of *cis*-[PtCl(¹⁵NH₃)₂(H₂O)]⁺. The data revealed that after 30 h 23% of cisplatin remained and 65% had been converted to the monoaquated species.

Aquation reactions of *trans*-Pt^{II} complexes

It has been reported a comprehensive study of the aqueous chemistry of *trans*-[PtCl₂(NH₃)(2-Me-butylamine)],⁹⁴ a *trans*-platinum complex with cytotoxic activity comparable to that of cisplatin (Table A1 appendix). The hydrolysis pathway of the ¹⁵N-labelled complex *trans*-[PtCl₂(¹⁵NH₃)(¹⁵N-2-Me-butylamine)] has been studied by ESI-MS, 1D ¹H, ¹⁵N-¹H, ¹⁹⁵Pt and 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectroscopy. ¹H/¹⁵N cross-peaks assignable to monoqua species *trans*-[PtCl₂(¹⁵NH₃)(¹⁵N-2-Me-butylamine)(H₂O)]⁺ were observed in the 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectrum, and p*K*_a value of 5.90 was determined for the H₂O/OH acid-base equilibrium. However, no signals assignable to the diaqua species *trans*-[Pt(¹⁵NH₃)(¹⁵N-2-Me-butylamine)(H₂O)₂]²⁺ were detected. Nevertheless, two additional sets of signals were observed, assignable to ¹⁵NH₃-Pt^{IV}-(¹⁵N-2-Me-butylamine) complexes with additional Cl⁻ and OH⁻ ligands. Also, the ¹J(¹⁹⁵Pt-¹⁵N) coupling constants were consistent with the presence of Pt^{IV} centres. Experiments were also performed in both, the presence and absence of air, suggesting that products from the hydrolysis of *trans*-[PtCl₂(NH₃)(2-Me-butylamine)] in water react with oxygen. The

⁸⁹ Berners-Price, S. J.; Frenkiel, T. A.; Frey, U.; Ranford, J. D.; Sadler, P. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 789

⁹⁰ Barton, S. J.; Barnham, K. J.; Habtemariam, A.; Sue, R. E.; Sadler, P. J. *Inorg. Chim. Acta.* **1998**, *273*, 8

⁹¹ Guo, Z.; Chen, Y.; Zang, E.; Sadler, P. J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, *21*, 4107

⁹² Berners-Price, S. J.; Ronconi, L.; Sadler, P. J. *Prog. NMR Spect.* **2006**, *49*, 65

⁹³ Davies, M. S.; Berners-Price, S. J.; Hambley, T. W. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 5603

⁹⁴ Pizarro, A. M.; Munk, V. P.; Navarro-Ranninger, C.; Sadler, P. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5339

Aquation studies

finding of these novel redox reactions in aqueous solution was proposed to be an important aid in the design of *trans* diamine anticancer complexes and for the elucidation of structure-activity relationship.

The *trans* isomer of *cis*-[PtCl₂(NH₃)(2-pic)] (AMD473) is cytotoxic in a variety of cancer cell lines⁹⁵ and a recent 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR study has compared the hydrolysis behaviour of *trans*-[PtCl₂(NH₃)(2-pic)] and 3- and 4-picoline isomers. In general the extent of hydrolysis of the *trans* complexes is much less than for their *cis* analogues although the mono-aquation step is relatively rapid (*t*_{1/2} 1.5-7.5 h at 277 K). The low p*K*_a values for the mono-aqua species (5.35-5.55) implies that they would exist largely as the monohydroxido complexes at physiological pH.⁹⁵

The hydrolysis of *trans*-[PtCl₂{E-HN=C(OMe)Me}₂] have been also investigated by 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR. The rate constant for the first hydrolysis step is one order of magnitude smaller than that of transplatin, and quite close to that of cisplatin.⁹⁶

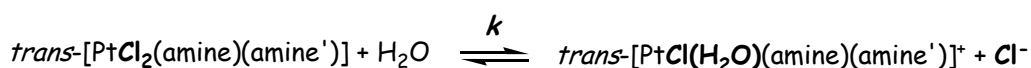
Relation between hydrolysis-conductivity

In a general unimolecular reaction, the rate is proportional to the concentration of products.

$$\ln[\text{product}] = \pm kt + C \quad (1.1)$$

This means that there is a relationship between the ln[product] and the time in a first-order reaction (Equation 1.1). Plotting ln[product] versus time creates a straight line which slope is the value of the rate constant *k*.

Reactants and products concentration need to be easily distinguished in order to measured rate constants. In this context, if the hydrolysis mechanism for these complexes is considered to involve only a single step (Scheme 1.3), the concentration of the cationic mono-aqua species and Cl⁻ ions can be correlated with the conductivity. Thus, the hydrolysis rate for the first aquation step can be determined by studying the variation of the conductivity to the initial phase of the reaction.



Scheme 1.3 Hydrolysis pathway for the first aquation step of *trans*-Pt^{II} amine complexes

⁹⁵ McGowan, G.; Parsons, S.; Sadler, P. J. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7459

⁹⁶ Liu, Y. Z.; Intini, F. P.; Natile, G.; Sletten, E. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 3489

1.3.2.2 Experimental

1.3.2.2.1 Materials

Starting materials K_2PtCl_4 , ^{15}N -dimethylamine hydrochloride, ^{15}N -methylamine hydrochloride, ^{15}N -phthalimide potassium salt, hydrazinium hydroxide and 2-bromopropane were purchased from Prolabo, Chambers Hispania, S. L. and Sigma-Aldrich.

All solvents $CHCl_3$, MeOH, THF, Et_2O and DMF were purchased from Sigma-Aldrich and purified by standard methods prior to use.⁷²

1.3.2.2.2 Instrumentation

NMR spectroscopy

For characterization of the ^{15}N -labelled complexes NMR spectra were recorded on either Bruker AMX-300 (^{15}N 30.41 MHz) or DRX-500 (^{15}N 50.68 MHz) spectrometers (for more details see section 1.3.1.2.2).

For the aquation studies 1H 1D and 2D [$^1H,^{15}N$] HSQC NMR spectra were recorded at 298 K on a Bruker Avance 600 MHz spectrometer (1H 600.1 MHz, ^{15}N 60.8 MHz) and fitted with a pulsed field gradient module and 5 mm triple resonance probehead. 2D [$^1H,^{15}N$] HSQC NMR spectra (optimised for $^1J(^{15}N, ^1H) = 72$ Hz) were recorded using the standard Bruker phase sensitive HSQC pulse sequence. 1H chemical shifts were referenced to internal 1,4-dioxane (3.76 ppm), ^{15}N shifts were calibrated externally against $^{15}NH_4Cl$ (1.0 M in 1.0 M HCl in 10% $D_2O/90\%$ H_2O).

pK_a determination

pH values were determined using a Shindengen pH Boy-P2 (su19A) meter. To avoid leaching of chloride into the bulk sample, aliquots of 5 μL of the solution were placed on the electrode. The meter was calibrated using pH buffers at pH 6.9 and 4.0. Adjustments in pH were made using 0.1 M and 0.01 M $HClO_4$ or 0.1 M and 0.01 M NaOH.

Conductimetry

Conductivity measurements were carried out using a Pasport conductivity sensor with a probe Pasco C1-6739. The data were recorded with the DataStudio (TM) 1.6 software. pH values were determined using a HI991002 pH meter, from Hanna instruments calibrated with standard buffers (pH 4 and 6.9 Aldrich).

1.3.2.2.3 Methods

Sample preparation

Two methods were used to obtain a solution containing monoqua and diaqua species for **1**, **2** and **3**.

Method 1: the complex was dissolved in 100 mM NaClO₄ (in 90% H₂O/10% D₂O), and 10 μL 1,4-dioxane added. The solution ([Pt] = 2 mM) was incubated at 298 K for 72 hours.

Method 2: AgNO₃ was dissolved in H₂O and 1.8 equiv. were added to a solution of the complex in 100 mM NaClO₄ (in 90% H₂O/10% D₂O). 1,4-dioxane (10 μL) was added and the solution ([Pt] = 2 mM) was incubated for 24 hours at 298 K and then centrifuged to remove the AgCl precipitate. 1D ¹H and 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectra were recorded in the pH range *ca.* 2 - 10.

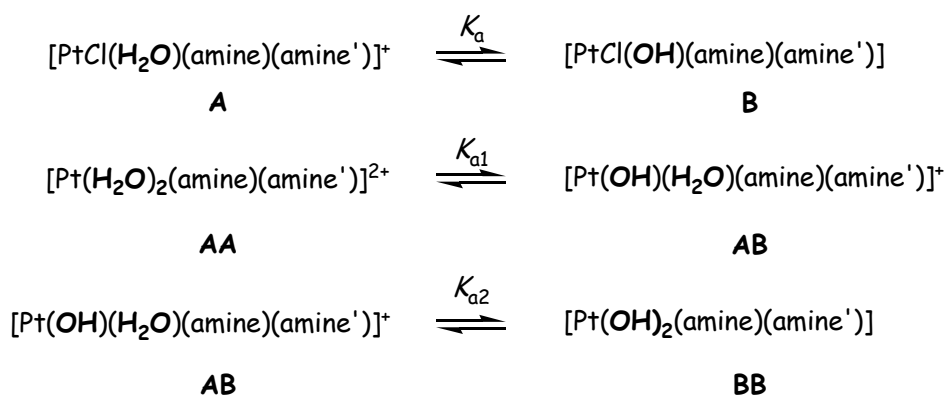
pK_a determination

Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA) was used to analyse the pH titration data using the following equations:

$$\delta = (\delta_A [H^+] + \delta_B K_a) / ([H^+] + K_a) \quad (1.2)$$

$$\delta = (\delta_{AB} + \delta_{AA} [H^+] / K_{a1} + \delta_{BB} K_{a2} / [H^+]) / (1 + [H^+] / K_{a1} + K_{a2} / [H^+]) \quad (1.3)$$

where K_a is the acid dissociation constant for the monoqua species [PtCl(H₂O)(amine)(amine')]⁺, K_{a1} and K_{a2} those for the diaqua species [Pt(H₂O)₂(amine)(amine')]²⁺, δ is the measured chemical shift in the spectrum and δ_A , δ_B , δ_{AA} , δ_{AB} and δ_{BB} are the limiting ¹H or ¹⁵N chemical shifts of [PtCl(H₂O)(amine)(amine')]⁺, [PtCl(OH)(amine)(amine')], [Pt(H₂O)₂(amine)(amine')]²⁺, [Pt(OH)(H₂O)(amine)(amine')]⁺ and [Pt(OH)₂(amine)(amine')] species, respectively.



Scheme 1.4

Equations 1.2 and 1.3 are based in equation 1.4 and 1.5 and the acid-base equilibria of the aquaspecies shown in Scheme 1.4.*

$$\delta = ([\text{A}] \delta_{\text{A}} + [\text{B}] \delta_{\text{B}}) / ([\text{A}] + [\text{B}]) \quad (1.4)$$

$$\delta = ([\text{AB}] \delta_{\text{AB}} + [\text{AA}] \delta_{\text{AA}} + [\text{BB}] \delta_{\text{BB}}) / ([\text{AB}] + [\text{AA}] + [\text{BB}]) \quad (1.5)$$

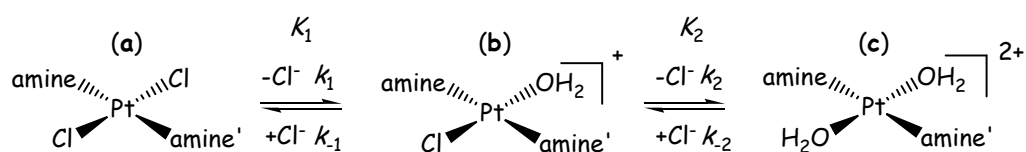
Aquation studies

Fresh solutions of ¹⁵N-1, 2 and 3 were prepared in 100 mM NaClO₄ in 90% H₂O/10% D₂O, and 10 μL of 1,4-dioxane added to give a final concentration within the range of 2-2.7 mM of each compound in a total volume of 500 μL. 1D ¹H and 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectra were recorded at 298 K over a period of 64-68 hours at the pH indicated.

The kinetic analyses of the aquation reactions were undertaken by measuring the peak volumes in the 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectra using the Bruker XWIN NMR software and calculating relative concentrations. For a given reaction, peak volumes were determined using an identical vertical scale and threshold value. The

* Since the protonation/deprotonation reactions take place too quickly for the NMR timescale, only one set of cross-peaks is observed. The chemical shift for the mentioned set of cross-peaks corresponds to the concentration-weight averages value for the following group of species: [PtCl(H₂O)(¹⁵N-amine)(¹⁵N-amine')] / [PtCl(OH)(¹⁵N-amine)(¹⁵N-amine')] and [Pt(H₂O)₂(¹⁵N-amine)(¹⁵N-amine')] / [Pt(OH)(H₂O)(¹⁵N-amine)(¹⁵N-amine')] / [Pt(OH)₂(¹⁵N-amine)(¹⁵N-amine')]. The chemical shifts were constant over the pH 0-4 (where the titration reaction has not taken place yet) and pH 9-14 (where the titration reaction has already taken place). The chemical shifts were very sensitive to pH over the range 4-8

peak volumes were normalized and the concentration of each species was determined for each spectrum. The data were then subjected to kinetic analysis using the model shown in Scheme 1.5, for the first and second aquation steps.



Scheme 1.5 The hydrolysis pathways of *trans*-[PtCl₂(amine)(amine')]

The appropriate differential equations were integrated and rate constants determined by nonlinear optimization procedure using the program SCIENTIST (Version 2.01, MicroMath). The scientist kinetic model is provided as supplementary information (M1 and M2 appendix). The errors quoted represent one standard deviation. For **3** the second aquation step was not observed and for **1** and **2** the very low concentrations of the diaqua species gave rise to very large errors for the rate constants k_2 and k_{-2} . Therefore, the equilibrium constants K_1 and K_2 were estimated based on the relative integrals for species **a**, **b** and **c** at equilibrium. The half-life times for the aquation steps were estimated using the formula:

$$t_{1/2} = -\ln(0.5)/k$$

The pH values of the solutions for the kinetic studies were chosen based on the pH titration curves of the aquated species, which indicated that at this pH the cross-peaks of the dichlorido, mono aqua and diaqua species appeared in a clear region of the spectrum, allowing the concentration of these species to be monitored. Likewise, the reactions were carried out at 298 K to allow comparison with physiological conditions.

In the aquation studies, both the rate and equilibrium constants have been assumed that all the aquated species are in the aqua form and none are in the hydroxido form. In all kinetic studies an initial concentration of mono aqua species was presented. The presence of mono aqua complex can be justified on the basis of the following factors: the time takes to record the first spectrum, some hydrolyzation has already taken place, and also the sonication of the sample hastens the aquation process.

Sample preparation for conductimetry

Fresh solutions of each complex were made up to 2 mM in deionized H₂O and conductivity was measured over a period of 24 hours, at 298 K and pH 6.

1.3.2.2.4 Synthesis of ^{15}N -labelled Pt^{II} complexes

^{15}N -isopropylamine

^{15}N -isopropylamine was synthesised *via* the Gabriel synthesis.⁹⁷

To a suspension of phthalimide ^{15}N potassium salt (2 g, 10.74 mmol) in 44 mL of anhydrous DMF was added 1 equiv. of 2-bromopropane (1.12 mL, 10.74 mmol). The resulting mixture was stirred for a couple of days at reflux T^{a} under inert atmosphere. After cooling and filtration, DMF was removed under vacuum. Hydrazine hydrate $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (532 μL , 10.74 mmol) was added to the residue in methanol (976 μL). The mixture was heated on a steam-bath for 1 hour, and along this period of time a white solid formation was observed. After addition of water (3.22 mL), the volume was reduced under vacuum. Then, concentrated hydrochloric acid 35% (4.88 mL) was added and the mixture was heated for 1 hour on a steam-bath. The final filtrate was evaporated to dryness. The yield of isopropylamine hydrochloride was 48% on ^{15}N -phthalimide potassium salt.

The ^{15}N -isopropylamine hydrochloride was redissolved in a solution of KOH and then distilled (b.p 34°C).

cis- $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N}\text{-dimethylamine})_2]$

K_2PtCl_4 (188.5 mg, 0.445 mmol) was suspended in a THF/ H_2O mixture and dimethylamine ^{15}N -labelled hydrochloride was added (150 mg, 1.78 mmol). The reaction mixture was treated at room temperature in the dark with a solution of KOH (99.93 mg; 1.78 mmol). When the addition was finished, the reaction mixture was allowed to stir for a day at room temperature in the dark. The yellow precipitate was collected, washed with water and chloroform, and air dried.

cis- $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N}\text{-dma})_2]$, yellow solid (56%). Elemental analysis CHN. Found: C, 13.7; H, 3.9; N, 7.90. Calc for $\text{C}_4\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$: C, 13.5; H, 4.0; N, 7.9%. δ_{H} (300.13 MHz; DMSO- d_6) 2.47 (6 H, d, CH_3), 5.64 (1 H, d of sept, J_{HH} 5.5, J_{HN} 73.8, ^{15}NH); δ_{NH} (50.68 MHz; 500.13 MHz; DMSO- d_6 ; liq. NH_3) -29.53, 5.65 (J_{Npt} 368.4, J_{Hpt} 69.8); δ_{CH} (125.76 MHz; 500.13 MHz; DMSO- d_6) 43, 2.5.

⁹⁷ Gibson, M. S.; Bradshaw, R. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, *7*, 919

***cis*-[PtCl₂(¹⁵N-isopropylamine)₂]**

K₂PtCl₄ (599 mg, 1.44 mmol) was suspended in a THF/H₂O mixture and ¹⁵N-isopropylamine was added (500 μL, 5.7 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature in the dark for 48 hours, the yellow precipitate was collected by filtration and washed with water, chloroform and air dried.

cis-[PtCl₂(¹⁵N-*ipa*)₂], yellow solid (15%). Elemental analysis CHN. Found: C, 19.2; H, 4.7; N, 7.30. Calc for C₆H₁₈N₂Cl₂Pt: C, 18.75; H, 4.7; N, 7.3. δ_H(300.13 MHz; DMSO-d₆) 1.08 (6 H, d, J_{HH} 6.3, CH₃), 2.97 (1 H, sept, J_{HH} 6.4, CH) 4.63 (2 H, dd, J_{HH} 6.4, J_{HN} 71.3, ¹⁵NH₂); δ_{NH}(50.68 MHz; 500.13 MHz; DMSO-d₆; liq. NH₃) -2.89, 4.63 (J_{NPt} 338.5); δ_{CH}(125.76 MHz; 500.13 MHz; DMSO-d₆) 23.5, 1.2 (CH₃), 47.0, 3.1 (CH).

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-isopropylamine)(¹⁵N-methylamine)] (¹⁵N-1)**

cis-[PtCl₂(¹⁵N-*ipa*)₂] (65.4 mg, 0.16 mmol) was suspended in H₂O (1.6 mL) and methylamine ¹⁵N hydrochloride (236.8 mg, 3.38 mmol) was added. The resulting mixture was treated at room temperature in the dark with a solution of KOH (3.38 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature until a colourless solution was obtained. Hydrochloric acid 35% (2.08 mmol in 184 μL) was added to solution and heated to reflux for 24 hours. The obtained yellow solution was then placed on an ice bath to induce precipitation. The yellow product was then filtered off, washed with cold water and dried in vacuum.

trans-[PtCl₂(¹⁵N-*ipa*)(¹⁵N-*ma*)], yellow solid (50%). Elemental analysis CHN. Found: C, 13.60; H, 3.88; N, 7.84. Calc for C₄H₁₄N₂Cl₂Pt: C, 13.48; H, 3.96; N, 7.86. δ_H(300.13 MHz; CDCl₃) 1.33 (6 H, d, J_{HH} 6.34, CH₃-*ipa*), 2.56 (3 H, t, J_{HH} 6.2, CH₃-*ma*), 3.31 (1 H, sept, J_{HH} 6.25, CH) 3.43 (4 H, m, J_{HH} 6, J_{HN} 72.1, ¹⁵NH₂-*ipa* and ¹⁵NH₂-*ma*); δ_{Pt}(64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2193 (dd, J_{PtN} 293.5, J_{PtN} 291.9); δ_{NH}(50.68 MHz; 500.13 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -36, 3.44 (¹⁵NH₂-*ma*), 1.2, 3.43 (¹⁵NH₂-*ipa*); δ_N(50.68 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -36 (d, J_{NPt} 284.7, J_{NN} 5, ¹⁵NH₂-*ma*), 1.24 (d, J_{NPt} 295.2, J_{NN} 5, ¹⁵NH₂-*ipa*)*.

* 2D [¹H,¹⁵N] HSQC-TOCSY NMR provided useful information to distinguish ¹H, ¹⁵N cross-peak from ¹⁵NH₂-*ipa* or ¹⁵NH₂-*ma* groups. The 2D [¹H,¹⁵N] HSQC-TOCSY NMR spectrum contains cross-peaks showing the connectivity between the NH₂ proton of *ipa* and *ma* and the CH and CH₃ protons of the side-chain. This allows unambiguous assignment of resonances for groups ¹⁵NH₂

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-dimethylamine)(¹⁵N-methylamine)] (¹⁵N-2)**

cis-[PtCl₂(¹⁵N-dma)₂] (88.6 mg, 0.25 mmol) was suspended in H₂O (586 μL) and methylamine ¹⁵N hydrochloride (345.9 mg, 4.94 mmol) was added. The resulting mixture was treated at room temperature in the dark with a solution of KOH (4.94 mmol). The resulting reaction mixture was heated at 40°C until a colourless solution was obtained. Hydrochloric acid 35% (3.25 mmol in 287 μL) was added to a solution and heated to reflux for 24 hours. The yellow product was then filtered off, washed with ice cold water and dried in vacuum.

trans-[PtCl₂(¹⁵N-dma)(¹⁵N-ma)], yellow solid (58%). Elemental analysis CHN. Found: C, 10.35; H, 3.4; N, 8.2. Calc for C₃H₁₂N₂Cl₂Pt: C, 10.53; H, 3.3; N, 8.2. δ_H(300.13 MHz; CDCl₃) 2.60 (6 H, d, *J*_{HH} 6, CH₃-dma), 2.49 (3 H, t, *J*_{HH} 6.4, CH₃-ma), 3.13 (1 H, d of sept, *J*_{HH} 6.4, *J*_{HN} 72.9, ¹⁵NH), 3.76 (2 H, d of q, *J*_{HH} 6, *J*_{HN} 73.2, ¹⁵NH₂); δ_{Pt}(64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2210 (dd, *J*_{PtN} 300.5, *J*_{PtN} 274.3); δ_{NH}(50.68 MHz; 500.13 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -28.7, 3.73 (¹⁵NH), -38.6, 3.10 (¹⁵NH₂); δ_N(30.41 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -28.7 (d, *J*_{NPt} 303.5, *J*_{NN} 5.3, ¹⁵NH), -38.6 (d, *J*_{NPt} 268, *J*_{NN} 5.3, ¹⁵NH₂).

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-dimethylamine)(¹⁵N-isopropylamine)] (¹⁵N-3)**

cis-[PtCl₂(¹⁵N-dma)₂] (67.3 mg, 0.19 mmol) was suspended in H₂O (673 μL) and ¹⁵N-isopropylamine (67 μL, 0.75 mmol) was added. The resulting mixture was treated at 70°C for 48 hours. The mixture becomes to a clear solution which was filtered off to remove any starting material. Hydrochloric acid 35% (2.28 mmol in 200 μL) was added to the solution and heated to reflux for 17 hours. The yellow solution obtained was placed on an ice bath to induce precipitation. The yellow product was then filtered off, washed with ice cold water and dried in vacuum.

trans-[PtCl₂(¹⁵N-dma)(¹⁵N-ipa)], yellow solid[§]. δ_H(300.13 MHz; CDCl₃) 1.37 (6 H, d, *J*_{HH} 6.4, CH₃-ipa), 2.72 (6 H, d, *J*_{HH} 6.2, CH₃-dma), 3.34 (1 H, sept, *J*_{HH} 6.5, CH) 3.19 (2 H, dd, *J*_{HH} 6.8, *J*_{HN} 70.8, ¹⁵NH₂-ipa), 3.88 (1 H, d of sept, *J*_{HH} 6, *J*_{HN} 73.5, ¹⁵NH-dma); δ_{Pt}(64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2215; δ_{NH}(50.68 MHz; 500.13 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -27.52, 3.84 (¹⁵NH), -0.24, 3.15 (¹⁵NH₂); δ_N(50.68 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -27.52 (d, *J*_{NN} 5.1, ¹⁵NH), -0.25 (d, *J*_{NN} 5.2, ¹⁵NH₂).

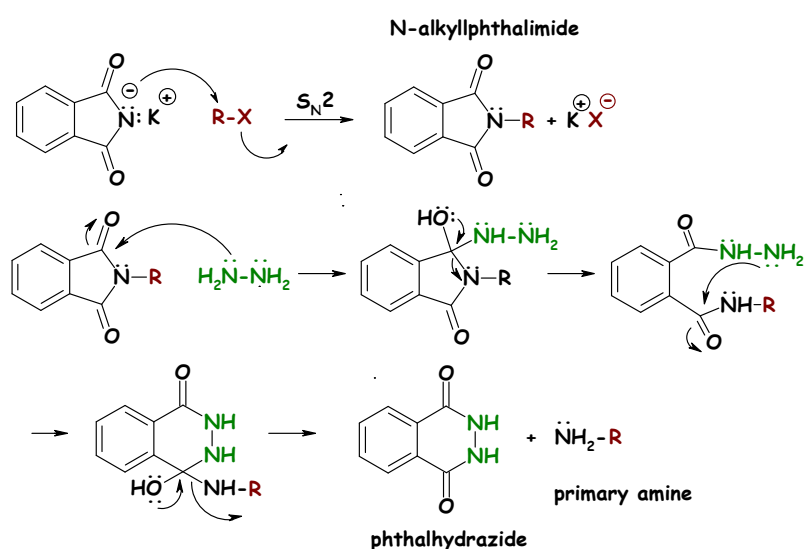
§ Peaks assignable to impurities were present in the spectrum of this compound. Although these impurities were unassigned, their presence in the sample did not compromise of the hydrolysis products could be measured without interference from these minor species over the entire pH range. The reaction was followed with ¹⁵NH₂-isopropylamine signal, as it was well separated in the 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectra. The impurities will not be discussed further

1.3.2.3 Results and discussion

1.3.2.3.1 Synthesis

^{15}N -isopropylamine

The ^{15}N -isopropylamine was synthesized using the Gabriel method, with appropriate optimization of reaction conditions (Scheme 1.6).



Scheme 1.6 Gabriel's synthesis

cis- and *trans*-[^{15}N -Pt] complexes

The platinum complexes were prepared according to the published procedure, after cleavage of the appropriate ^{15}N -amine salt with sodium hydroxide.⁵⁴

1.3.2.3.2 Hydrolysis studies by 2D [^1H , ^{15}N] HSQC NMR

Assignments

^{15}N -labelled samples of *trans*-[PtCl₂(^{15}N -ipa)(^{15}N -ma)] (1), *trans*-[PtCl₂(^{15}N -dma)(^{15}N -ma)] (2) *trans*-[PtCl₂(^{15}N -dma)(^{15}N -ipa)] (3) were isolated as mentioned

before, and 2D [^1H , ^{15}N] HSQC NMR spectroscopy used to compare their hydrolysis behaviour and to determine the pK_a values for the mono- and diaqua complexes. The ^1H and ^{15}N shifts of the three complexes and their aquated derivatives are shown in Table 1.11, representative 2D [^1H , ^{15}N] NMR spectra are shown in Figure 1.14 and the pathway for the aquation reactions is illustrated in Scheme 1.5.

There is a large difference in the ^{15}N shifts for the $^{15}\text{NH}_2$ groups of isopropylamine (δ ca. -25) and methylamine (δ ca. -60) and these ^{15}N shifts extend the previously reported range for $^{15}\text{NH}_2\text{-Pt-Cl}$ species.⁹² The ^{15}N shift for the dimethylamine group (δ ca. -50) is similar to that observed for the related *cis* complex *cis*-[PtCl₂(^{15}N -dma)₂],⁹⁸ but very different to the range identified previously for $^{15}\text{NH-Pt-Cl}$ species (δ ca. 10), although these studies involved the diethylenetriamine (dien) ligand in [Pt(^{15}N -dien)Cl]⁹¹ rather than a non-chelated $^{15}\text{NHR}_2$ ligand.

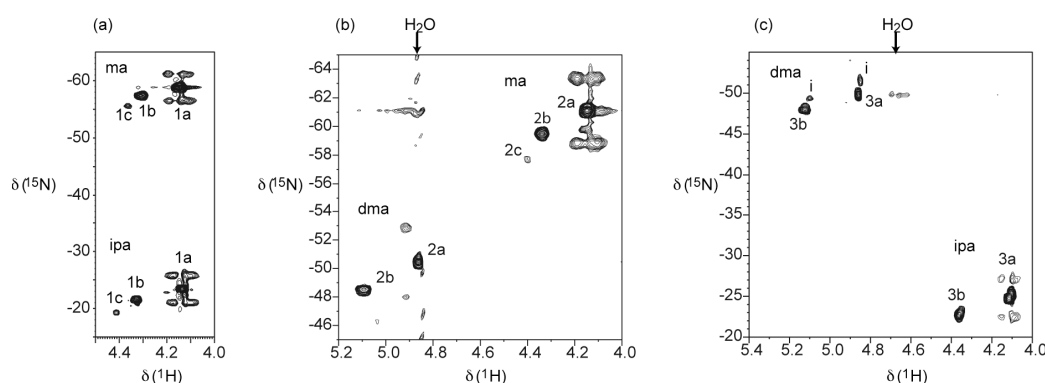


Figure 1.14 2D [^1H , ^{15}N] HSQC NMR spectra of aqueous solutions of *trans*-[PtCl₂(^{15}N -amine)(^{15}N -amine)] complexes with concentrations of 2.0 to 2.7 mM (a) **1**, (b) **2**, (c) **3** in 100 mM NaClO₄ (90% H₂O/10% D₂O) (pH₀ 4.2-4.8) after 64 h at 298 K. The resonances are assigned to the Pt- $^{15}\text{NH}_2$ (ipa and ma) and Pt- ^{15}NH (dma) groups in the dichlorido **a**, mono-aqua **b** and diaqua **c** complexes. The $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ peaks for the aquated species shift with pH (see Table 1.11 and Figure 1.15)

⁹⁸ Cubo, L.; Thomas, D. S.; Zhang, J.; Quiroga, A. G.; Navarro-Ranninger C.; Berners-Price, S. J. *Inorg. Chim. Acta*. 2008, in press

Table 1.11 ^1H and ^{15}N chemical shifts for the $^{15}\text{NH}_2$ and ^{15}NH groups of compounds ^{15}N -1, 2 and 3 and their aquation products, and ^{195}Pt - ^{15}N coupling constants (Hz)^a

Compound	X	X'	δ /ppm						
			$^{15}\text{NH}_2$			^{15}NH			
			ipa		ma		dma		
			^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	
trans-[PtXX' (^{15}N-ipa)(^{15}N-ma)]	1a^b	Cl	Cl	4.13	-23.5(286)	4.15	-59.1(285)		
	1b^c	Cl	H ₂ O	4.40	-21.6	4.38	-57.7		
		Cl	OH	4.13	-21.6	4.11	-57.2		
	1c^d	H ₂ O	H ₂ O	4.72	-19.7	4.69	-55.8		
		OH	OH	4.15	-20.2	4.09	-56.3		
trans-[PtXX' (^{15}N-dma)(^{15}N-ma)]	2a	Cl	Cl			4.15	-61.3(268)	4.86	-50.6
	2b^c	Cl	H ₂ O			4.36	-59.6	5.13	-48.7
		Cl	OH			4.11	-59.6	4.71	-48.4
	2c^d	H ₂ O	H ₂ O			4.65	-57.7	5.45	-46.5
		OH	OH			4.10	-58.6	4.62	-47.3
trans-[PtXX' (^{15}N-dma)(^{15}N-ipa)]	3a	Cl	Cl	4.11	-25.2(267)			4.86	-50.0
	3b^c	Cl	H ₂ O	4.36	-22.9			5.12	-48.2
		Cl	OH	4.11	-22.8			4.68	-47.7
	3c^d	H ₂ O	H ₂ O	4.67	-21.0			5.45	-46.3
		OH	OH	4.13	-21.4			4.57	-46.5

^a 100 mM NaClO₄, 298 K, $\delta(^{15}\text{N}) \pm 0.5$ ppm. ^b $^{15}\text{NH}_2$ -ipa and $^{15}\text{NH}_2$ -ma groups were distinguished by [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$] HSQC-TOCSY experiments

^c Values obtained by fitting equation (1.2). ^d Values obtained by fitting equation (1.3)

The assignments of cross-peaks for the aquated species were confirmed by pH titrations using aqua adducts of complexes 1-3, which had been generated by reactions with Ag^{I} . Plots of the variation of the ^1H NMR chemical for the Pt- $^{15}\text{NH}_2/^{15}\text{NH}$ signals with pH are shown in Figure 1.15 and the derived $\text{p}K_{\text{a}}$ values from fitting the curves to equations (1.2) or (1.3) are listed in Table 1.12. The changes in ^1H chemical shift for the $^{15}\text{NH}_2$ groups on H_2O deprotonation ($\Delta\delta$ 0.3 ppm) are similar to those observed previously for am(m)ine groups that are *cis* to the $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}$ group.^{95,99,93,100,94}

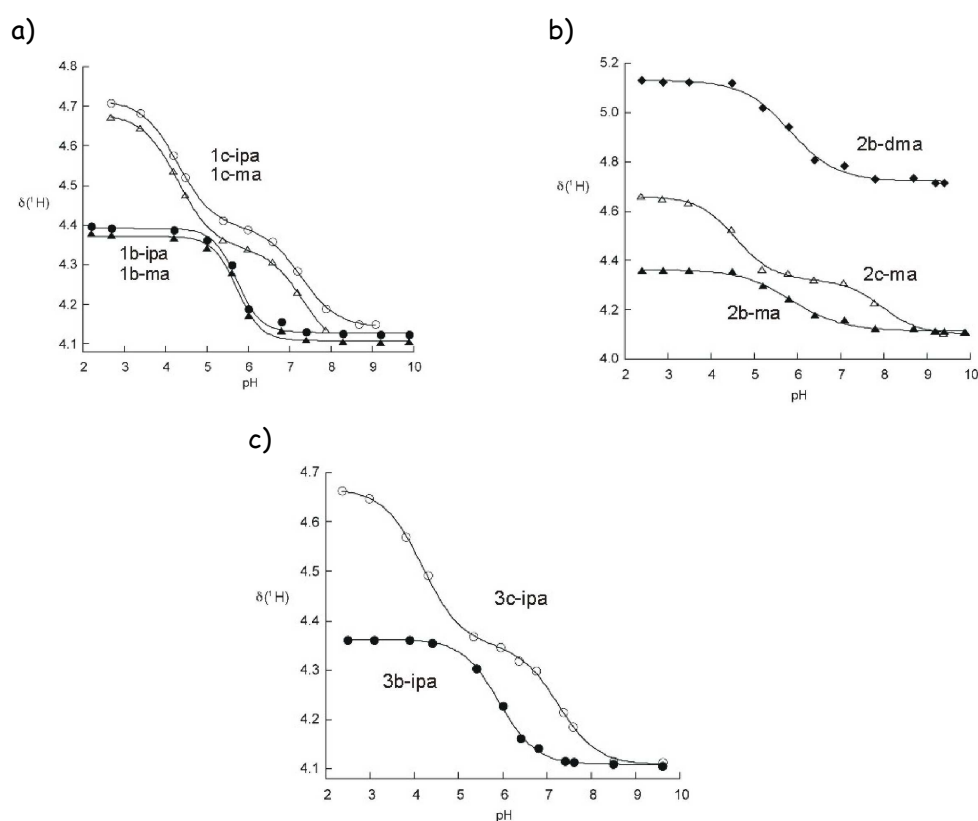


Figure 1.15 Plots of the ^1H chemical shifts as a function of pH of the $^{15}\text{NH}_2\text{-ipa}$ (circles), $^{15}\text{NH}_2\text{-ma}$ (triangles) and $^{15}\text{NH-dma}$ (diamonds) protons of mono-aqua (filled symbols) and diaqua (open symbols) complexes a) 1 b) 2 and c) 3. The curves represent computer fits of the Henderson-Hasselbalch equations giving the $\text{p}K_{\text{a}}$ values (Table 1.12)

⁹⁹ Davies, M. S.; Thomas, D. S.; Hegmans, A.; Berners-Price, S. J.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 1101

¹⁰⁰ Zhang, J.; Thomas, D. S.; Davies, M. S.; Berners-Price, S. J.; Farrell, N. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 652

Table 1.12 Comparison of pK_a values for some *trans* and *cis*-dia(m)mine Pt^{II} mono- and di-aqua complexes^a

Compound	pK_a	pK_{a1}	pK_{a2}	ref
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-ipa)(¹⁵ N-ma)] (1) ^c	5.98 ± 0.01	4.32 ± 0.01	7.33 ± 0.02	^b
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-dma)(¹⁵ N-ma)] (2) ^d	5.85 ± 0.07	4.59 ± 0.08	7.98 ± 0.14	^b
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-dma)(¹⁵ N-ipa)] (3) ^e	5.91 ± 0.02	4.28 ± 0.03	7.29 ± 0.04	^b
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ NH ₃)(2-Me- ¹⁵ N-but)]	5.90	4.16	7.17	94
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)((S)-2-Me- ¹⁵ N-but)]	5.86	4.21	7.33	101
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]	5.63	4.35	7.40	102
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(cyclohexylamine)]	5.40	^h	^h	90
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(2-picoline)]	5.55	4.03	7.01	95
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(3-picoline)]	5.35	3.97	6.78	95
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(4-picoline)]	5.39	3.94	6.88	95
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]	6.41	5.37	7.21	89
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (dma) ₂]	6.37	5.17	6.47	98
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(cyclohexylamine)]	6.73 ^f	5.68 ^g	7.68 ^g	90
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(2-picoline)]	6.13/6.49	5.22	7.16	103
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(3-picoline)]	5.98/6.26	5.07	6.94	103

^a pK_a is the value for the mono-aqua complexes and pK_{a1} and pK_{a2} are the values for the diaqua complexes. ^b This work. ^c values are the mean of the pK_a values derived from the ¹H chemical shifts of the ¹⁵NH₂-ipa and -ma groups (Figure 1.15a). ^d values derived from the ¹H chemical shifts of the ¹⁵NH₂-ma group (Figure 1.15b). ^e values derived from the ¹H chemical shifts of the ¹⁵NH₂-ipa group (Figure 1.15c). ^f identical values obtained for both mono-aqua isomers. ^g value measured for the aqua ligand *trans* to NH₃. ^h not reported.

¹⁰¹ Pizarro, A. in PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Química Inorgánica. Madrid, 2004

¹⁰² Appleton, T. G.; Bailey, A. J.; Barnham, K. J.; Hall, J. R. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 3077

¹⁰³ Chen, Y.; Guo, Z.; Parsons, S.; Sadler, P. J. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 672

pK_a determination

The nature of the aliphatic amine ligands has little effect on the pK_a values of the aqua ligands in the monoqua adducts of **1-3** (5.9-6.0), which are also the same as that of *trans*-[PtCl₂(¹⁵NH₃)(2-Me-¹⁵N-butylamine)].⁹⁴ While this value is 0.4 pH units lower than that of cisplatin and *cis*-[PtCl₂(dma)₂], it is notable higher (0.3 to 0.5 pH units) than transplatin and other *trans*-Pt^{II} am(m)ine complexes (Table 1.12). For the diaqua forms of **1-3**, the first pK_a value is nearly 1 pH unit lower than that of the related *cis* complex, a trend that has been noted previously for other *cis* and *trans* diaqua complexes.⁹⁵ Both pK_a values for the diaqua complex of **2** are significantly higher (0.3-0.6 pH units) than those of **1** and **3**, which have very similar values.

Kinetic studies and calculations of rate constants

In this section, we first describe the changes in the ¹H/¹⁵N chemical shifts^{93,95,99} occurred when hydrolysis species are detected in the aqueous solutions of the ¹⁵N-labelled **1**, **2** and **3** complexes. Second, we show the species characterization, the analysis of their concentration and the calculations of the rate constants.

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-*ipa*)(¹⁵N-*ma*)] (**1**)**

Initially for **1**, ¹H/¹⁵N cross-peaks were observed at δ 4.13/-23.5 (*ipa*) and 4.15/-59.1 (*ma*), which were assigned to the dichlorido complex **1a**. A pair of weak cross-peaks (δ 4.30/-21.6 and 4.27/-57.7) were already visible in the first spectrum (*ca.* 20 min), which were assigned to the monoqua species **1b**. The peaks for **1a** decreased in intensity as the peaks for **1b** increased in intensity over a period of 2 h, at which time the monoqua species accounted for 18% of the total Pt species. A pair of peaks assignable to the diaqua complex **1c** (δ 4.41/-19.7 and 4.36/-55.8) first appeared after about 20 h and then gradually increased in intensity, with concomitant decrease in intensity of the peaks for **1b**, but this species accounted for only 2% of the Pt present in solution after 64 h.

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-*dma*)(¹⁵N-*ma*)] (**2**)**

For complex **2**, the aquation reaction was conveniently followed by observing the ¹H/¹⁵N peaks for the ¹⁵NH₂-*ma* group, but the ¹⁵NH-*dma* group could not be used as the ¹H shift for the dichlorido complex (**2a**) lies too close to the ¹H₂O

peak (Figure 1.14). In the initial spectrum (*ca.* 20 min) the most intense peak at δ 4.15/-61.3 was assigned to the dichlorido species **2a**, and the less intense peak (δ 4.33/-59.6) to the monoqua species (**2b**). Equilibrium was reached more quickly (*ca.* 1.6 h) than for complex **1**, and the monoqua species accounted for slightly less (16%) of the total Pt species present at this time. A peak at δ 4.39/-57.7, which was assigned to the diaqua species **2c** was first observed after 9 h, significantly earlier than in the reaction of **1**, but the diaqua species accounted for less than 1% of the total Pt present at 64 h.

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-dma)(¹⁵N-ipa)] (**3**)**

As for complex **2**, the ¹H/¹⁵N peaks for the ¹⁵NH-dma group of **3** could not be used to follow the aquation reaction due to the close proximity to the ¹H₂O peak (Figure 1.14). The aquation of **3** was followed by observing the change in intensity of the peaks for the ¹⁵NH₂-ipa group of the dichlorido complex **3a** (δ 4.11/-25.2) and monoqua species **3b** (δ 4.36/-22.9). The time dependence of the initial aquation was similar to that of complex **1**, with equilibrium attained after *ca.* 2.4 h, and the monoqua species accounting for a slightly greater percentage of the total Pt present (25%). However, in contrast to the aquation reactions of both **1** and **2**, no diaqua species was observed for **3**, on further incubation.

The time dependence of the concentrations of species detected during the aquation of **1** at 298 K is shown in Figure 1.16 along with curves from kinetic fits to the reaction model depicted in Scheme 1.5. Similar plots for the aquation of **2** and **3** are also provided in Figure 1.16. The derived rate constants (k_1 and k_{-1}) are listed in Table 1.13.

The low concentration of the diaqua species present in the solutions of **1** and **2** precluded reliable determination of the rate constants k_2 and k_{-2} from the kinetic fits, but the equilibrium constants for the first (pK_1) and second (pK_2) aquation steps were estimated based on the relative integrals of the three peaks (**a**, **b** and **c**, Figure 1.14) in the 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR spectra at equilibrium. An estimate of the half-lives for aquation of **1**, **2** and **3** are shown in Table 1.14 in comparison to related complexes, and the pK_a values and half-lives for aquation of the three complexes at 298 K are summarised in Scheme 1.7.

Aquation studies

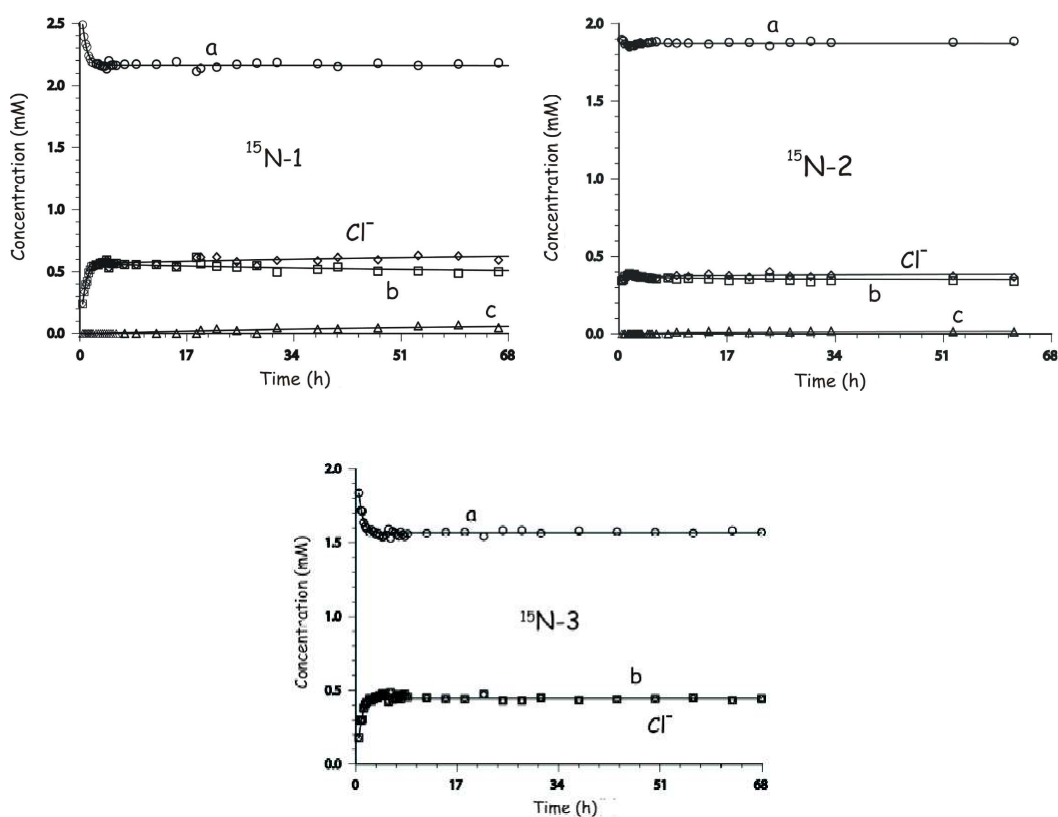


Figure 1.16 Plot of the time dependence of species in the aquation of $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ and $^{15}\text{N-3}$ (2.0-2.7 mM) in 100 mM NaClO_4 (90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$) at 298 K and pH 4.2-4.8. Labels: dichlorido (a) circles, monoaqua (b) squares, diaqua (c) triangles and chloride (Cl^-) diamonds. The concentrations are based on the integration of $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ peaks of the $\text{Pt-}^{15}\text{NH}_2/^{15}\text{NH}$ groups. The curves are computer best fits to the model shown in Scheme 1.5 and the rate constants are tabulated in Table 1.13

Pizarro *et al.* found evidence for Pt^{IV} species in aqueous solutions of *trans*- $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{NH}_3)(2\text{-Me-}^{15}\text{N-butylamine})]$ 24 h after dissolution in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$.⁹⁴ No similar evidence was found for Pt^{IV} species in solutions of **1**, **2** and **3** incubated for up to 3 days in a solution of **1** (starting pH 6.2) up to 19 days. However, on extended incubation of **1** for more than a month at 37°C, $[\text{H},^{15}\text{N}]$ signals consistent with Pt^{IV} species were observed as very weak peaks at δ 5.16/-3.1 (ipa) and 5.43/-33.1 (ma) (representing 4% of the total Pt species present). The ^{15}N chemical shift difference between the two signals ($\Delta\delta$ 30 ppm) is comparable to that found for the Pt^{II} species and the ^{15}N shifts (deshielded by ca. 20-25 ppm with respect to the peaks for the Pt^{II} species) are consistent with the previously observed trend.⁹⁴ The observation of a single peak in each region

differs from previous observations and indicates formation of a single ^{15}N -ipa- $\text{Pt}^{\text{IV}}\text{-}^{15}\text{N}$ -ma complex.

Table 1.13 Rate and equilibrium constants for the aquation of complexes **1-3**^a in comparison to other *trans*- Pt^{II} am(m)ine complexes, *cis*- $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N-dma})_2]$ and cisplatin (standard deviations in parentheses)

Compound	T ^a	k_1 (10^{-5} s^{-1})	k_{-1} ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$\text{p}K_1$	$\text{p}K_2$
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N-ipa})(^{15}\text{N-ma})]$ (1) ^a	298 K	5.5(2)	0.37(1)	3.90	4.2
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N-dma})(^{15}\text{N-ma})]$ (2) ^a	298 K	14 (7)	2(1)	4.18	4.7
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N-dma})(^{15}\text{N-ipa})]$ (3) ^a	298 K	6.1(3)	0.46(2)	3.89	^b
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N-dma})_2]$ ^c	298 K	2.12(1)	0.0067(8)	2.50	3.69
cisplatin ^d	298 K	2.38(4)	0.0046(3)	2.07	3.49
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(2\text{-picoline})]$ ^e	277 K	2.6(2)		3.41	^b
	310 K			3.43	
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(3\text{-picoline})]$ ^e	277 K	12.7(8)		3.70	^b
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4\text{-picoline})]$ ^e	277 K	5.2(3)		3.40	^b
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2\{\text{E-HN}=\text{C}(\text{OMe})\text{Me}_2\}]$ ^f	298 K	21.0(3)	0.0890(5)	2.63	2.27

^a 0.1 M NaClO_4 , pH 4.2-4.8, this work; k_1 and k_{-1} values are derived from computer best fits to the kinetic model (Scheme 1.5, Figure 1.16), rate constants k_2 and k_{-2} , where relevant, have large errors and are not included; equilibrium constants ($\text{p}K_1$ and $\text{p}K_2$) are based on the ratio of $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ peaks for a: b: c in the $[\text{H}, ^{15}\text{N}]$ NMR spectra at equilibrium (Figure 1.14). ^b Second aquation step not observed. ^c 0.1 M NaClO_4 , pH 5.8, ref ⁹⁸. ^d 0.009 M NaClO_4 , ref ⁹³. ^e ref ⁹⁵. ^f 0.05 M NaClO_4 , 298 K, ref ⁹⁶

In particular, our previous studies of the aquation solution chemistry of related *cis* complex *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{dma})_2]$ ⁹⁸ allow comparison with the aquation of *trans* dimethylamine complexes **2** and **3**. Higher rate constants are observed (Table 1.13) for these two complexes **2** and **3** in both the first aquation step (k_1 , 3-7 fold) and the back (anation) reaction (k_{-1} , 70-300 fold). This trend is consistent with that noted previously in comparing the aquation of *cis*- and *trans* Pt^{II} ammine complexes (e.g. cisplatin and transplatin), where the faster rate of hydrolysis of *trans* dichlorido complexes has been attributed to the different *trans*-labilising

Aquation studies

abilities in the substitution process ($\text{Cl}^- > \text{NH}_3$).^{95,104,105} Similarly, the second aquation step for transplatin is very slow,¹⁰⁴ attributed to the stabilizing effect of the H_2O ligand. It is very difficult to remove the second Cl^- ligand from *trans*- $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]$ and requires excessive heating in the presence of Ag^+ .^{102,106} In our reactions only small amounts of the diaqua complex were observed for **1** and **2** and none for **3**, consistent with previous observations for the related complex *trans*- $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{NH}_3)(2\text{-Me-}^{15}\text{N-butylamine})]$ ⁹⁴ and other *trans* am(m)ine complexes. For example, the three complexes *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(n\text{-picoline})]$ ($n = 2, 3$ or 4) showed no formation of the diaqua complexes at 277 K, and a small amount, for the 2-picoline complex, was observed at 310 K.⁹⁵

The comparison of our results with studies of other *trans*- Pt^{II} amine complexes in the art (Tables 1.13 and 1.14), shows that the aquation of both **1** and **3** is significantly slower than *trans*- $[\text{PtCl}_2\{(\text{E})\text{-HN}=\text{C}(\text{OMe})\text{Me}_2\}]$ ⁹⁶ and *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(n\text{-picoline})]$ ($n = 2, 3$ and 4),⁹⁵ whereas **2** is more similar. As pointed out by Lui *et al.*,⁹⁶ comparison with the corresponding rate constants for transplatin is not straightforward since the published data exhibit a large dispersion in values, as it can be checked visually by the aquation half-lives listed in Table 1.14.

Equilibrium constants for the monoaquation of **1-3** ($0.7\text{-}1.3 \times 10^{-4}$ M) are nearly two orders of magnitude less than the reported value for cisplatin (8.5×10^{-3} M)⁹³ and notably higher than *trans*- $[\text{PtCl}_2\{(\text{E})\text{-HN}=\text{C}(\text{OMe})\text{Me}_2\}]$ and *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(n\text{-picoline})]$ complexes (Table 1.13).

Half-Life Calculations

The half-life values for the first aquation step at 298 K follow the order **1** (3.5 h) \approx **3** (3.1 h) $>$ **2** (1.3 h). Since in principle, the electronic effects in these mixed amine complexes will be similar, it seems likely that the faster aquation of complex **2** is due to steric effects. Substitution reactions of square planar complexes generally occur *via* an associative process¹⁰⁷ and the presence of the more sterically demanding isopropylamine ligand in **1** and **3** is expected to hinder

¹⁰⁴ Lippert, B. in *Metal Ions Biological Systems*, ed. Sigel, A. and Sigel, H., Marcel Dekker Inc., New York, 1996, vol 33, pp. 105-141

¹⁰⁵ Arpalahti, J. in *Metal Ions Biological Systems*, ed. Sigel, A. and Sigel, H., Marcel Dekker Inc., New York, 1996, vol 32, pp. 379-395

¹⁰⁶ Mikola, M.; Arpalahti, J. *Inorg. Chem.* 1994, 33, 4439

¹⁰⁷ Tobe, M. L.; Burgess, J. in *Inorganic Reaction Mechanisms*, Addison-Wesley Longman Inc, New York, 1999, pp. 70-79

axial approach from above of the incoming water ligand thereby increasing the activation energy association with formation of the five-coordinate intermediate.

Table 1.14 Half-lives ($t_{1/2}$ (h)) for aquation of various Pt^{II} complexes

Compound	T (K)	dichlorido $t_{1/2}$ (h)	monoqua $t_{1/2}$ (h)	ref
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-ipa)(¹⁵ N-ma)] (1)	298	3.5	352	^a
	310	1.7	74.6	
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-dma)(¹⁵ N-ma)] (2)	298	1.3	270	^a
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-dma)(¹⁵ N-ipa)] (3)	298	3.1	b	^a
<i>trans</i> -[PtCl ₂ NH ₃ (2-picoline)]	277	7.43	b	95
	310	0.9	70.2	
<i>trans</i> -[PtCl ₂ NH ₃ (3-picoline)]	277	1.52	b	95
<i>trans</i> -[PtCl ₂ NH ₃ (4-picoline)]	277	3.68	b	95
<i>trans</i> -[PtCl ₂ {E-HN=C(OMe)Me} ₂]	298	0.92	77	96
transplatin	298	1.96	>3.9	108
	298.2	10.13		109
	318.2	0.18	48	110
cisplatin	298	8.1	13.7	93

^a This work

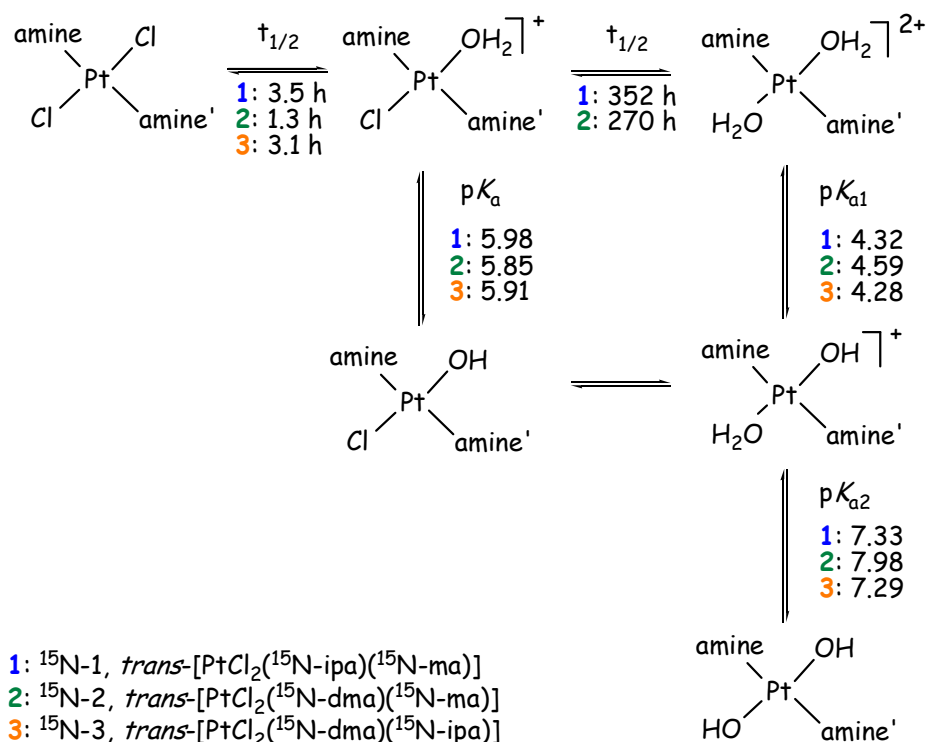
^b Not observed.

¹⁰⁸ Aprile, F.; Martin, D. S. J. *Inorg. Chem.* **1962**, *1*, 551

¹⁰⁹ Miller, S. E.; Gerard, K. J.; House, D. A. *Inorg. Chim. Acta.* **1991**, *190*, 135

¹¹⁰ Mikola, M.; Arpalahiti, J. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4439

Aquation studies



Scheme 1.7

Speciation profile under physiological conditions

In a similar aquation study of the trinuclear platinum complex 1,0,1/*t,t,t* (BBR3464)⁹⁹ the speciation profile was calculated at physiological pH (7.2), the intracellular Cl⁻ concentration of 22.7 mM reported for A2008 ovarian cancer cells¹¹¹ and a drug concentration of 1.8×10^{-8} M (the maximum tolerated dose of BBR3464 in patients). On the basis of the calculated equilibrium and dissociation constants listed in Tables 1.12 and 1.13, we used a similar approach to determine the speciation profile of 1-3 under these same conditions. The results (Table 1.15) show that the amount of hydrolysed species (<1%) is even lower than determined for BBR3464.

¹¹¹ Jennerwein, M.; Andrews, P. A. *Drug. Metab. Dispos.* **1995**, *23*, 178

Table 1.15 Speciation of **1**, **2** and **3** under physiological chloride concentrations in comparison to BBR3464^a

Compound	%		% of total hydrolysis products				
	Cl/Cl	Hydrolysis products	Cl/H ₂ O	Cl/OH	H ₂ O/H ₂ O	H ₂ O/OH	OH/OH
1	99.3	0.7	5.6	93.2	0	0.7	0.5
2	99.7	0.3	4.3	95.6	0	0.08	0.01
3	99.4	0.6	4.9	95.1	0	0	0
1,0,1/t,t,t (BBR3464) ^b	98.7	1.3	2.5	96.1	0	0.06	1.3

^a Based on calculated equilibrium and dissociation constants listed in Tables 1.12 and 1.13, a drug concentration of 1.8×10^{-8} M, pH 7.2 and [Cl⁻] 22.7 mM; the species Y/Y' represent mononuclear *trans*-[PtYY'(amine)₂] for **1-3** and dinuclear {PtY(NH₃)₂NR}₂ species for BBR3464. ^b ref⁹⁹

1.3.2.3.3 Aquation studies by conductimetry

Hydrolysis-Conductivity

Conductivity measurements were carried out for the Pt^{II} complexes: *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (**1**); *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] (**2**) and *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (**3**) and cisplatin at 298 K.

Figure 1.17 shows the variation of the conductivity versus time for cisplatin and *trans*-Pt^{II} complexes. From the values plotted, we can see how the *trans*-Pt^{II} complexes show similar conductivity, though each complex shows a characteristic value and also the conductivity varies in a slight different manner for each compound.

The plots (Figure 1.17) for *trans*-Pt^{II} complexes are different compared to cisplatin. The results reveal that the extent of hydrolysis of the *trans*-Pt^{II} complexes in solution is lower than cisplatin. Besides, in the case of the *trans*-Pt^{II} complexes the equilibrium is reached quickly than cisplatin.

Aquation studies

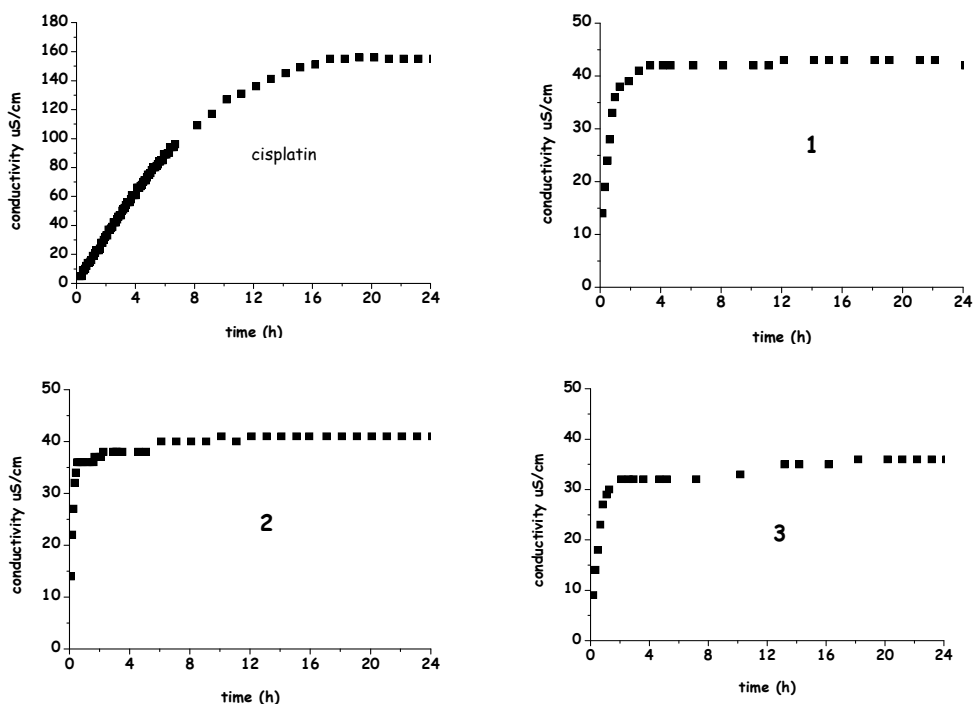


Figure 1.17 Conductivity ($\mu\text{S/cm}$) versus time (h): cisplatin, $\text{trans-[PtCl}_2(\text{ipa})(\text{ma})]$ (1), $\text{trans-[PtCl}_2(\text{dma})(\text{ma})]$ (2) and $\text{trans-[PtCl}_2(\text{dma})(\text{ipa})]$ (3)

Rate constants from conductivity

The Figure 1.18 shows the variation for the logarithm of the conductivity (initial phase of the hydrolysis) versus time. These graphs show a straight line with a slope equal to $-k$.

These slopes will provide the value of the hydrolysis rate (k) for the first aquation step of the complexes. The hydrolysis rates calculated as half of the slope's values, because of the mono aqua species and the chloride ions released upon hydrolysis. The concentration of Cl^- is equal to that of the mono aqua species.

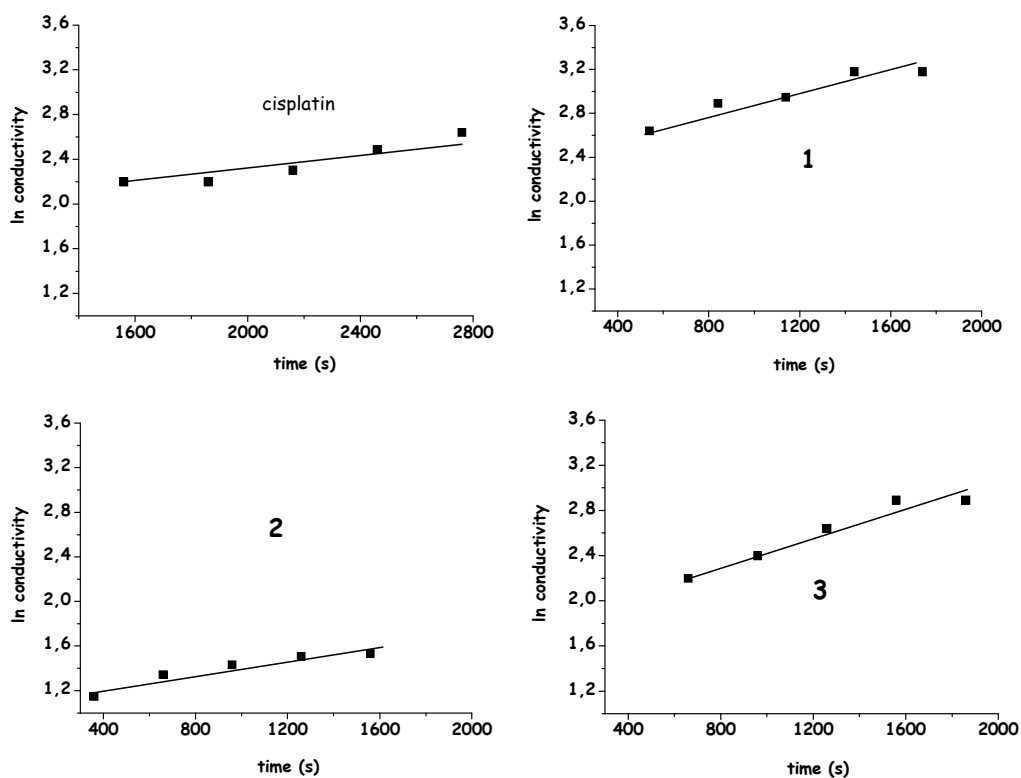


Figure 1.18 Variation of the logarithm of the conductivity versus time cisplatin, *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (1), *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] (2) and *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (3)

The resulting data of the rate constants are shown in Table 1.16. It should be pointed out that these values should be considered a guide of the values obtained by NMR.

Table 1.16 Rate constants for the first aquation step at 298K

Complex	k (10^{-4} s^{-1})
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]	2
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)]	2.2
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (dma)(ma)]	1.5
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (dma)(ipa)]	3

Aquation studies

In conclusion, the conductivity results show that following the study of the conductivity in aqueous solution for *trans*-Pt^{II}, we can obtain an approximate value of the hydrolysis rate and also know important kinetic's aspects, as the formation of the aqua species and the establishment of the equilibrium. Furthermore, the results reported here clearly indicate that conductimetry techniques can be used as a guide in the investigation of the platinum complexes' hydrolysis.

1.3.3 Photoactivation of *trans*-Pt^{II} complexes in aqueous solution and photoinduction reactivity with nucleobases

1.3.3.1 Introduction

Photodynamic therapy (PDT) has been attracting considerable attention for the treatment of a variety of cancers.¹¹² There is also some interest in developing photosensitive transition metal complexes for use in cancer chemotherapy. In this field the photochemistry of the platinum complexes has been the subject of special interest due to the light can induce a wide range of electronic transitions as d-d transitions and charge-transfer transitions. The transitions that can occur for complexes depend on oxidation state of platinum, ligands and type of bound metal-ligand.

Previous photochemical studies on cisplatin and transplatin have reported that irradiation induces substitution of chloro ligands by solvent H₂O or DMSO.^{69,68} Hence, the observations described in previous work showed that UVA light promotes the loss of the second chloro of transplatin.¹¹³ Also, the effect of irradiated transplatin has shown that an inactive platinum compound under UVA irradiation alters the DNA binding site into the DNA adduct of an active drug.¹¹³

Selectivity of pharmacological action is of crucial importance in drug therapy. Low selectivity leads to high toxicity and to a narrow therapeutic index. Thus, drugs with increased selectivity of action should improve on the success rates of chemotherapy. The development of photoactivatable prodrugs of platinum-based antitumor agents is aimed at increasing the selectivity and hence lowering toxicity of this important class of antitumor drugs. Platinum drugs are good candidates to be used in treating localized tumors accessible to laser-based fiber-optic devices.

¹¹² Bednarski, P. J.; Mackay, F. S.; Sadler, P. J. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2007, 7, 75

¹¹³ Heringova, P.; Woods, J.; Mackay, F. S.; Kasparkova, J.; Sadler, P. J.; Brabec, V. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 7792

1.3.3.2 Experimental

Starting materials

trans-[PtCl₂(ipa)(ma)] **1** and *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] **2** were prepared using previously described procedures (experimental section 1.3.1.2.4). 5'-GMP, 5'-CMP and 9-MetAde were purchased from Sigma-Aldrich and 5'-AMP from Acros Organic.

Sample preparation

The concentration of the stock sample used for experiments were prepared using platinum complexes solution 2.5 mM. Dilution of the stock sample was performed for the LC-MS characterization as explained in the corresponding section. The reactions between platinum complexes and nucleotides were performed in molar ratios 1:2.

The pH of the final solution in each experiment was adjusted in the range of 6.7-6.3. All pH measurements were performed at 298 K and calibration performed with standard buffer solution at pH 4.00 and 7.00. The instrument used for the pH measurements was Martini Mi150 pH meter, from Progen Scientific Ltd, equipped with a chloride-free semi-micro combination electrode (Thermo FisherScientific) calibrated with standard buffers (pH 4, 7 and 10, Aldrich).

Nuclear Magnetic Resonance

1D ¹H NMR spectra were recorded on a 500 MHz Bruker spectrometer using 5 mm tubes at 310 K. Solutions were prepared in 100 mM NaClO₄ and 90% H₂O with a final [Pt] = 2.5 mM. The ¹H chemical shifts were reported relative to internal 1,4-dioxane (δ 3.76 ppm).

Mass Spectrometry

MS studies were carried out in a HCT plus Bruker ion trap mass spectrometer. The final concentration used with these samples was 15 μM [Pt]. EsquireControl 5.2 software was used to analyse the MS spectra. Isotope modelling of the MS peaks was performed for all the assignments.

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LC-MS studies were carried out using a Hichrom C18 column (25 cm x 4.6 mm, 100 Å) connected to an Agilent ChemStation 1100 Series, with a DAD detector (275 nm), the outflow was routed to a HCT plus ion trap mass

Photoactivation of Pt^{II} complexes

spectrometer. Hystar 3.0 software was used to analyse the LC-MS results. The final concentration used with these samples was 1 mM [Pt].

The gradient method used for this analysis was as follows: 95% A 5 min; 95% A to 70% in 30 min; 70% A 5 min; 70% A to 95% A in 1 min and 95% A 5 min with 0.1% trifluoroacetic acid as an ion pairing agent, a flow rate 1 ml/min (A: water; B: acetonitrile).

Irradiation

The light source was a Luzchem LZC-ICH2 photoreactor oven using both Luzchem LZC-UVA (Hitachi) and LZC-VIS (Sylvania cool white) lamps, with no other sources of light filtration. The power levels were monitored using the appropriate probe window, calibrated against an OAI-306 UV power meter from Optical Associates, Inc. The photoreactor operates at 365 nm with temperature controller at 310 K and the power level obtained was 1.9 mW/cm².*

* 5 Jcm⁻² (1.77 mW/cm²) of UVA correspond to approximately 30-60 min of midday sun (Scotland) ref 113

1.3.3.3 Results and discussion

The photochemical studies of *trans*-Pt^{II} complexes with aliphatic amines as non-leaving groups *trans*-Pt[Cl₂(ipa)(ma)] **1** and *trans*-Pt[Cl₂(dma)(ma)] **2** have been investigated. The reaction of complex **1** with 5'-GMP, 5'-AMP and 5'-CMP in aqueous at pH 6-7 and in molar ratio 1:2 (Pt:nucleobase) is also studied in detailed.

1.3.3.3.1 Photoactivation of *trans*-Pt^{II} complexes in aqueous solution

Based on the hydrolysis studies already showed (section 1.3.2), we have performed the study of the irradiation effect on the *trans*-Pt^{II} complexes **1** and **2**. We have studied the hydrolysis of the complexes under irradiation conditions by ¹H NMR spectroscopy, MS spectrometry and LC-MS spectrometry when need it. The photoinduction effect on the hydrolysis of complex **2** was too difficult to be fully examined because of the overlapping methyl groups' signals on the species involved. For this reason, from now on, we will report the results obtained with complex **1**.

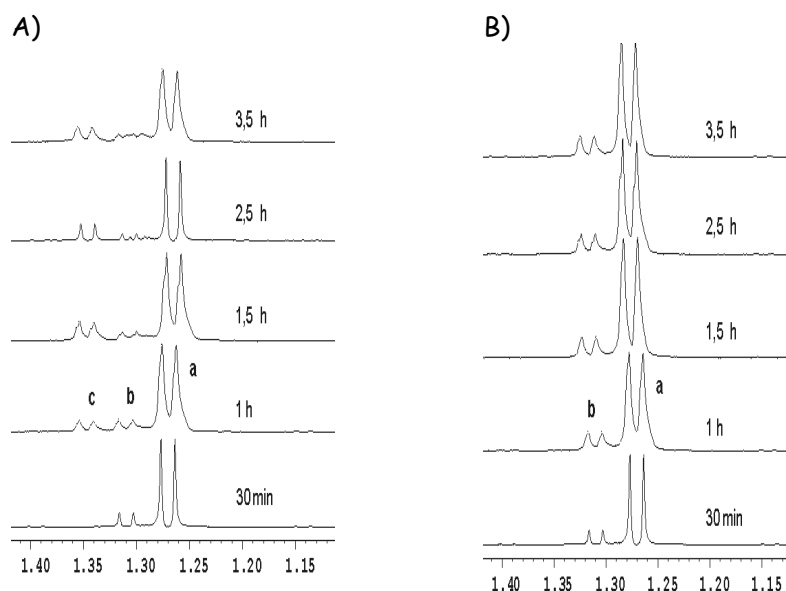


Figure 1.19 Progress of the hydrolysis of complex **1** by ¹H NMR spectroscopy at 310 K: A) irradiated and B) in the dark, showing changes in the CH₃ of isopropylamine ligand. Labels: **a** dichlorido, **b** monoqua and **c** diaqua species

Photoactivation of Pt^{II} complexes

Monitoring the 1H NMR spectra of complex **1** when non-irradiated, the isopropylamine group showed two major peaks: peak **a** at $\delta(^1H)$ 1.27 ppm and peak **b** at $\delta(^1H)$ 1.31 ppm, assignable to the dichlorido and monoqua complexes, respectively (Figure 1.19).

In the presence of light, the same sample quickly gave rise also to a new peak **c** at $\delta(^1H)$ 1.35 ppm, which is assignable to the diaqua species (see section 1.3.2.3.2). It is notable how the diaqua species concentration is higher than the monoqua species when the solution has been under irradiation just for 1,5 hours (Figure 1.20). Over the same time period, diaqua complex was not observed in the non-irradiated sample, in fact the diaqua species was not detected until 20 h from solution (see section 1.3.2.3.2).

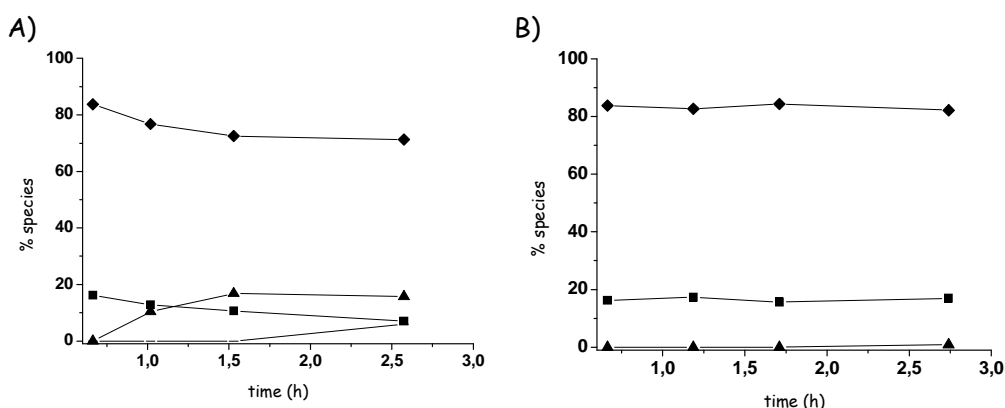


Figure 1.20 Effect of light on the hydrolysis of complex **1**. Time dependence of species in the aquation: A) irradiated and B) in the dark. Labels: ◆ dichlorido (**a**), ■ monoqua (**b**), ▲ diaqua (**c**) and - other species

LC-MS techniques were used to gather more data and confirm the observations for the hydrolysis products of complex **1** observed already by NMR. Chromatograms of complex **1** showed two single peaks (**a**) and (**b**) with very similar elution time (Figure 1.21B and 1.21C).

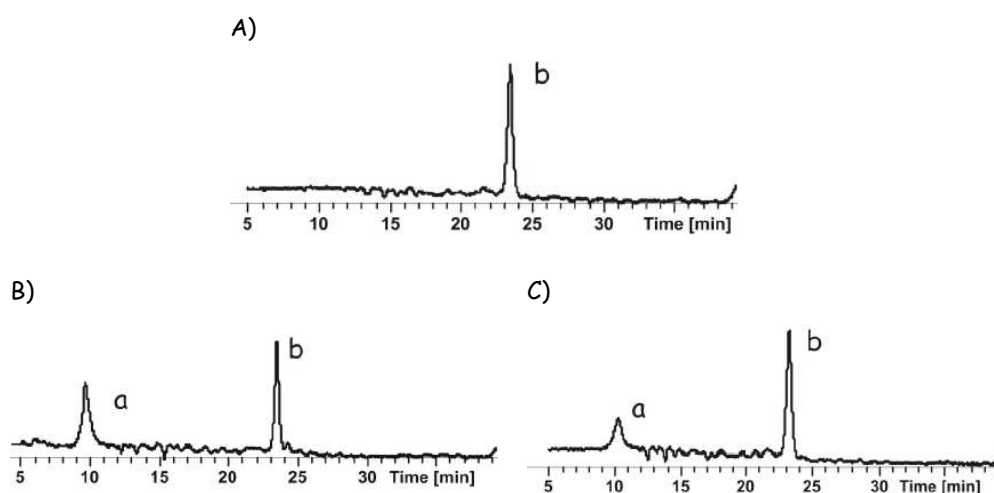


Figure 1.21 Chromatograms of the aqueous solution of complex 1: A) initial solution and after 4 hours B) irradiated and C) in the dark

In spite of that these chromatographs could indicate that same species are present in both samples, we could not confirm this fact by MS. Peak "b" gives two different unknown molecular ions (fragmentation could had probably taken place) and the MS data regarding peak "a" show different results: no ionization was detected in the non-irradiated sample, but the photoinduced sample showed one peak at 374 m/z that corresponds to the mono-aqua complex with a hydrochloric acid molecule (Figure A1-1 appendix). We have looked through the art for information about diaqua species, but unfortunately we haven't found appropriated conditions to detect these species. It seems that aqua species, in general, are difficult to detect by MS.

The experiments performed in this work seem to indicate that the irradiation of the sample produces a profound change in the complex 1 hydrolysis, promoting the diaqua complex formation (Figure 1.20) while only mono-aqua complex was observed at dark conditions.

1.3.3.3.2 Photoinduced reactivity of *trans*-Pt^{II} complexes with nucleobases

The next step of this work was the platination reaction of nucleotides by complexes 1 and 2 with the following biological molecules models: 5'-GMP, 5'-AMP and 5'-CMP (Figure 1.22).

Photoactivation of Pt^{II} complexes

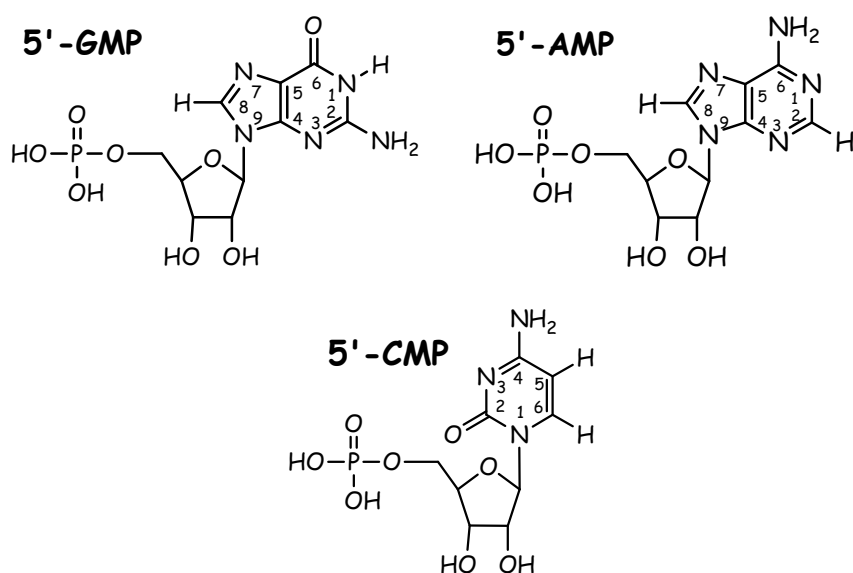


Figure 1.22 Structures of nucleotides 5'-GMP, 5'-AMP and 5'-CMP

Numbering and structures of all adducts studied in this work are compiled in Table 1.17.

Table. 1.17 Adducts numbering formed by complex 1

monoadduct (m): [PtXL(ipa)(ma)] ⁿ⁺			bisadduct (b): [PtL ₂ (ipa)(ma)] ²⁺	
Complex	X	L	Complex	L
m ₁	Cl	5'-GMP	b ₁	H ₂ O
m ₂	H ₂ O	5'-GMP	b ₂	5'-GMP
m ₃	Cl	5'-AMP	nd	H ₂ O
m ₄	H ₂ O	5'-AMP	nd	5'-AMP
m ₅	Cl	N7-9MetAde	nd	H ₂ O/N7-9MetAde
m ₆	H ₂ O	N7-9MetAde	nd	H ₂ O/N7-9MetAde
m ₇	Cl	N1-9MetAde	nd	H ₂ O/N1-9MetAde
m ₈	Cl	5'-CMP	nd	H ₂ O/5'-CMP

n. d. = non detected

Complexes **1** and **2** results obtained from the reaction with 5'-GMP, 5'-CMP and 5'-AMP were very similar. Because of the NMR for complex **1**, as we have already mentioned, is significantly clearer (not overlapping signals take place), so we decided to study in detail the mentioned reactions with complex **1**. Information for complex **2** is compiled in the Figure A1-2a and b (appendix).

We studied the reactivity first following the ^1H NMR changes over the time (to 4 hours total). The next step was the analysis of the species formed by integrating the corresponding NMR signal and plotting it over the time. These graphs will include the unreacted base and will be of great help in the discussion (Figure 1.25).

The most useful NMR signal, not only in the characterization of the adducts formed, but also in the platination site identification was the corresponding H8 (H6 for 5'-CMP). The analysis of the H8 changes (in comparison with the free bases) allows the adduct characterization and the pH variations allow to identify platination sites which are blocking the protonation and affecting the H8 shift.

MS was finally performed at 30 min, 1 h, 2 h, 3 h and 4 h. In the following sections, results are presented and discussed for the nucleobases selected.

Reactivity of complex *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] with 5'-GMP

The photoinduced reaction between complex **1** with two equivalents of 5'-GMP has been monitored by ^1H NMR (Figure 1.23). The following peaks were assigned to H8 for the 5'-GMP: 8.15 ppm (**H8**) when free,[‡] 8.84 ppm when the mono-adduct complex [PtCl(5'-GMP)(ipa)(ma)]⁺, **m**₁ and 8.97 ppm when the bis-adduct complex [Pt(5'-GMP)₂(ipa)(ma)]²⁺, **b**₂. The bisadduct (**b**₂) signal for H8 in the photoinduced reaction (**I**) is higher than the monoadduct and also increases faster than in the non-irradiated (**D**) reaction. The CH₃-isopropylamine peaks **m**₁ and **b**₂ can be assigned to mono-adduct and bis-adduct as the corresponding peaks intensities follow the pattern observed for 5'-GMP peaks H8-**m**₁ and H8-**b**₂. Both signals showed an additional small coupling in their multiplicity (from a doublet in the starting material to a doublet of doublets) that it is probably caused by some kind of steric impediment that makes non equivalent the methyl groups. Some additional hydrolysis products (**h**) of the complex **1** are also detected in the irradiated sample which supports the previous hydrolysis observations (section 1.3.3.3.1).

[‡] The irradiation of the sample produces a small change to higher field in the H8 the free 5'-GMP indicative of the monophosphate group 5'-GMP protonation. The final pH for the photoinduced reaction was 6.0 which corroborate this phenomenon

Photoactivation of Pt^{II} complexes

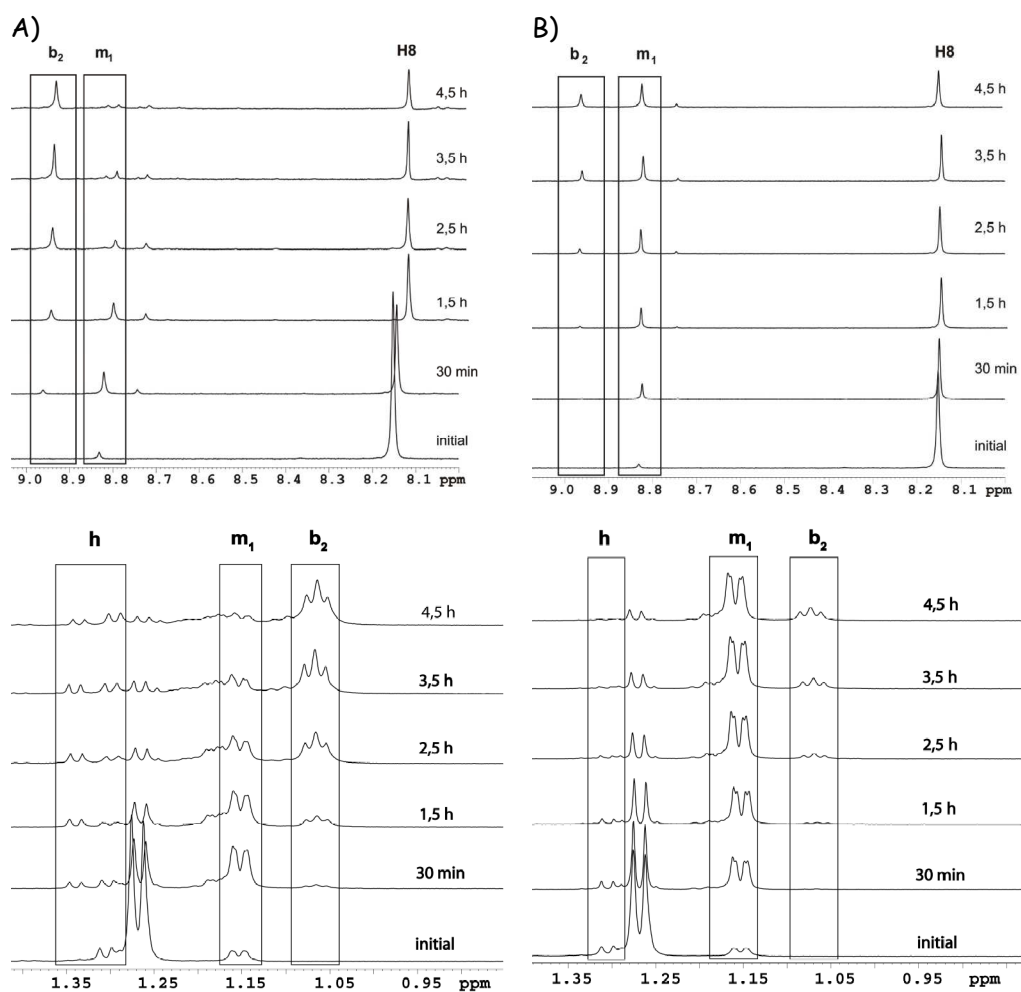


Figure 1.23 Progress of the reaction between complex 1 with 5'-GMP as monitored by ¹H NMR spectroscopy, showing changes in the H8 (above) and CH₃-isopropylamine group (below) region: A) irradiated B) in the dark. Labels: m_1 [PtCl(5'-GMP)(ipa)(ma)]⁺; b_2 [Pt(5'-GMP)₂(ipa)(ma)]²⁺; H8 5'-GMP free and h hydrolysis products

The lack of changes on the H8 at pH < 4 in the mono and bisadduct versus pH allow confirming the platination in the N7 of 5'-GMP (Figure 1.24). There was no protonation as the N7 was blocked by the Pt atom. The different slopes detected at 4 > pH > 11 indicate guanosine phosphate group and N1 protonations.

These slopes are in accordance with the graphs found in the literature which pK_a values are around 6 and 9, respectively.¹¹⁴

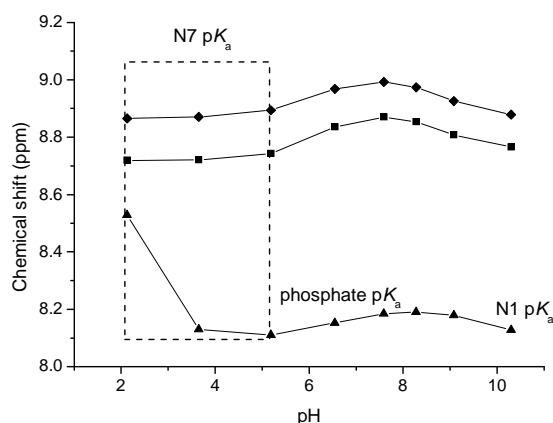


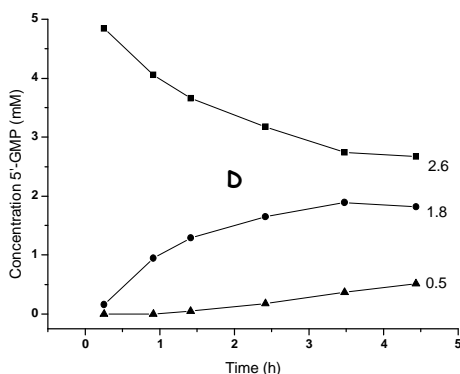
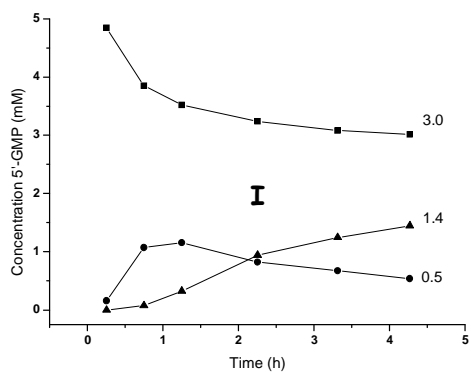
Figure 1.24 H8 NMR chemical shift variation observed for the products from complex 1 reaction with 5'-GMP versus pH. Labels: \blacktriangle 5'-GMP free (H8); \blacksquare m_1 , $[\text{PtCl}(5'\text{-GMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$; \blacklozenge b_2 , $[\text{Pt}(5'\text{-GMP})_2(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$

The final confirmation of adducts formation was performed by MS. Surprisingly, the detection of the monoadducts when a nucleobase is bound to the Pt adduct is possible. The non-irradiated sample spectra (Figure A1-3 appendix) revealed the presence of the monoadduct m_1 $[\text{PtCl}(5'\text{-GMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$ species assigned from the peaks at 684.12 m/z $[M^+]$ and 706.09 $[M^+-H^++Na^+]$. Minor peaks were detected at 665.16 $[M^{2+}]$, 1002.14 $[M^{2+}-H^+]$, 1010.23 $[M^{2+}-H^+]$ and 1032.18 $[M^{2+}-2H^++Na^+]$ corresponding to the monoadduct m_2 $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(5'\text{-GMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$, the bridged species $\{(\mu\text{-}5'\text{-GMP})[\text{PtCl}(\text{ipa})(\text{ma})]_2\}^{2+}$ and the bisadduct species b_2 $[\text{Pt}(5'\text{-GMP})_2(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$. The same pattern was observed in the irradiated sample where the signals were more significant in intensity for the bisadduct complex in agreement with the results observed in NMR.

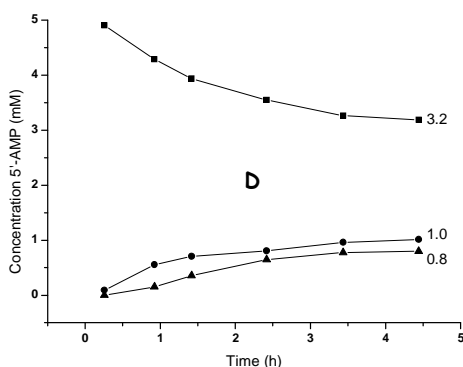
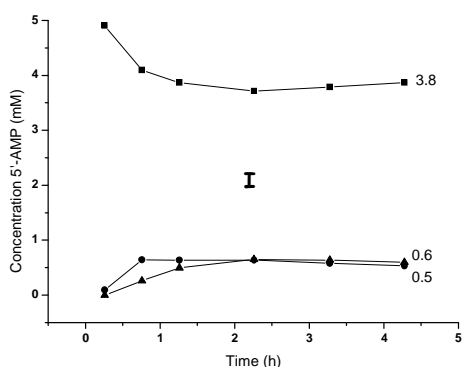
¹¹⁴ Dawson R. M. C. Data for Biochemical Research, Oxford, Clarendon Press. 1959

Photoactivation of Pt^{II} complexes

A) 5'-GMP



B) 5'-AMP



C) 5'-CMP

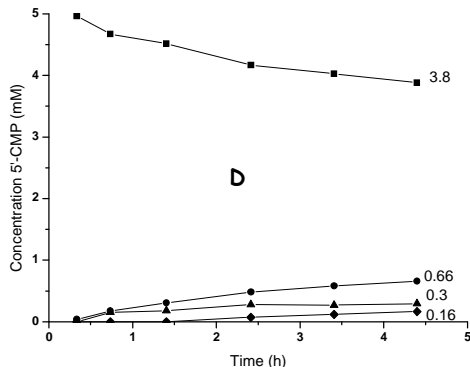
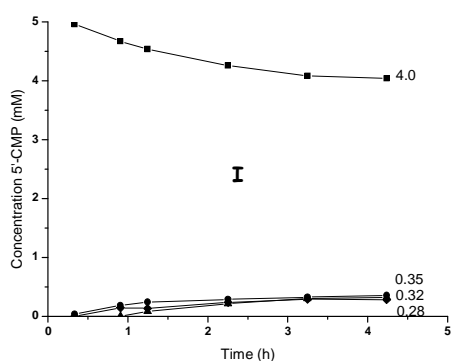


Figure 1.25 Kinetic profiles of complex 1 reactivity with A) 5'-GMP B) 5'-AMP and C) 5'-CMP under irradiation I and in the dark D. Labels: ■ 5'-GMP free, ● adduct (m_1) and ▲ adduct (b_2); ■ 5'-AMP free, ● adduct (m_3) and ▲ adduct (m_4); ■ 5'-CMP free, ● adduct (m_8) and ▲, ◆ unknown adducts (u). The concentration for the bisadduct has been calculated taking into account the different stoichiometric

The progression of m_1 and m_2 is different in the irradiated sample, and the most remarkable data is deduced from the final concentration graph (Figure 1.25A), where it can be clearly observed how the irradiation produce an important enhancement in the bisadduct complex b_2 concentration $[\text{Pt}(5'\text{-GMP})_2(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$ (Figure 1.23). The results obtained in the reaction of complex **1** with two equivalents of 5'-GMP have shown that irradiation promotes formation of the bisadduct.

Reactivity of complex *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{ipa})(\text{ma})]$ with 5'-AMP

The influence of the photoactivation in the reaction of complex **1** with 5'-AMP has been also investigated.

We could detect two sets of double signals in the H8 region arising in the spectra at 9.15 (centre of the first set m_4) and 9.26 ppm (centre of the second set, m_3) in both samples: **D** (dark) and **I** (irradiated) (Figure 1.26). These unexpected signals in the ^1H NMR spectra (this double set is also observed for H2), might indicate the presence of two different species for the platinum:5'-AMP adduct. The 2D $[\text{H},^{13}\text{C}]$ NMR showed clearly how these sets correspond to H8 from new products (Figure 1.27), as both sets of protons (H8 and H2) separately correlates with carbon signals in the corresponding region (assigned to C8 and C2).

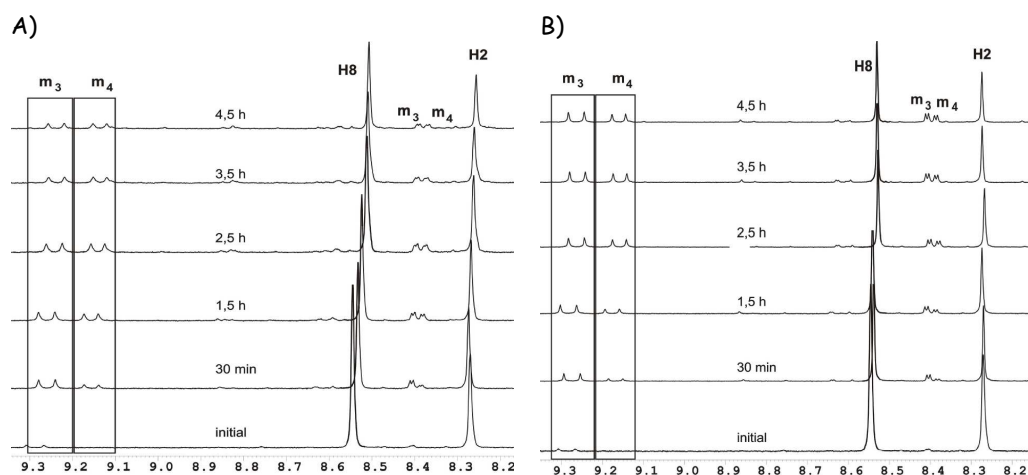


Figure 1.26 Progress of the reaction between complex **1** and 5'-AMP as monitored by ^1H NMR spectroscopy on the time A) irradiated and B) in the dark, showing changes in the H8/H2 of the different compounds detected. Labels: m_3 $[\text{PtCl}(5'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$ and m_4 $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(5'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$ adducts and **H8**, **H2** 5'-AMP free

The H8 signals at 9.15 m_4 and 9.26 ppm m_3 are of higher intensity in the sample **D** than in sample **I**. It is notable (species distribution in Figure 1.25B) how the new adducts, whether they are two rotamers or two different adducts,[‡] grow simultaneously after 1,5 h in the sample **I** and after 2,5 h in the sample **D**. The results obtained by NMR, showed how irradiation does not promote complex **1** adduct formation with 5'-AMP.

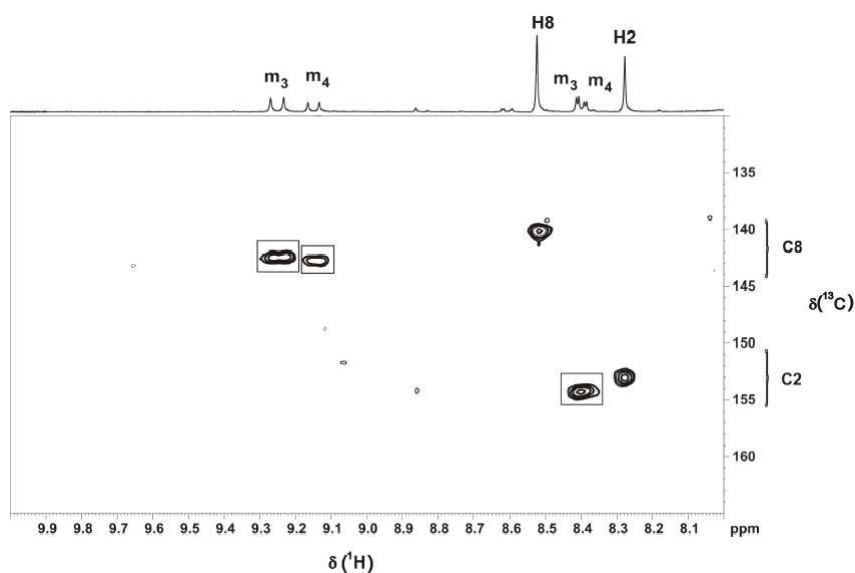


Figure 1.27 2D [$^1H,^{13}C$] HMQC NMR spectra from the 5'-AMP reaction with the complex **1** after 4 hours reaction, showing signals in the **H8/C8** and **H2/C2** regions. Labels: m_3 $[PtCl(5'-AMP)(ipa)(ma)]^+$, m_4 $[Pt(H_2O)(5'-AMP)(ipa)(ma)]^{2+}$ adducts, and **H8** and **H2** 5'-AMP free

To confirm the nature of the detected species, as usual, the sample was characterized by MS. The formation of two different species were confirmed and assigned in the MS spectra to the corresponding monoadducts: monoadduct m_4 $[Pt(H_2O)(5'-AMP)(ipa)(ma)]^{2+}$ with the peak at 649.16 m/z $[M^{2+}-H^+]$, and monoadduct m_3 $[PtCl(5'-AMP)(ipa)(ma)]^+$ with the peaks at 668.12 $[M^+]$ and 690.10 $[M^+-H^++Na^+]$ (Figure A1-4). The bisadduct $[Pt(L)_2(ipa)(ma)]^{2+}$ of the kind observed as a major product in the reaction with 5'-GMP **b**₂, was not detected in the 5'-AMP reaction; in fact the most remarkable difference found in the MS spectra of

[‡] Upon increasing the temperature of the sample from 310 to 323 K, the NMR spectra do not show significant differences like signal broadening or coalescence (data not shown)

these samples, was the detection of only monoadducts species,^x and most importantly, these results are consistent with those obtained by ¹H NMR that shows two different species.

Following the procedure described for these studies, the next experiment was monitoring the changes of H8 in the monoadducts versus the pH (Figure 1.28). The most remarkable data from this experiment is that the two set of signals assigned to H8 in both monoadducts [PtCl(5'-AMP)(ipa)(ma)]⁺ **m**₃ and [Pt(H₂O)(5'-AMP)(ipa)(ma)]²⁺ **m**₄ become in only one set upon lowering the pH. The progression ¹H NMR of these sets along the pH is shown in Figure A1-5.[Ⓢ] Further pH studies proved that this fact is irreversible. We couldn't observed the protonation of either N3 or N1 in this titration[Ⓢ] but this fact is not very surprising, as we can also find in the literature how the platinum binding to adenine and their N9-substituted models in N7 and/or N1¹¹⁵ produce a strong acidification of the adenine available N atoms. Based on these data and the 2D [¹H,¹³C] HMQC NMR spectra, we have finally assigned the chemical shifts of H8 in both monoadducts (**m**₃ and **m**₄) to N7 coordination.

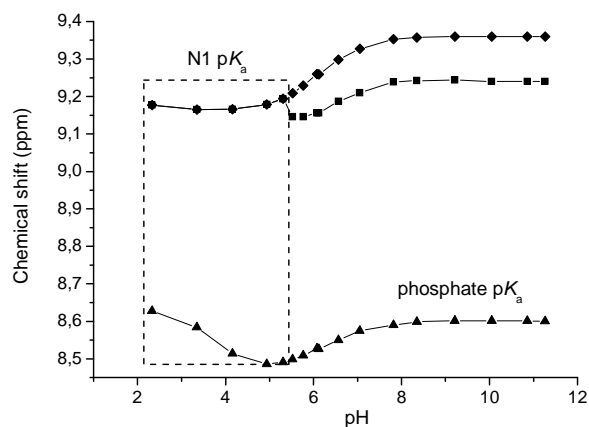


Figure 1.28 Variation with pH of the ¹H NMR chemical shift of the signals for H8 5'-AMP free (\blacktriangle) and adduct **m**₃ [PtCl(5'-AMP)(ipa)(ma)]⁺ (\blacklozenge) and adduct **m**₄ [Pt(H₂O)(5'-AMP)(ipa)(ma)]²⁺ (\blacksquare) from the reaction of complex **1** with 5'-AMP

^x Minor products at 968.19 m/z [M³⁺-2H⁺] and 986.14 [M²⁺-H⁺] were also detected and assigned to the following species ((μ-5'-AMP){[PtCl(ipa)(ma)][PtH₂O(ipa)(ma)]})³⁺ and {(μ-5'-AMP)[PtCl(ipa)(ma)]₂}²⁺ respectively (Figure A1-4)

[Ⓢ] Increasing the pH to basic solution, the intensity of one of the adducts (H8-signal **m**₄) increases upon the drop of the other monoadduct signal (H8-signal **m**₃)

[Ⓢ] Plots of δ(H2/H8) versus pH show characteristic pK_a shifts for the proton-affinity ring nitrogen, which depend on the platination site

¹¹⁵ Kampf, G.; Luth, M. S.; Kapinos, L. E.; Muller, J.; Holy, A.; Lippert, B.; Sigel, H. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1899

Two different species were separated at the LC-MS at acid pH (1% TFA), the starting material 5'-AMP at 348.06 m/z [M⁺], and the monoadduct **m**₃ [PtCl(5'-AMP)(ipa)(ma)]⁺ at 668.09 m/z (Figure A1-6). It is clear that each set of the double signals detected (for the 5'-AMP protons H8 and H2) corresponds to one adduct, as it can be demonstrated with the MS spectra that only one adduct is present in acidic conditions, and more important, no aqua-base complex was detected. It has also been observed how **m**₄ interconvert to **m**₃ in acidic condition.

Finally, the following important difference observed for the reaction of complex **1** with 5'-AMP compared with the 5'-GMP, was the lack of bisadduct complex and the presence of both monoadduct complexes [PtCl(5'-AMP)(ipa)(ma)]⁺ and [Pt(H₂O)(5'-AMP)(ipa)(ma)]²⁺ (**m**₃ and **m**₄, respectively). These NMR studies also showed a particular feature in both monoadducts regarding the multiplicity of their H8 signal. The most plausible reasoning for this unexpected multiplicity is to think in a hindered rotation around Pt-N bond.

Reactivity of complex *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] with 9MetAde

We thought that studies of complex **1** reactivity with adenine models N9-substituted, such as 9-methyladenine (Figure 1.29), will help to understand the metal binding, the acidification of the free sites and also the NMR features detected in the 5'-AMP adducts.

The reaction of complex **1** with 9MetAde was studied with the same procedure than 5'-AMP reaction.

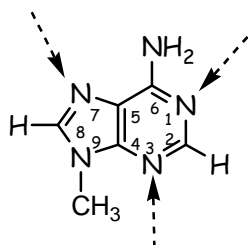


Figure 1.29 Structure of 9MetAde and coordination sites

A useful diagnostic tool in the assignment of the metalation site as mentioned at the beginning of this section in the nucleobases is analyzing the

magnitude of chemical shift differences for H2 and H8.¹¹⁶ The ¹H NMR spectra for 9MetAde and complex **1** are collected in Figure 1.30.

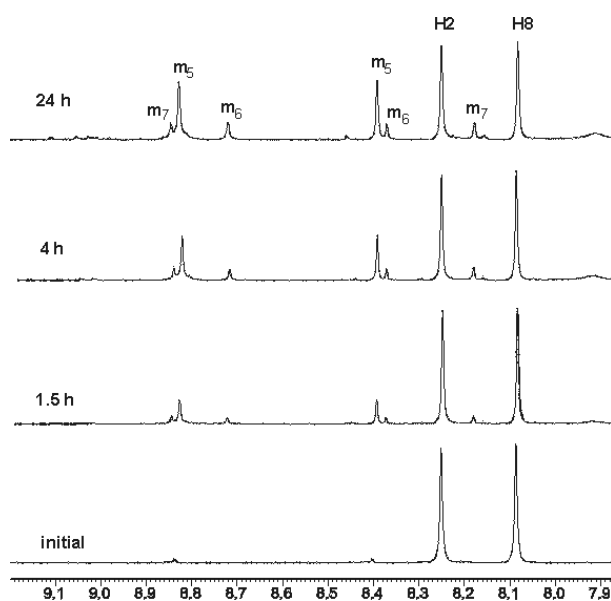


Figure 1.30 Progress of the reaction of complex **1** with 9MetAde monitored by ¹H NMR spectroscopy, at the same conditions than the reaction studied with 5'-AMP. Labels: **m**₅ adduct (Cl/N7-9MetAde coordination); **m**₆ adduct (H₂O/N7-9MetAde coordination); **m**₇ adduct (Cl/N1-9MetAde coordination) and **H2**, **H8** 9MetAde free

The [¹H,¹³C] HMQC experiment led the precise information assignment of protons H2 and H8 in each adduct (Figure 1.31) and a detailed description is given as follows. Mayor product **m**₅, shows H8 at 8.83 which shifts $\Delta\delta$ [‡]:0.7 to a lower field and H2 at 8.39 ppm which only shifts $\Delta\delta$ 0.15. N7-coordination is determined based on the most pronounced change observed on the H8 chemical shift. Minor product **m**₇ shows H8 at 8.18 ppm which shifts $\Delta\delta$: 0.09 and H2 at 8.85 ppm which shifts $\Delta\delta$: 0.60. In this product the strongly marked change takes place in H2, and also to a lower field, as a result N1-coordination is assigned for this adduct. And finally minor product **m**₆: H8 at 8.72 which shifts $\Delta\delta$: 0.6 and H2 at 8.38 which shifts $\Delta\delta$: 0.12. In this product the strongly marked change takes place one more time in H8, and also to a lower field, we think that this adduct

¹¹⁶ Colin, G. B.; Cynthia, S. D.; Bierbach, U. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1160

[‡] $\Delta\delta$: defined as $\delta(\text{H8}/\text{H2Ptadduct}) - \delta(\text{H8}/\text{H2modelbasefree})$

must be N7-coordination with some other different ligand in *trans* configuration to the adduct assigned m_5 .

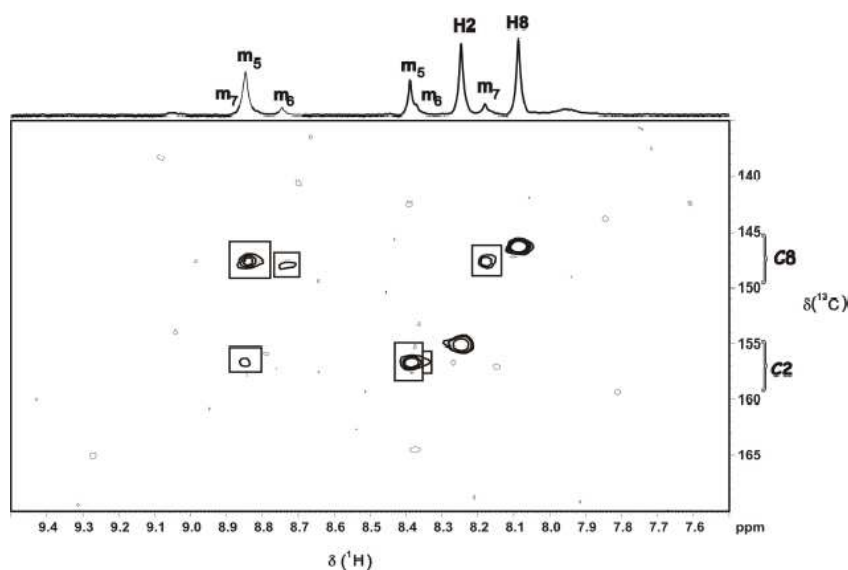


Figure 1.31 2D $[^1H,^{13}C]$ HMQC NMR after 4 hours of the reaction of complex **1** with 9MetAde. Labels: m_5 adduct (Cl/N7-9MetAde coordination); m_6 adduct (H_2O /N7-9MetAde coordination); m_7 adduct (Cl/ N1-9MetAde coordination) and **H2**, **H8** 9MetAde free

The ESI spectra of the reaction of *trans*- $[PtCl_2(ipa)(ma)]$ with 9MetAde show a peak at 470.12 m/z assigned to the *trans*- $[PtCl(9MetAde)(ipa)(ma)]^+$ adduct whether is coordinated to N7 or N1, as the molecular weight is exactly the same.

As by NMR the complex **1**:5'-AMP adduct showed how the two set of double signals coalescence into one set of signals in acidic conditions, and only the chlorido adduct was present (ESI spectra), we thought that the 9MetAde adducts might have similar behaviour. The ESI study of the reaction complex **1** with 9MetAde was then performed at acidic conditions (0.5% TFA) and the results showed (Figure A1-7 appendix) how the aqua complex,^ø disappear in acidic conditions and only one of the two minor species detected in neutral conditions is now present in solution: *trans*- $[PtCl(9MetAde)(ipa)(ma)]^+$. This is supported by the

^ø In spite of its low concentration, the aqua complex at neutral conditions is detected (451.15 m/z). As we point out before, it was surprising the detection of these species in MS, as there are no examples in the art of these species characterization

NMR of the mentioned acidic sample (Figure A1-8 appendix), where the minor signals m_6 and m_5 coalesce into one signal, in the same manner than the 5'-AMP monoadduct signal became in the 5'-AMP monochlorido adduct.

Overall, these experiments performed show that no bisadducts were detected with 9MetAde and moreover none of the monoadducts detected showed the double signal observed in each of the 5'-AMP adducts, which indicates that the 5'-AMP base is the only one which produces this particular multiplicity.

Moreover, our interpretation of what is happening in acidic solution is that the monoadduct complex m_6 undergoes substitution reaction where a molecule of water is replaced by a chlorido ligand. In spite of the low Cl^- concentration present in solution, the only ion with coordinating properties is the Cl^- , as TFA^- (present in ESI), or ClO_4^- (present in NMR) and/or H_3O^+ are not coordinating or appropriated ligands for substitution reaction.

Reactivity of complex *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] with 5'-CMP

The adduct formation of complex **1** and 5'-CMP has been assigned by the appearance of two new doublets for H5 and H6 in the ¹H NMR spectra (Figure 1.32), in the same way that it has been previously described.¹¹⁷

The plot of H6 chemical shift versus pH, from 5'-CMP free and from the reaction are shown in Figure 1.33. The absence of changes in the chemical shift at pH < 5 confirmed the platination in N3 of 5'-CMP. The ESI-MS spectra of both samples **I** and **D** showed the presence of [PtCl(5'-CMP)(ipa)(ma)]⁺ species as peaks at 644.10 m/z [M^+] and 666.07 [$M^+ - H^+ + Na^+$] (Figure A1-9).

A closer look to the NMR spectra of both samples (Figure 1.32 for H6 area as an example) shows that together with the presence of a major adduct assigned to the signal m_8 (doublet centre at δ 8.16 ppm for H6), other two sets of doublets (u unknown signals) corresponding to unknown minor products which also appeared in the spectra. Note that only one signal was observed in the ¹H NMR spectra at acid pH (Figure A1-10 appendix) while several signals (m_8 and u) had significant intensity at neutral and basic pH. This is similar to what happened in the case of 5'-AMP reaction.

¹¹⁷ Bierbach, U.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 3657

Photoactivation of Pt^{II} complexes

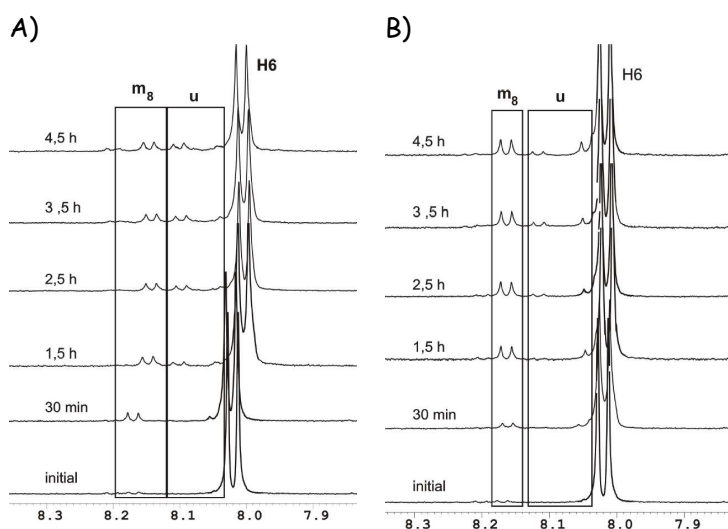


Figure 1.32 1H NMR spectra for the reaction between complex **1** and 5'-CMP A) irradiated B) in the dark, showing changes in the H6 region. Labels: m_8 $[PtCl(5'-CMP)(ipa)(ma)]^+$, **u** unknown adducts and **H6** 5'-CMP free

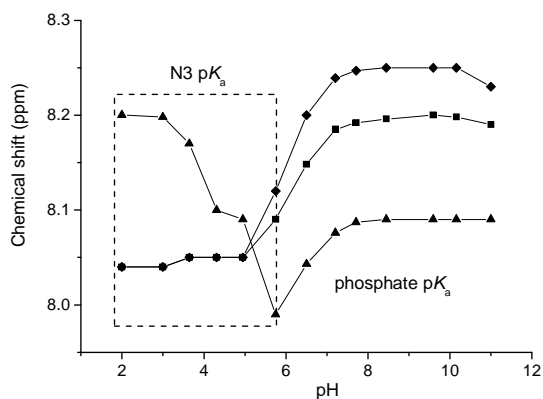


Figure 1.33 The pH dependence of 1H NMR spectra of complex **1** with 5'-CMP. Note that the adducts have the same intensity at neutral pH and only one adduct had significant intensity at acid pH. Labels: \blacktriangle 5'-CMP free (**H6**), \blacklozenge (m_8), $[PtCl(5'-CMP)(ipa)(ma)]^+$ adduct and \blacksquare (**u**) unknown adducts

The species concentration curves show slightly higher formation for the major adduct in dark conditions (Figure 1.25C). Such small differences seem to be not very significant compared with the 5'-GMP adduct species, so the irradiation of complex 1 with 5'-CMP is not as critical as it has been for the 5'-GMP adduct formation.

In conclusion, these results indicate more similarities with 5'-AMP regarding the adduct formation, as only the monoadduct complex m_8 could be characterized and no bisadduct complex was detected.

1.3.4 Photochemistry and electrochemistry studies of dihydroxido *trans*-Pt^{IV} complexes

1.3.4.1 Introduction

Photochemistry

Photoactivatable Pt^{IV} antitumor agents represent a promising area for new drug development. An excellent example is the recent work by Sadler and co-workers of *trans*-dihydroxido Pt^{IV} complexes *cis,trans,cis*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)₂] and *trans,trans,trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)₂] incorporating azide ligands^{66,67} that seems to demonstrate a number of rule-breaking properties.¹¹⁸

A novel application of this phenomenon for therapeutic purposes is the development of light-sensitive Pt^{IV} prodrugs that can be photoactivated directly at the site of the tumor with laser light.

Pt^{IV} complexes could be easily photoactivated taking advantage of photochemical features of ligands, choosing appropriate ligands such as N₃ allows the control of the complex photoreduction.

Much work remains to be done on fundamental photochemistry of platinum complexes, for example, to see whether the Pt^{IV} complexes require the presence of reducing ligand in their structure (as N₃) to be photoactivated. In order to know if that photoinduction is possible we have performed studies on the photoredox chemistry of the *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)].

Electrochemistry

Reduction potentials for Pt^{IV} complexes have been shown to correlate the length of time the Pt^{IV} complex survive *in vivo* before it is reduced to Pt^{II}.¹¹⁹ Since it is generally accepted that the Pt^{IV} species are first reduced *in vivo* to Pt^{II} before undergoing binding with DNA, susceptibility to reduction is an important consideration for antitumor activity.

Too rapid or too ready reduction may be unfavourable as the side effects associated with the more reactive Pt^{II} species are greater. Too slow might lead to the Pt^{IV} complex being passed through the body without effecting any anti-cancer activity.

¹¹⁸ Hambley, T. W. *Coord. Chem. Rev.* **1997**, *166*, 181

¹¹⁹ Choi, S.; Filotto, C.; Bisanzo, M.; Delaney, S.; Lagasee, D.; Whitworth, J. L.; Jusko, A.; Li, C.; Wood, N. A.; Willingham, J.; Schwenker, A.; Spaulding, K. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2500

The reduction potentials of diamm(m)ine Pt^{IV} complexes are dependent on many factors,¹²⁰ and the nature of axial ligands seems to be of a stronger influence^{120,28}. The ease of reduction within a related series of diamine-Pt complexes was found to increase in the order OH < OAc < Cl.

It is thought that the development of Pt^{IV} complexes with very negative reduction potentials could improve the change of these drugs, arriving intact at their cellular targets.

On the other hand, it has been seen that there is a clear correlation between reduction potential and the pharmacology of the three Pt^{IV} complexes to reach clinical trials (Figure 1.34) confirming that it is possible to tune these properties.

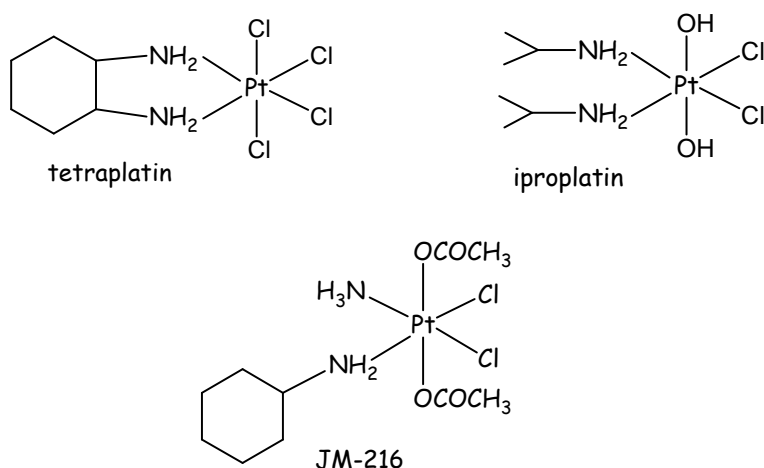


Figure 1.34 Structural formulas of the Pt^{IV} complexes to enter clinical trials

However, studies related to Pt^{IV} cytotoxicity¹²¹ establish that the activity of the Pt^{IV} complex depends more on the activity of the Pt^{II} analogue yielded.

In order to assess the effect of the amine ligands on the reduction to Pt^{IV} *trans*-[PtCl₂(OH)₂(amine)(amine')] complexes and analyze the effect on the cytotoxicity activity observed in the cancer cell lines (section 1.3.1.3.3) we have performed electrochemical studies with the *trans*-Pt^{IV} complexes *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] **1-IV**, *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] **2-IV** and *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)] **3-IV**.

¹²⁰ Hambley, T. W.; Battle, A. R.; Deacon, G. B.; Lawrenz, E. T.; Fallon, G. D.; Gatehouse, B. M.; Webster, L. K.; Rainone, S. J. *Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 3

¹²¹ Rotondo, E.; Fimiani, V.; Cavallaro, T.; Ainis, T. *Tumori.* **1983**, *69*, 31

1.3.4.2 Experimental

1.3.4.2.1 Sample preparations

Photochemistry

The concentration of the stock sample used for the experiments performed were prepared using platinum complexes solution 2.5 mM.

The pH of the final solution in each experiment was adjusted in the range of 6.7-6.3. All pH measurements were performed at 298 K and calibration performed with standard buffer solution at pH 4.00 and 7.00.

The instrument used for the pH measurements was Martini Mi150 pH meter, from Progen Scientific Ltd, equipped with a chloride-free semi-micro combination electrode (Thermo FisherScientific) calibrated with standard buffers (pH 4, 7 and 10, Aldrich).

Electrochemistry

Solutions of each complex were made up to 5 mM in 100 mM NaClO₄ as the supporting electrolyte. The solutions were degassed prior to measurements using argon gas for at least 10 minutes, which had previously been passed through an oxygen trap.

The instrument used for the pH measurements was pHmeter HI991002 (Hanna instruments) calibrated with standard buffers pH 6.9 y 4.0.

1.3.4.2.2 Techniques

Nuclear Magnetic Resonance

(see section 1.3.3.2)

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

(see section 1.3.3.2)

1.3.4.2.3 Irradiation

The light source was a Luzchem LZC-ICH2 photoreactor oven using both Luzchem LZC-UVA (Hitachi) and LZC-VIS (Sylvania cool white) lamps, with no other sources of light filtration. The power levels were monitored using the

appropriate probe window, calibrated against an OAI-306 UV power meter from Optical Associates, Inc. The photoreactor operates at 365 nm with temperature controller at 310 K and the power level obtained was 1.9 mW/cm².*

1.3.4.2.4 Cyclic voltammetry

Electrochemical measurements were carried out using a BAS 100B/W Electrochemical Analyzer system and using a glassy carbon working electrode (0.07 cm²), an Ag/AgCl reference electrode, and a platinum auxiliary electrode. This last was polished prior to use with alumina paste and rinsed thoroughly with purified water.

* 5 Jcm⁻² (1.77 mW/cm²) of UVA correspond to approximately 30-60 min of midday sun (Scotland) ref 113

1.3.4.3 Results and discussion

1.3.4.3.1 Photochemistry

The photoinduction studies with the $trans$ -Pt^{IV} complex $trans$ -[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)] (**3-IV**).

The studies of complex **3-IV**, has been performed following the same procedure described on the Pt^{II} complexes, using ¹H and ¹⁹⁵Pt NMR, MS and LC-MS techniques. Two identical samples containing complex **3-IV**, in aqueous solution at pH~6 were prepared irradiating, sample **I** and keeping in the dark, sample **D**.

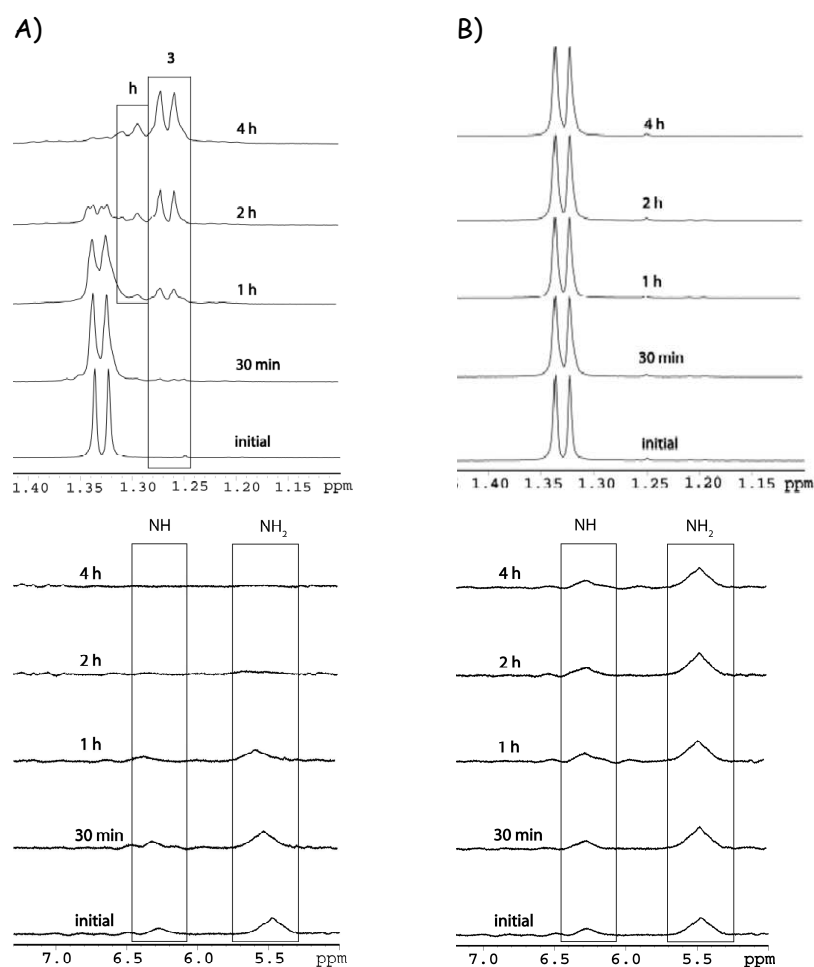


Figure 1.35 Time dependence of ¹H NMR spectra of complex **3-IV** in aqueous solution: A) irradiated and B) in the dark, showing changes in the region of CH₃-isopropylamine (above) and NH₂ and NH groups (below)

The influence of the UVA light can be detected in complex **3-IV** spectra in the sample **I** just after 1 h by 1D ¹H NMR spectroscopy (Figure 1.35). The spectra of sample **D** show only the peaks corresponding to Pt^{IV} complex which indicates that complex **3-IV** was stable in the dark. However, the transformation is detected in the ¹H NMR spectra of the sample **I**, where some peaks are clearly arising in the methyl groups region corresponding to the trans-Pt^{II} counterpart: *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] complex (named **3** in Figure 1.35A). In the same spectra, peaks for Pt^{IV}-NH and Pt^{IV}-NH₂ groups (6.28 and 5.47 ppm, respectively) disappeared, and a new peak is clearly visible in the region where Pt^{II}-NH₂ signals were expected (bs 4.04 ppm) which supports the evidence of photoreduction for complex **3-IV**. Several new peaks were also observed in the ¹H NMR spectra of the sample **I**, which could be assigned to photosubstitution products formed during the photoactivation (Figure 1.35 signal **h**).

In order to confirm the assignments of the mentioned transformation, the samples were analyzed by LC-MS. In the absence of irradiation **D**, no changes were detected (Figure 1.36B above). However, when the experiment was accompanied by irradiation, the chromatograms contains two new peaks (peaks **b** and **c**, Figure 1.36A above) eluted at 29.37 and 30.34 min. In addition, peak **a** seems to be the same species in both samples **I** and **D** (Figure 1.36 above).

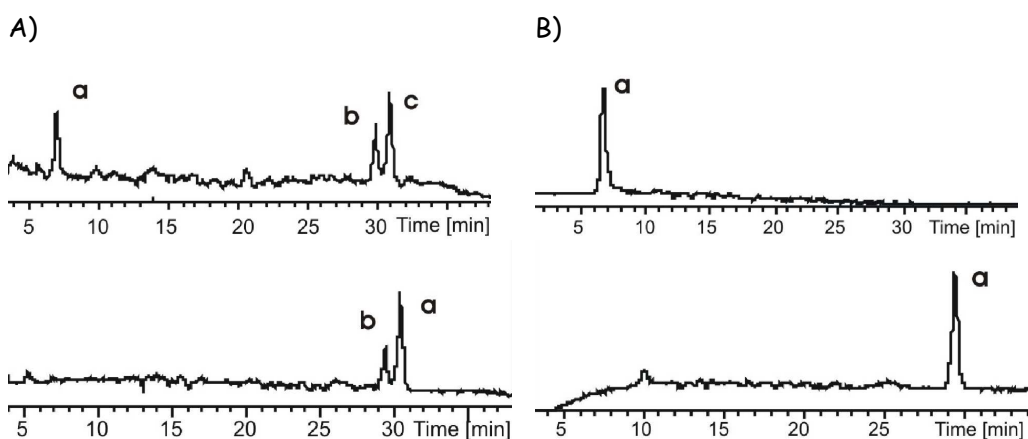


Figure 1.36 HPLC chromatograms of the aqueous solution of complex **3-IV** (above) and **3** (below) after 4 hours A) irradiated and B) in the dark

The ionization of peak **a** in the ESI-MS spectra from the **I** and **D** samples was slightly different, the abundance of the fragments and/or associations and

molecular ions vary, but in general we could always detect the species at 427.02 m/z $[M+Na^+]$ corresponding to *trans*- $[PtCl_2(OH)_2(dma)(ipa)]$.[‡] (Figure A1-11 appendix). The ESI-MS spectra obtained from peaks **b** and **c** are identical (Figure A1-12 appendix) and showed a molecular ion at 376.05 m/z $[M^+-H^++Na^+]$ assignable to $[PtClH_2O(dma)(ipa)]^+$ and fragmentation species at 297.02 m/z. Those species seemed to be the result of *trans*- $[PtCl_2(dma)(ipa)]$ complex presence and its aqua species.

In order to demonstrate this assumption, the photochemical studies by LC-MS technique were carried out similarly with the *trans*-Pt^{II} counterpart complex: *trans*- $[PtCl_2(dma)(ipa)]$. These experiments provide the retention time for the Pt^{II} species under the same HPLC conditions and also their major molecular ions in the ESI-MS spectra. The HPLC chromatograms for the solution of *trans*- $[PtCl_2(dma)(ipa)]$ (**3**) complex, in absence (**D**) or presence of light (**I**), are shown in Figure 1.36 (below), and the peaks detected (peaks **a** and **b**) correspond with the expected species: $[PtClH_2O(dma)(ipa)]^+$ at 376.05 m/z $[M^+-H^++Na^+]$ and the fragmentation specie at 297.02 m/z (Figure A1-13). These results clearly suggest that the Pt^{II} complex undergoes photoaquation in presence of light. On the basis of the results obtained with the chromatograms recorded for *trans*- $[PtCl_2(dma)(ipa)]$ and *trans*- $[PtCl_2(OH)_2(dma)(ipa)]$ complexes (Figure 1.36), peaks **b** and **c** (29.37 and 30.34 min) can be identified as Pt^{II} species.

Moreover ¹⁹⁵Pt NMR chemical shifts are usually dependent on the oxidation state of the metal, being a good diagnosis tool of Pt^{II} complexes presence, as are generally more shielded than the Pt^{IV} compounds.^{122,123} The ¹⁹⁵Pt NMR of the irradiated sample has been performed before and after the irradiation. The Pt^{IV} complex, **3-IV** is the only specie present in solution before the irradiation (798 ppm), and after irradiation a signal at -2188 ppm is newly detected in the spectra and corresponds to its Pt^{II} counterpart: of *trans*- $[PtCl_2(dma)(ipa)]$ complex.

The comparison of the LC-MS and ¹⁹⁵Pt NMR results obtained for Pt^{IV} and its partner Pt^{II} complex proves that the Pt^{IV} complex undergoes reduction under UVA light, which are consistent with the previous results obtained by ¹H NMR. The reduction mechanism of complex **3-IV** in solution seems to be trigger or at least promote by irradiation.

[‡] An additional peak is also detected as molecular ion in these spectra, corresponding probably to fragmentation and association of the Pt^{IV} complex present in solution

¹²² Priqueler, J. R. L.; Butler, I. S.; Rochon, F. D. *Applied Spectroscopy Reviews*. **2006**, *41*, 185

¹²³ Still, B. M.; Kumar, P. G. A.; Aldrich-Wright, R.; Price, W. S. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 665

1.3.4.3.2 Electrochemistry

The reduction potentials have been examined for *trans*-Pt^{IV} complexes *trans*-[PtCl₂(OH)₂(amine)(amine')] **1-IV**, **2-IV** and **3-IV**. The electrochemical study of Pt^{IV} analogue of cisplatin has been also included to control.

Generally, cyclic voltammetry (CV) is used for measuring the reduction potential (E_p) of Pt^{IV} complexes. The reduction of Pt^{IV} is an irreversible two electron process involving the loss of axial ligands and a return to square-planar geometry of Pt^{II}. The reported E_p values are cathodic half-wave potentials and are measured at the peak of the forward wave.

As an example the CV obtained for *cis*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)₂] and *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] **1-IV** complexes are shown in Figure 1.37. The reduction potentials of all Pt^{IV} complexes are given in Table 1.18. The E_p of **2-IV** differs by ~100 mV in comparison with those of **1-IV** and **3-IV**.

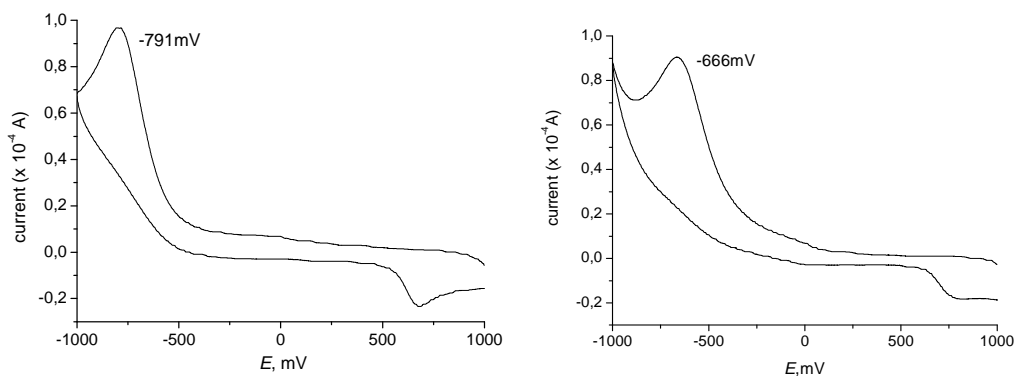


Figure 1.37 Cyclic Voltammograms for *cis*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)₂] and *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] at a scan rate of 100 mVs⁻¹

The variation observed in the reduction potential values for these complexes can be based on the inductive effect of the ligands bound to the platinum atom. The comparison attending to this electronic effect has been done, first in complexes that at least showed one ligand in common.

- i) when methylamine is the common ligand, the reduction potential of complex **2-IV** should be more negative than **1-IV**, as isopropyl- group is a weaker electron-donating group (+I) compared to dimethyl- group in the amine ligand. So, the lower the inductive effect of the group in the complex, the easier the complex to reduce and the less negative the potential value. This is nicely in agreement with the values showed in Table 1.18.

ii) when isopropylamine is the common ligand, **3-IV** shows the lower potential as expected, because dimethyl- is a stronger electron donating group compared with methyl- group in the amine ligand (Table 1.18).

iii) but when dimethylamine is the common ligand, the inductive effect does not show the expected influence in the reduction potential.

Looking closely to these data, as second step, we have noticed how complex **2-IV** showed the most negative reduction potential from the group, and also differs in the substituent groups of the amine ligand which are not as bulky as the isopropyl amine. We have studied deeply this complex and its Pt^{II} counterpart through this project and noticed how complexes **2/2-IV** showed higher cytotoxic values and complex **2** shows also the fastest hydrolyzation rate. So, those differences made us to believe that the behaviour in these complexes must be related also with some kind of stereoelectronic effect that makes these complexes, in some aspects, vary in their reactivity.

Table 1.18 Reduction Potential

Complex	Ep (mV)
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (NH ₃) ₂] ^a	-791
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (ipa)(ma)] (1-IV)	-666
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (dma)(ma)] (2-IV)	-770
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (dma)(ipa)] (3-IV)	-680

^a Comparable value with that published ref ⁸³

Capítulo 2. Introducción general, objetivos y planteamiento

2.1 Introducción General

Cáncer

La palabra cáncer deriva de la palabra griega Karkinos o cangrejo. Hipócrates, conocido hoy en día como el padre de la medicina, fue el primero en usar las palabras "carcinosis" y "carcinoma" para describir los tumores, y así nació el uso del término cáncer para referirse a esta enfermedad.

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, en los que una de cada cuatro personas fallece debido a esta enfermedad. En España, casi 100.000 personas mueren cada año como consecuencia del cáncer.

Un cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células denominado tumor o neoplasia, y la posterior adquisición de estas células de una capacidad invasora que les permite escapar de su sitio natural en el organismo, colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos.

La proliferación excesiva de las células cancerígenas es el resultado de la pérdida del control de un proceso básico celular, como es la capacidad de duplicar su contenido en ADN y otros muchos componentes. Si tanto el funcionamiento como la morfología de la célula son el resultado de la expresión de un conjunto de genes, el cáncer debe originarse como consecuencia de la alteración o mutación inicial de algún gen.

Aunque no se conocen todas las razones, muchas de las causas del cáncer ya han sido identificadas. Además de los factores intrínsecos, tales como la herencia, dieta y hormonas, los estudios científicos señalan la existencia de factores extrínsecos clave, que contribuyen al desarrollo del cáncer, como son: sustancias químicas, radiación, y virus o bacterias.

A pesar de los avances que se han realizado en la investigación y los múltiples intentos de mejorar los tratamientos, la realidad es que aún no disponemos de terapias totalmente eficaces contra el cáncer. Los principales tratamientos se pueden dividir en cuatro grupos: cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia.

Del conjunto de fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer cada uno funciona con un mecanismo diferente, de manera que unos son capaces de atacar a las células malignas dañando su ADN (aunque también a las células normales), mientras que otros desencadenan una reacción del sistema inmune para que éste sea capaz de reconocerlos como elementos extraños y ordene su ejecución.

Introducción general, objetivos y planteamiento

La dificultad fundamental frente al cáncer, común a todas las terapias, es la necesidad de eliminar todas las células cancerosas, ya que si una única célula maligna sobrevive al tratamiento, puede dar lugar a un nuevo tumor como resultado de su capacidad de proliferación.

Bioinorgánica

La misma palabra "Bioinorgánica" parece encerrar una contradicción profunda, ya que el prefijo "bio" significa vida e "inorgánico" es todo lo no viviente. Sin embargo, sin la participación de elementos metálicos y algunos otros, que normalmente no están comprendidos dentro de la química orgánica, la vida no existiría, cuando menos en su forma actual.

Recientemente se ha tomado conciencia de que muchos elementos inorgánicos, presentes generalmente como trazas, son absolutamente esenciales para todos los seres vivos. De los 30 elementos que se reconocen hoy en día como esenciales para la vida, diecisiete son metales y cuatro más metaloides (B, Si, P, Se). Una de las principales funciones llevadas a cabo por elementos metálicos en bioquímica es la de metaloenzimas.



Figura 2.1 Tabla periódica de medicinas^x

^x Imagen obtenida del Prof. Peter Sadler

Es conocido el hecho de que muchos metales y sus compuestos tienen determinadas propiedades que los hacen útiles como fármacos para el tratamiento de diversos desórdenes y enfermedades,^{1,2} como bien lo demuestra el uso en medicina de una gran variedad de compuestos inorgánicos desde la antigüedad (Figura 2.1).

Fármacos en el tratamiento del cáncer

El uso de agentes químicos citotóxicos, que destruyen las células cancerosas, ha constituido la gran esperanza en el tratamiento del cáncer desde hace varias décadas.

Los agentes empleados en las terapias oncológicas pueden dividirse en varias categorías, dependiendo de cómo funcionan y cómo afectan a las células malignas (agentes alquilantes,* antimetabolitos,† antibióticos antitumorales,‡ inhibidores mitóticos,§ etc...). Conociendo en qué momento del ciclo celular actúan y qué actividad concreta bloquean para frenar la enfermedad, se podría decidir qué fármaco actuaría mejor sobre cada tipo de tumor, si deben combinarse varios de ellos para lograr una mayor eficacia, si se pueden emplear conjuntamente con algún otro tipo de medicamento, e incluso cuándo debe administrarse para lograr el efecto deseado.

Descubrimiento del cisplatino

Como en muchos otros casos en la historia de la Ciencia, el descubrimiento de la actividad antitumoral de los complejos de platino fue fortuito.

El cisplatino se sintetizó por primera vez en 1845,³ pero sus propiedades anticancerígenas no fueron descubiertas hasta la mitad de los años sesenta (1965) cuando Barnett Rosenberg^{4,5} observó la inhibición de la división celular en

¹ Guo, Z. J.; Sadler, P. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1513

² Reedijk, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 236

* Agentes alquilantes: actúan directamente sobre el ADN (cisplatino, clorambucil,...)

† Antimetabolitos: se combinan con el ADN celular para modificar la estructura de las células y detienen su reproducción (5-fluoracilo, metoxato,...)

‡ Antibióticos antitumorales: alteran la membrana que rodea a las células y bloquean el proceso de reproducción (doxorubicina, mitoxantrona,...)

§ Inhibidores mitóticos: son capaces de frenar el proceso de reproducción celular, así como la acción de las enzimas responsables de éste (paclitaxel, docetaxel,...)

³ Peyrone, M. *Ann. Chem. Pharm.* **1845**, *51*, 1

⁴ Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Krigas, T. *Nature.* **1965**, *205*, 698

⁵ Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. *Nature.* **1969**, *222*, 385

bacterias *E. coli*, mientras investigaba la influencia de un campo eléctrico en su crecimiento. Este hecho se debía a la presencia, en el medio, de los compuestos *cis* de platino: $[Pt^{II}Cl_2(NH_3)_2]$ y $[Pt^{IV}Cl_4(NH_3)_2]$ generados por la solvatación de los electrodos de platino en cloruro de amonio. En 1971, el cisplatino fue sometido a la primera prueba clínica, y desde 1978 figura en el listado de la FDA.

La eficacia del cisplatino modificó el pronóstico de los pacientes que padecían algunos cánceres, como los de testículo u ovario. Sin embargo, las principales limitaciones del cisplatino, como son sus severos efectos tóxicos secundarios (nefrototoxicidad,[‡] emético, y ototoxicidad[®]), y su relativa pobre actividad frente a alguno de los tipos de tumores más comunes, impulsó la investigación de nuevos complejos de platino.

Complejos de platino con actividad antitumoral

El conocimiento de los efectos secundarios del cisplatino, y su limitada eficacia por la aparición de los mecanismos de resistencia, llevó a la búsqueda de análogos que carecieran de estas limitaciones y mantuvieran la actividad antitumoral.

Los numerosos ensayos realizados con una amplia variedad de complejos de platino con geometría *cis* (Figura 2.2) permitieron establecer una serie de generalizaciones acerca del mecanismo de acción de los mismos, y de la relación entre su estructura y actividad (SAR's):

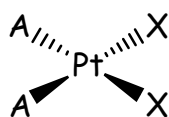


Figura 2.2 Estructura general de un complejo *cis*- Pt^{II} , donde X = ligando saliente y A = ligando no saliente

- i) Los complejos plano cuadrado de Pt^{II} de geometría *cis* poseían actividad citotóxica, mientras que los *trans* eran inactivos.
- ii) Los complejos de platino debían poseer en posición *cis* un par de ligandos no salientes en forma de dos grupos monodentados o uno bidentado.

[‡] Nefrototoxicidad: afectación renal por tóxicos, que se caracteriza por alteraciones funcionales o estructurales

[®] Ototoxicidad: perturbaciones transitorias o definitivas de la función auditiva por sustancias de uso terapéutico

iii) Los ligandos amina, grupos no salientes, debían poseer al menos una unión N-H, cuya presencia aparentemente facilitaba el establecimiento de enlaces de hidrógeno durante la acción del fármaco.

iv) Los ligandos aniónicos "X" (halogenuros, carboxilatos,...) debían ser intercambiables en la escala de tiempos terapéutico-fisiológicos. Complejos con ligandos salientes (X) muy lábiles resultaban tóxicos, mientras que aquellos con uniones Pt-X muy inertes resultaban inactivos.

v) Los complejos activos eran básicamente neutros, lo que les permitía atravesar más fácilmente las membranas celulares que si tuvieran carga.

Sin embargo, después de 35 años de investigación y de haberse sintetizado más de 3000 compuestos de platino, sólo 30 compuestos han llegado a ensayos clínicos, y más de la mitad han sido ya rechazados. Parece razonable, por tanto, decir que el descubrimiento casual del cisplatino dio el mejor derivado en el primer intento, ya que ninguno de los compuestos utilizados en clínica le superan.

En la actualidad tres compuestos de platino (Figura 2.3) están presentes en clínica y son utilizados mundialmente: el cisplatino (1978), carboplatino (1989) y el oxaliplatino (2002).⁶

Por lo tanto, la idea de encontrar un derivado similar, estructuralmente hablando, al cisplatino y con una mayor eficacia terapéutica casi se ha desvanecido. Consecuentemente, se han abierto nuevas rutas de síntesis en la investigación de fármacos de platino. Una de ellas es la síntesis de complejos "no clásicos" que rompen algunas de las reglas estructura-actividad establecidas y otra, la síntesis de complejos de platino con ligandos con una función específica para aumentar su selectividad.^{7,8}

Así, se han descubierto complejos, como el *cis*-[PtCl₂(NH₃)(2-metilpiridina)], impedido estéricamente (Figura 2.4, picoplatino), presentan actividad antitumoral, aunque no cumple las reglas estructura actividad mencionadas. Hasta la fecha, los resultados obtenidos para este complejo en fase clínica II son muy prometedores.⁹

⁶ Kelland, L. *Nature Rev.* **2007**, *7*, 573

⁷ Barnes, K. R.; Kutikov, A.; Lippard, S. J. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 557

⁸ Ang, W. H.; Khalaila, I.; Allardyce, C. S.; Juillerat-Jeanerret, L.; Dyson, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1382

⁹ Gore, M. E.; Atkinson, R. J.; Thomas, H.; Cure, H.; Rischin, D.; Beale, P.; Bougnoux, P.; Dirix, L.; Smit, W. M. *Eur. J. Cancer.* **2002**, *38*, 2416

Introducción general, objetivos y planteamiento

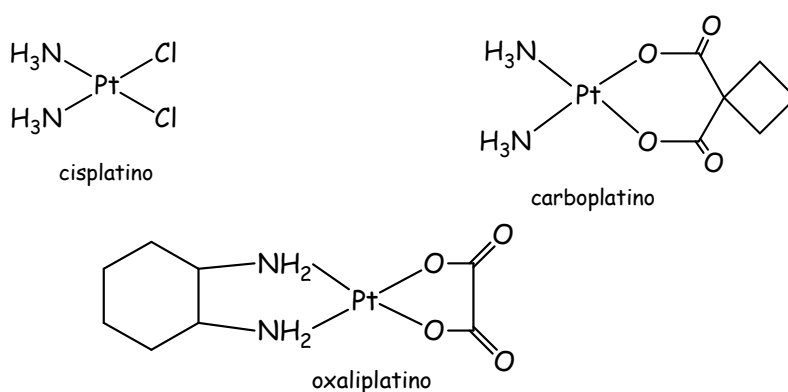


Figura 2.3 Estructura de los fármacos de platino utilizados mundialmente en clínica: cisplatino, carboplatino y oxaliplatino

Las investigaciones se enfocaron también a conseguir fórmulas orales de compuestos de platino, que permitieran una mayor flexibilidad en las dosis administradas para aumentar el potencial del uso de estos fármacos. Esto condujo al estudio de una nueva clase de complejos de platino en estado de oxidación IV que pudieran ser administrados oralmente por su mayor solubilidad.

Así, surgió el complejo bis(acetato)aminodicloro(ciclohexilamina)platino(IV), conocido como satraplatino o JM-216 (Figura 2.4), considerado el primer fármaco de platino administrado por vía oral en entrar en ensayos clínicos.

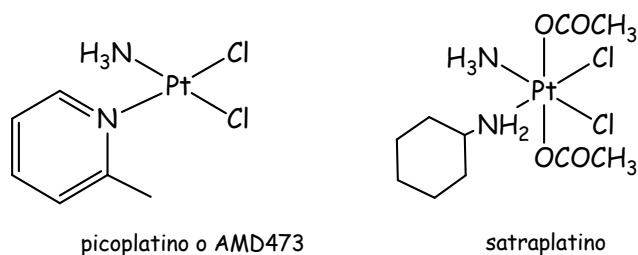


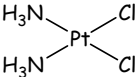
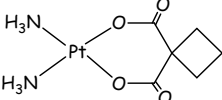
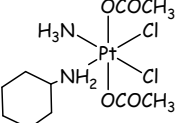
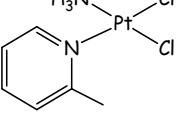
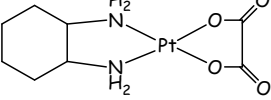
Figura 2.4. Estructura de compuestos de platino en triadas clínicas

A continuación se muestra la cronología de hechos relevantes en el descubrimiento, desarrollo y aplicación de los fármacos de platino utilizados en el tratamiento contra el cáncer (Tabla 2.1).^{ψ,≡}

^ψ Tabla obtenida y adaptado de ref 6

[≡] El nedaplatino, utilizado exclusiva y limitadamente en Japón, no ha sido incluido en esta Tabla

Tabla 2.1 Cronología del descubrimiento, estudio y utilización de fármacos de platino

	1965	<ul style="list-style-type: none"> ▶ descubrimiento de las propiedades biológicas del cisplatino en bacterias
	1968	<ul style="list-style-type: none"> ▶ el cisplatino se muestra activo frente a cánceres implantados en ratones
	1971	<ul style="list-style-type: none"> ▶ se trata por primera vez a un paciente con cisplatino
	1978	<ul style="list-style-type: none"> ▶ aprobación de la utilización del cisplatino (cáncer de testículo y vejiga)
	1982	<ul style="list-style-type: none"> ▶ por primera vez se trata a un paciente con carboplatino
	1985	<ul style="list-style-type: none"> ▶ se describen los diversos aductos formados por el cisplatino con el ADN
	1989	<ul style="list-style-type: none"> ▶ aprobación de la utilización del carboplatino (cáncer ovario)
	1991	<ul style="list-style-type: none"> ▶ se describe el papel que juega el glutatión en la resistencia contra el cisplatino
	1992	<ul style="list-style-type: none"> ▶ correlación de la reparación por escisión de nucleótidos (mecanismo NER) con la baja respuesta a la quimioterapia de los fármacos de platino en pacientes con cáncer de ovario
	1993	<ul style="list-style-type: none"> ▶ se realiza por primera vez el tratamiento de un paciente con un fármaco oral de platino, satraplatino (JM-216)
	1997	<ul style="list-style-type: none"> ▶ el picoplatino (AMD473) se utiliza por primera vez en pacientes
	1999	<ul style="list-style-type: none"> ▶ identificación de los defectos moleculares en el mecanismo NER causante de la hipersensibilidad de algunos cánceres de testículo al cisplatino
	2002	<ul style="list-style-type: none"> ▶ aprobación por la FDA de la utilización del oxaliplatino, principalmente para el tratamiento del cáncer colorrectal. Identificación del papel de la proteína transportadora de cobre CTR1 en el transporte del cisplatino al interior de las células
	2006	<ul style="list-style-type: none"> ▶ aprobación de la utilización de bevacizumab en el tratamiento del cáncer de pulmón de célula no pequeña en combinación con el carboplatino y paclitaxel
	2007	<ul style="list-style-type: none"> ▶ la FDA consideró la aprobación del uso de satraplatino para el tratamiento del cáncer de próstata

Mecanismo de acción del cisplatino y dianas biológicas

El mecanismo de acción del cisplatino comienza con su entrada en la célula atravesando la membrana, y alcanzando el núcleo celular donde interacciona con el ADN.¹⁰

Aunque el mecanismo de entrada y salida del cisplatino en la célula aun no está totalmente dilucidado, se piensa que la entrada se produce generalmente por difusión pasiva; no obstante, se han descrito también evidencias de una posible relación entre algunos transportadores o canales, como la proteína transportadora de cobre CTR1 y la concentración intracelular de platino,¹¹ e incluso más recientemente se ha publicado que la unión de estos complejos de platino a la proteína CTR1 podría ser una etapa fundamental en su mecanismo de acción.¹²

Actualmente, Messori y *col.* trabajan en el estudio de interacción de complejos de platino (ej: carboplatino, cisplatino y también otros complejos *trans*-Pt) con proteínas como el citocromo c, analizando los tipos de unión que producen y el papel que desarrollan en el mecanismo de estos fármacos.^{13,14}

Una vez el cisplatino ha entrado en la célula, la baja concentración de cloruros en el citoplasma (3 mM), en contraste con su concentración en sangre (100 mM), permite la acuación del complejo, produciéndose la sustitución de los ligandos salientes, Cl⁻, por ligandos H₂O.¹⁵ La formación de estas acuoespecies cargadas positivamente activa el complejo, que interacciona con moléculas intracelulares y con el ADN generando los distintos aductos.

El cisplatino se une al ADN preferente por el N7 de la guanina generando la formación de aductos monofuncionales, que posteriormente evolucionan en una segunda etapa a aductos bifuncionales. Dicha preferencia se debe a que los otros sitios de coordinación son menos accesibles. Los diferentes tipos de aductos que se han encontrado y estudiado para el cisplatino son: aductos 1,2-intracatenarios d(GpG), aductos 1,2-intracatenarios d(ApG), aductos 1,3-intracatenarios (GpXpG), monoaductos con una única guanina, aductos intercatenarios y aductos proteína-ADN (Figura 2.5).⁶

¹⁰ Reedijk, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 3611

¹¹ Wang, D.; Lippard, S. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 307

¹² Arnesano, F.; Scintilla, S.; Natile, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9062

¹³ Casini, A.; Gabbiani, C.; Mastrobuoni, G.; Messori, L.; Moneti, G.; Pieraccini, G. *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 413

¹⁴ Gabbiani, C.; Casini, A.; Mastrobuoni, G.; Kirshenbaum, N.; Moshel, O.; Pieraccini, G.; Moneti, G.; Messori, L.; Gibson, D. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 755

¹⁵ Davies, M. S.; Berners-Price, S. J.; Hambley, T. W. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *79*, 167

La formación de aductos y la distorsión estructural del ADN al enlazarse el cisplatino interfieren en su transcripción y mecanismo de replicación. La alteración de estos procesos podría ser la responsable de los efectos citotóxicos del cisplatino, por lo que han sido numerosos los estudios enfocados en esta área de investigación.¹⁶

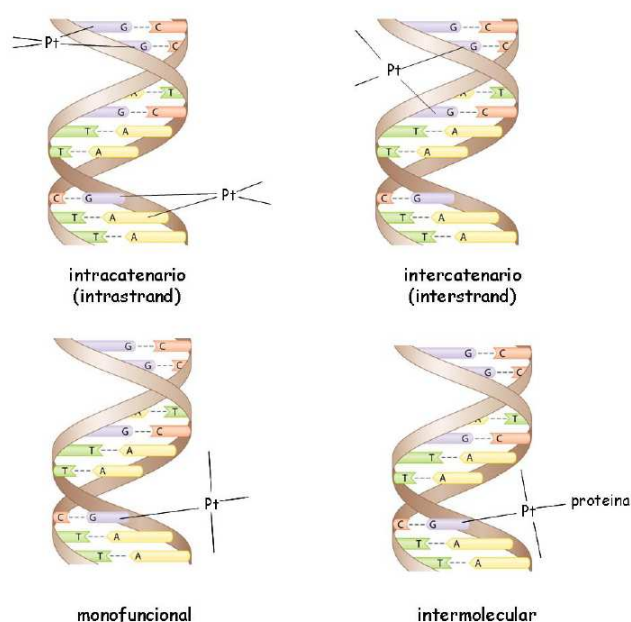


Figura 2.5 Aductos mayoritarios formados por el cisplatino con el ADN

Resistencia

Algunos tipos de cáncer son intrínsecamente insensibles al tratamiento con fármacos de platino (resistencia intrínseca), mientras que otros cánceres desarrollan resistencia durante la quimioterapia (resistencia adquirida). Los mecanismos de resistencia se pueden dividir en dos grupos fundamentales: los que evitan que el fármaco alcance su diana biológica y los que actúan después de la formación de los aductos (Figura 2.6), aunque normalmente actúan simultáneamente diversos mecanismos de resistencia; es decir, la resistencia es un mecanismo multifactorial.¹⁷

¹⁶ Jamieson E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467

¹⁷ Brabec, V.; Kasparkova, J. *Drug Resist. Updates.* **2002**, *5*, 147

El mecanismo de resistencia a la entrada de los fármacos de platino en la célula no se conoce con detalle, pero se le relaciona con algunos cambios en el proceso de difusión pasiva y la presencia de algunos transportadores como CTR1 o canales iónicos en la membrana.¹¹ Además, las células tumorales pueden desarrollar un mecanismo de resistencia común a muchos fármacos, incentivando la expulsión del fármaco al exterior celular mediante diferentes proteínas de la membrana plasmática. Este fenómeno es denominado MDR (multidrug resistance).^{18,19} Diversos estudios han demostrado como la disminución en la acumulación de platino es uno de los mecanismos de resistencia más comunes.²⁰

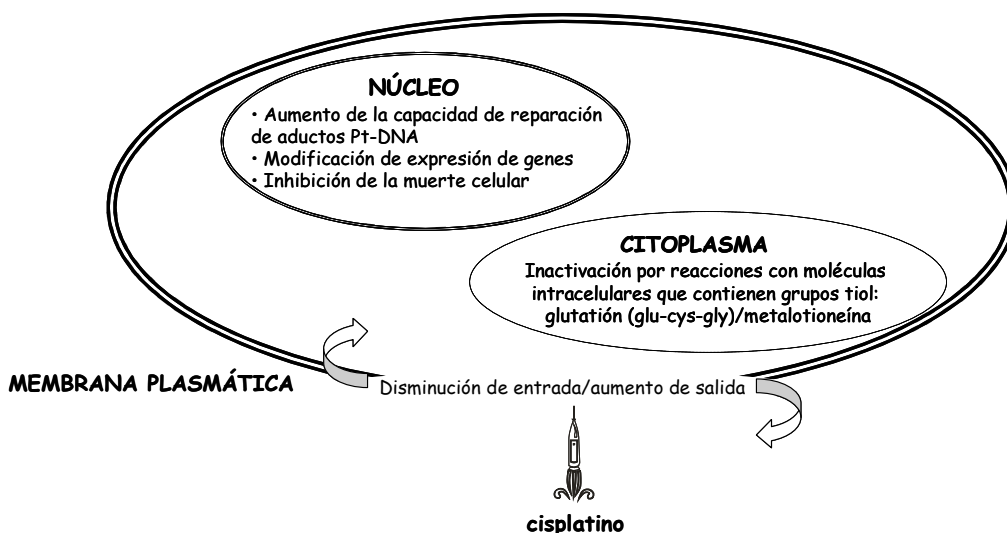


Figura 2.6 Mecanismos de resistencia asociados a los fármacos de platino

El mecanismo de resistencia producido por las reacciones con otras biomoléculas distintas al ADN está considerado como uno de los principales factores de resistencia asociado al cisplatino, debido a la alta afinidad que poseen los complejos de platino por moléculas con grupos tiol, tales como glutatión o metalotioneína.^{21,22}

¹⁸ Siddik, Z. H. *Oncogene*. **2003**, *22*, 7265

¹⁹ Kool, M.; de Haas, M.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; van Eijk, M. J. T.; Juijn, J. A.; Baas, F.; Borst, P. *Cancer Res*. **1997**, *57*, 3537

²⁰ Akiyama, S.; Chen, Z. S.; Sumizawa, T.; Furukawa, T. *Anticancer Drug Des*. **1999**, *14*, 143

²¹ Calvert, P.; Yao, K. S.; Hamilton, T. C.; O'Dwyer, P. J. *Chem. Biol. Interact*. **1998**, *111-112*, 213

²² Chen, G.; Hutter, K. J.; Zeller, W. J. *Cell Biol. Toxicol*. **1995**, *11*, 273

Por lo tanto, cuando un complejo de platino entra en las células tumorales, debe alcanzar el núcleo y reaccionar con el ADN, pero incluso si el complejo de platino logra alcanzar el ADN, existen mecanismos de resistencia que actúan tras la formación de los aductos Pt-ADN como son: reparación del ADN, modificación de expresión de genes e inhibición de la muerte celular. Estos mecanismos o bien reconocen la distorsión inducida en la doble hélice reparándola o bien interfieren en la señalización del daño inhibiendo la activación de la apoptosis.^{Ø,18}

Complejos no convencionales

El hecho de que el isómero geométrico del cisplatino, el transplatino, mostrase una actividad antitumoral *in vitro* mucho menor que el cisplatino, y una inactividad *in vivo*, provocó que la investigación se centrara inicialmente en compuestos con geometría *cis* que cumplieren las reglas estructura-actividad previamente establecidas.

La inactividad del transplatino ha sido asociada, por un lado, a su alta reactividad química, que supondría su inactivación antes de alcanzar su diana terapéutica y, por otro, a su incapacidad para generar los aductos más importantes a que da lugar el cisplatino.¹⁶

Los análogos estructurales del cisplatino no han conseguido evitar los mecanismos de resistencia a este fármaco, debido a que producen esencialmente el mismo perfil de enlace al ADN; por lo tanto, no es sorprendente que la eficacia antitumoral de estos compuestos sea similar.

En la búsqueda de nuevos compuestos de platino con un perfil de enlace al ADN diferente al de los compuestos *cis*, se planteó el estudio de nuevos compuestos con estructuras no convencionales que interaccionaran con el ADN de distinta forma y que produjeran una mayor acumulación intracelular, relacionada con el paso a través de la membrana.

Uno de los ejemplos más sorprendentes fue el de los complejos con geometría *trans*,^{23,24} que invirtieron las reglas estructura-actividad mencionadas anteriormente.

Ø La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos

²³ Van Beusichem, M.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 634

²⁴ Coluccia, M.; Nassi, A.; Loseo, F.; Boccarelli, A.; Mariggio, M. A.; Giordano, D.; Intini, F. P.; Caputo, P.; Natile, G. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 510

Introducción general, objetivos y planteamiento

Los complejos *trans* de platino con actividad antitumoral, que han sido estudiados hasta la fecha, pueden englobarse en cuatro grupos (Figura 2.7). Con una fórmula general *trans*-[PtCl₂(L)(L')] se presentan tres de estos grupos, donde: i) L = L' piridina, *N*-metilimidazol o tiazol; L = quinolina y L' = NH₃ o RR'SO, R = metil y R' = metil fenil o bencil;^{25,23,26,27,28} ii) L = ligando imino y L' = NH₃ o ligando imino^{29,30,31,32,33} y iii) L = amina alifática y L' = amina alifática^{34,35,36,37,38}, estos complejos han sido desarrollados por el grupo dirigido por la Prof. Carmen Navarro-Ranninger que es la codirectora de esta Tesis. El último de los cuatro grupos corresponde a complejos de Pt^{IV} de fórmula general *trans*-[PtCl₂X₂(L)(L')] donde X = hidroxilo, carbamatos o carboxilatos, y L, L' = NH₃ o amina.^{39,40}

En general, se ha observado que la sustitución de los ligandos amoniacos en el transplatino por otros más voluminosos conduce a que los compuestos *trans* presenten actividad antitumoral.²⁵ Algunos de estos nuevos complejos *trans* son

²⁵ Farrell, N.; Ha, T. T. B.; Souchard, J. P.; Wimmer, F. L.; Cros, S.; Johnson, N. P. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2240

²⁶ Farrell, N.; Kelland, L. R.; Roberts, J. D.; Van Beusichem, M. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 5065

²⁷ Zou, Y.; Van Houten, B.; Farrell, N. *Biochemistry.* **1993**, *32*, 9632

²⁸ Farrell, N. in *Metal Ions in Biological Systems*, ed. Sigel, H., Marcel Dekker Inc., New York, **1996**, vol *32*, pp. 603-639

²⁹ Coluccia, M.; Nassi, A.; Loseto, F.; Boccarelli, A.; Mariggio, M. A.; Giordano, D.; Intini, F. P.; Caputo, P.; Natile, G. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 510

³⁰ Coluccia, M.; Boccarelli, A.; Mariggio, M. A.; Cardelicchio, N.; Caputo, P. A.; Intini, F. P.; Natile, G. *Chem. Biol. Interact.* **1995**, *98*, 251

³¹ Coluccia, M.; Mariggio, M. A.; Boccarelli, A.; Loseto, F.; Cardelicchio, N.; Caputo, P. A.; Intini, F. P.; Pacifico, C.; Natile, G. in *Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy*, ed. Pinedo H. M. and Schornagel J. H., Plenum Press, New York, **1996**, pp. 27-35

³² Intini, F. P.; Boccarelli, A.; Francia, V. C.; Pacifico, C.; Sivo, M. F.; Natile, G.; Giordano, D.; De Rinaldis, P.; Coluccia, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 768

³³ Boccarelli, A.; Intini, F. P.; Sasanelli, R.; Sivo, M. F.; Coluccia, M.; Natile, G. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 829

³⁴ Montero, E. I.; Díaz, S.; González-Vadillo, A. M.; Pérez, J. M.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4264

³⁵ Pérez, J. M.; Montero, E. I.; González-Vadillo, A. M.; Álvarez-Valdés, A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 37

³⁶ Pérez, J. M.; Montero, E. I.; González-Vadillo, A. M.; Solans, X.; Font-Bardia, M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2411

³⁷ Pérez, J. M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2000**, *35*, 109

³⁸ Montero, E. I.; Pérez, J. M.; Schwartz, A.; Fuertes, M. A.; Malinge, J. M.; Alonso, C.; Leng, M.; Navarro-Ranninger, C. *ChemBioChem.* **2002**, *3*, 61

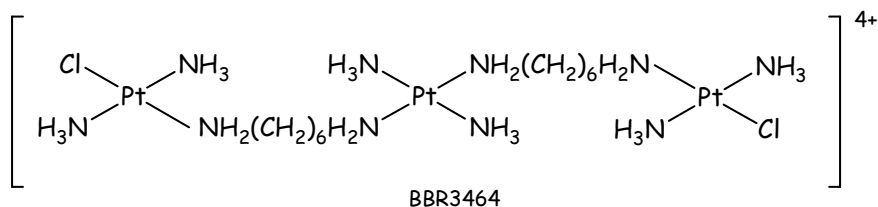
³⁹ Kelland, L. R.; Barnard, C. F. J.; Mellish, K. J.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Bryant, A.; Murrer, B. A.; Harrap, K. R.; *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5618

⁴⁰ Mellish, K. J.; Barnard, C. F. J.; Murrer, B. A.; Kelland, L. R. *Int. J. Cancer.* **1995**, *62*, 717

activos frente a células resistentes al cisplatino,^{26,34,36} e incluso se han encontrado complejos que además presentan actividad antitumoral *in vivo*.²⁴ Desde un punto de vista mecanístico, la presencia de ligandos más grandes podría retardar la sustitución de los ligandos salientes, reduciendo la inestabilidad cinética. Por otro lado, la unión de estos complejos al ADN podría modificar la estructura de la doble hélice de un modo diferente a como lo hacen el transplatino y cisplatino.

Los estudios del complejo *trans*-[PtCl₂{(E)-HN=C(OMe)Me}₂] (*trans*-EE) en su interacción con el ADN muestran que su unión genera preferentemente aductos monofuncionales con los residuos guanina, y que son cinéticamente estables.⁴¹ Por lo tanto, esto implica que los aductos formados por el cisplatino no son obligatoriamente determinantes para la actividad antitumoral de los complejos de platino, como tampoco lo es la geometría *cis*.

Otros ejemplos de complejos "no clásicos" encontrados en la bibliografía, son los complejos polinucleares,⁴² como por ejemplo el complejo BBR3464. Desafortunadamente, se ha detenido su estudio farmacológico en fase clínica II al no haber mostrado una actividad significativa.⁶



Existen otros muchos compuestos metálicos interesantes en la bibliografía, que desarrollan ideas novedosas, como por ejemplo el uso de ligandos fluorescentes que permiten monitorizar el fármaco a través de la célula,^{43,44} o el uso de complejos cuya actividad se basa en el reconocimiento no covalente del ADN,⁴⁵ y que ponen de manifiesto la necesidad de buscar nuevos fármacos y entender sus mecanismos.

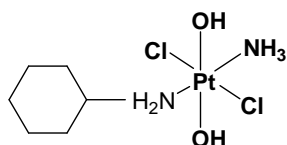
⁴¹ Brabec, V.; Vrana, O.; Novakova, O.; Kleinwachter, V.; Intini, F. P.; Coluccia, M.; Natile, G. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 336

⁴² Farrell, N. *Comments Inorg. Chem.* **1995**, *16*, 373

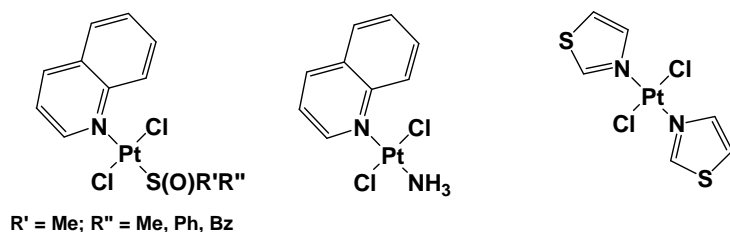
⁴³ Jansen, B. A. J.; Wielaard, P.; Kalayda, G. V.; Ferrari, M.; Molenaar, C.; Tanke, H. J.; Brouwer, J.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 403

⁴⁴ Kalayda, G. V.; Bart, B. A. J. A.; Molenaar, C.; Wielaard, P.; Hans J. T.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 414

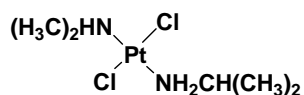
⁴⁵ Hannon, M. J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 280



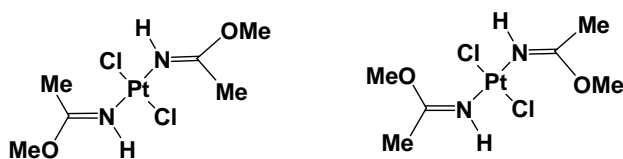
Kelland y *col.*, 1994



Farrell y *col.*, 1992



Navarro-Ranninger y *col.*, 1999



Natile y *col.*, 1993

Figura 2.7 Estructura de complejos *trans* de platino con actividad antitumoral

Diseño, desarrollo y potencial de complejos de Pt^{IV}

Como ya se mencionó anteriormente, adicionalmente a la búsqueda de complejos "no clásicos" de platino, se ha añadido la de los complejos de Pt^{IV} en los que se introducen, por ejemplo grupos OH⁻ en posición axial aumentando su solubilidad, lo que podría permitir la administración oral de estos fármacos.

Las características de los complejos de Pt^{IV}, como son su geometría octaédrica y su menor cinética, provocan una disminución de su reactividad y, con ello, la posibilidad de reacciones con otras biomoléculas distintas al ADN, que son las que impiden a los complejos alcanzar su diana terapéutica. Estos hechos permiten vencer alguno de los problemas asociados a los complejos de Pt^{II}. La variación de los ligandos axiales de los complejos de Pt^{IV} ofrece además la posibilidad de modificar sus parámetros farmacocinéticos, incluida su lipofilidad y velocidad de reducción, para disminuir sus efectos secundarios e incrementar su reactividad y selectividad en los tumores.

Recientemente, ha sido publicado por el grupo del Prof. Sadler un excelente ejemplo del potencial de los complejos de Pt^{IV} como futuros fármacos. Dicho grupo ha diseñado los complejos *trans*-dihidroxo de Pt^{IV}: *cis,trans,cis*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)₂] y *trans,trans,trans*-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)₂] que incorporan como novedad los ligandos azida.^{46,47} Este diseño permite que estos fármacos sean fotoactivados, debido a las propiedades fotoquímicas de las azidas.

A pesar de la patente ventaja y posibilidades que presentan los complejos de Pt^{IV} como posibles fármacos, sin embargo, hasta ahora ninguno de este tipo de complejos ha conseguido ser aprobado para su comercialización.

⁴⁶ Mackay, F. S.; Woods, J. A.; Moseley, H.; Ferguson, J.; Dawson, A.; Parsons, S.; Sadler, P. J. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3155

⁴⁷ Bednarski, P. J.; Grünert, R.; Zielzki, M.; Wellner, A.; Mackay, F. S.; Sadler, P. J. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 61

2.2 Objetivos y planteamiento

2.2.1 Objetivos y planteamiento

En el planteamiento de esta tesis se ha tenido en cuenta la necesidad de la búsqueda de nuevos compuestos de Pt^{II} y Pt^{IV} con estructuras no convencionales *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')] y *trans*-[PtCl₂(OH)₂(amina)(amina')], así como la de realizar estudios de hidrólisis de complejos *trans*-Pt^{II} no realizados previamente, con el fin de avanzar en el conocimiento de su mecanismo de acción.

Estudios de citotoxicidad realizados anteriormente para compuestos *trans*-Pt^{II} y Pt^{IV} nos llevaron en primer lugar a plantearnos la síntesis de los complejos *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] y *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)], por contener los ligandos dimetilamina y metilamina con menor impedimento estérico que el ligando isopropilamina presente en los compuestos sintetizados previamente, determinar la citotoxicidad en las líneas celulares tumorales SF268, MCF-7 y NCI-H460 utilizadas en el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de USA, y hacer una comparación de los resultados.

Dada la importancia que la etapa de hidrólisis tiene dentro de la secuencia de pasos que preceden a la unión de estos complejos a su diana terapéutica, nos propusimos el estudio detallado de la hidrólisis de los complejos *trans*-Pt^{II}, tanto para conocer las características cinéticas de su equilibrio, como las especies presentes en disolución.

La técnica de RMN 2D [¹H,¹⁵N] HSQC ha sido la herramienta fundamental con la que hemos realizado este estudio. Por este motivo, uno de los objetivos iniciales de esta Tesis fue la síntesis de los complejos marcados con ¹⁵N.

Una vez sintetizados los complejos *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-amina)(¹⁵N-amina')] se determinaron los valores de pK_a de las moléculas de agua coordinadas al platino en las acuoespecies generadas en la hidrólisis, y se obtuvieron las constantes de velocidad de acuación-anación mediante la utilización de la técnica de RMN 2D [¹H,¹⁵N] HSQC.^{48,49}

Se ha estudiado también la hidrólisis de los complejos *trans*-Pt^{II} por conductimetría, y comparado sus resultados con los del cisplatino, y con los obtenidos por RMN 2D [¹H,¹⁵N] HSQC.

⁴⁸ Berners-Price, S. J.; Frenkiel, T. A.; Frey, U.; Ranford, J. D.; Sadler, P. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 789

⁴⁹ Davies, M. S.; Cox, J. W.; Berners-Price, S. J.; Barklage, W.; Qu, Y.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 1710

Por otra parte, la modificación del comportamiento antitumoral del transplatino observada tras su fotoactivación⁵⁰ nos impulsó a investigar el comportamiento fotoquímico de los complejos *trans*-Pt^{II} que forman parte de esta Tesis doctoral. Se ha realizado un estudio detallado de la fotoactivación del complejo *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(metilamina)] analizando su comportamiento en disolución acuosa, y su fotorreactividad en reacciones frente a biomoléculas de relevancia biológica, como las purinas guanosina-5'-monofosfato y adenosina -5'-monofosfato, y la pirimidina citidina-5'-monofosfato.

Hasta la fecha los estudios de actividad antitumoral *in vitro* de los complejos de Pt^{IV} de fórmula *trans*-[PtCl₂(OH)₂(amina)(amina')] no han mostrado una tendencia clara para establecer, de forma general, si son más o menos activos que sus análogos de Pt^{II}, pero puesto que se ha demostrado que existe una correlación entre el potencial de reducción y la farmacología de complejos de Pt^{IV}, y también que la modificación de los ligandos axiales en estos complejos modula su solubilidad, su capacidad de entrar en las células, y el potencial y velocidad de reducción,⁵¹ otro objetivo de esta Tesis fue la evaluación del potencial de reducción de los compuestos de Pt^{IV} recogidos en esta memoria.

Dado que los complejos de Pt^{IV} son considerados prodrogas que deben activarse a través de su reducción a sus análogos de Pt^{II}, y que se ha descrito que es posible la fotoactivación de complejos de Pt^{IV} mediante irradiación^{52,53} nos planteamos aplicar esta técnica de fotoactivación a los complejos de Pt^{IV}. La principal diferencia de estos compuestos con respecto a los estudiados previamente radica en la ausencia de un ligando reductor en el complejo. La realización de ambos estudios electroquímicos y fotoquímicos, podría aportar información complementaria en el estudio de los complejos de Pt^{IV}.

2.2.2 Estructura de la memoria

Esta memoria consta de un capítulo escrito en inglés "Chapter 1", donde se describen y discuten los resultados obtenidos durante esta investigación.

Los demás capítulos están escritos en castellano. El capítulo 2 contiene la introducción general y los objetivos planteados en esta Tesis. En la introducción se realiza una descripción de la evolución de los fármacos de platino, sus limitaciones,

⁵⁰ Heringova, P.; Woods, J.; Mackay, F. S.; Kasparkova, J.; Sadler, P. J.; Brabec, V. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7792

⁵¹ Hall, M. D.; Hambley, T. W. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 49

⁵² Kratochwil, N. A.; Zabel, M.; Range, K. J.; Bednarski, P. J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2499

⁵³ Bednarski, P. J.; Mackay, F. S.; Sadler, P. J. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.* **2007**, *7*, 75

los avances realizados en el conocimiento de su mecanismo de acción y los nuevos campos de investigación abiertos para el diseño de futuros fármacos de platino.

Posteriormente, se presentan los capítulos 3-6 que se han dividido en: introducción, parte experimental y, finalmente, resultados y discusión.

El capítulo 3, titulado "Síntesis, caracterización y citotoxicidad de complejos *trans*-Pt^{II} y Pt^{IV} en las líneas celulares tumorales SF268, MCF-7 y NCI-H460" recoge los métodos de síntesis y caracterización de los complejos. Además, se muestran los datos de citotoxicidad obtenidos para estos complejos en las líneas celulares tumorales modelo del Instituto Nacional del Cáncer (USA) SF268, MCF-7 y NCI-H460, realizados bajo la supervisión del Dr. Amancio Carnero en el CNIO.

Los estudios de la hidrólisis de complejos *trans*-Pt^{II} con aminas alifáticas marcadas con ¹⁵N por RMN 2D [¹H,¹⁵N] HSQC se abordan en el capítulo 4, donde se detallan además los métodos utilizados para la síntesis de estos complejos *trans*-[¹⁵N-Pt^{II}] y la correspondiente caracterización. Se presenta también el estudio de esta hidrólisis realizado mediante la variación de la conductividad de las muestras en disolución acuosa, por lo que este capítulo se ha titulado "Estudios de hidrólisis de complejos *trans*-Pt^{II} por RMN 2D [¹H,¹⁵N] HSQC y conductimetría".

Los estudios de fotoactivación de la hidrólisis y fotorreacciones de los complejos *trans*-Pt^{II} con las nucleobases 5'-GMP, 5'-AMP y 5'-CMP están recogidos en el capítulo 5, titulado "Fotoactivación de la hidrólisis de complejos *trans*-Pt^{II} y fotorreacciones con nucleobases".

El capítulo 6 muestra los estudios electroquímicos realizados con los hidroxocomplejos *trans*-Pt^{IV}, análogos a los correspondientes de Pt^{II}. Además, se muestra el estudio fotoquímico del complejo *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)]. El título con que se presenta este capítulo es "Fotoquímica y electroquímica de dihidroxocomplejos *trans*-Pt^{IV}".

Al final de esta memoria se describen las conclusiones a que ha dado lugar esta investigación, el apéndice y los agradecimientos.

El apéndice de esta memoria es común para la versión española e inglesa por lo que los pies de las Figuras y los encabezados de las Tablas están escritos en ambos idiomas. Las referencias han sido incluidas de forma independiente en la versión inglesa y española.

Capítulo 3. Síntesis, caracterización y citotoxicidad de complejos *trans*-Pt^{II} y Pt^{IV} en las líneas celulares tumorales SF268, MCF-7 y NCI-H460

3.1 Introducción

En nuestro grupo de investigación se diseñaron y estudiaron por primera vez compuestos de Pt^{II} y Pt^{IV} con diferentes aminas alifáticas en *trans*.

Se encontró que compuestos de fórmula *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')] y *trans*-[PtCl₂(NH₃)(amina)] (Figura 3.1) presentaban una actividad citotóxica muy superior a la del transplatino, a la de compuestos con las mismas aminas alifáticas en *trans* y a la de sus análogos *cis*.^{34,54} Además, mostraron una citotoxicidad en un rango similar a la del cisplatino en líneas celulares sensibles (Jurkat, Hela, Vero)^{†,34} y resistentes al cisplatino (HL-60, Pam212-ras)^{*34} (Tabla A3-1 apéndice), encontrándose que su actividad parecía estar relacionada con la inducción de apoptosis.^{34,38}

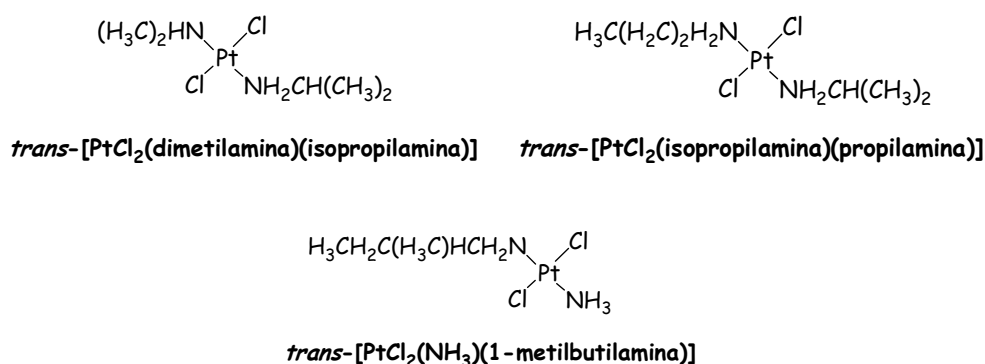


Figura 3.1 Ejemplo de complejos activos *trans*-Pt^{II} con aminas alifáticas como ligandos

De todos los complejos estudiados los mejores resultados se obtuvieron para el *trans*-[PtCl₂(dimetilamina)(isopropilamina)], con el que se ampliaron

⁵⁴ Pantoja, E.; Álvarez-Valdés, A.; Pérez, J. M.; Navarro-Ranninger, C.; Reedijk, J. *Inorg. Chim. Acta.* **2002**, *339*, 525

[†] Jurkat: línea de células leucémicas humanas; Hela: línea celular procedente de carcinoma de cerviz humano y Vero: células de riñón de mono

^{*} HL-60: promielocitos leucémicos humanos y Pam212-ras: queratocitos de ratón transformados con el oncogén H-ras y resistentes al cisplatino

estudios en nuevas líneas celulares, sensibles (CH1 y A2780)[®] y resistentes (CH1cisR y A2780cisR)[∅] al cisplatino (Tabla A3-1 apéndice), encontrándose que³⁸:

- i) presentaba una mayor actividad que el cis- y transplatino,
- ii) era capaz de vencer la resistencia al cisplatino, ya que presentaba actividad en líneas celulares resistentes al mismo,
- iii) la inducción de apoptosis era dos veces superior a la del cisplatino.

Además, estudios de la interacción de este complejo con ADN llevaron a la conclusión de que la formación de aductos intercatenarios (entre bases complementarias guanina y citosina) es dos y tres veces mayor que la que inducen el cisplatino y transplatino, respectivamente.

En cuanto a complejos de Pt^{IV}, nuestro grupo ha evaluado la actividad biológica del complejo *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimetilamina)(isopropilamina)]⁵⁵ en comparación con el correspondiente análogo de Pt^{II}. Los resultados indican que el complejo de Pt^{IV} exhibe una actividad citotóxica significativa frente a células resistentes al cisplatino: 41McisR[‡] y CH1cisR. Por el contrario, el complejo de Pt^{II} solamente presenta actividad frente a la línea celular CH1cisR. Este último, además, no posee actividad antitumoral *in vivo* frente a células de cáncer de ovario de ratón,⁵⁵ al contrario de lo que ocurre con el complejo de Pt^{IV} (Tabla A3-1 apéndice).

[®] CH1 y A2780: carcinomas de ovario humano

[∅] CH1cisR: línea celular CH1 con resistencia adquirida al cisplatino, debida principalmente a un aumento en la reparación-tolerancia de los aductos Pt- ADN

A2780cisR: línea celular A2780 con resistencia adquirida al cisplatino, debida a la combinación de una disminución en la acumulación de Pt, aumento en la reparación-tolerancia de los aductos Pt-ADN y elevados niveles de GSH

⁵⁵ Pérez, J. M.; Kelland, L. R.; Montero, E. I.; Boxall, F. E.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 933

[‡] 41McisR: línea celular 41M con resistencia adquirida al cisplatino, debida principalmente a la baja acumulación de platino

3.2 Experimental

3.2.1 Materiales

Los productos de partida utilizados para la síntesis de los compuestos fueron suministrados por Chambers Hispania, S.L. y Sigma-Aldrich, y son los siguientes: K_2PtCl_4 , isopropilamina, dimetilamina y metilamina. HCl 35% y H_2O_2 33% fueron suministrados por Prolabo.

Los disolventes $CHCl_3$, THF, Et_2O y $(CH_3)_2CO$ fueron suministrados por Sigma-Aldrich y se secaron, en aquellos casos en los que fue necesario, como se indica en "Purification of Laboratory Chemicals".⁵⁶ El agua utilizada fue purificada mediante un sistema Milli-Ro Milli-Q de Millipore. Los disolventes deuterados $DMSO-d_6$, $CDCl_3$ y D_2O fueron suministrados por SDS.

3.2.2 Instrumentación

3.2.2.1 Análisis químico

Los análisis elementales de C, H y N se realizaron en un microanalizador LECO CHNS-932.

3.2.2.2 Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear para la caracterización de los compuestos fueron registrados en espectrómetros BRUKER AMX-300 con una sonda BBO de 5 mm (1H 300.13 MHz, ^{13}C 75.47 MHz, ^{195}Pt 64.53 MHz) y DRX 500 con sondas BBI y QNP de 5 mm (1H 500.13 MHz, ^{13}C 125.76 MHz).

Los valores de los desplazamientos químicos se dan en unidades δ (ppm), y los valores de las constantes de acoplamiento en Hz. Las referencias utilizadas en los espectros fueron tetrametilsilano (Me_4Si) como referencia interna, y las señales residuales del disolvente deuterado $CDCl_3$, D_2O o $DMSO-d_6$ (porcentaje de moléculas no deuteradas del disolvente). Para los espectros RMN 1D ^{195}Pt se utilizó la sal Na_2PtCl_6 como referencia externa.

⁵⁶ Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. in *Purification of Laboratory Chemicals*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997

3.2.2.3 Difracción de Rayos-X

De los complejos para los que se obtuvieron monocristales se determinó su estructura por DRX. Los equipos utilizados han sido:

i) Difractómetro Kappa Apex II (Bruker-AXS) con tubo sellado de Molibdeno. La potencia del tubo fue de 1800 vatios (50 kV y 36 mA). La medida se hizo a baja temperatura (100 K), con una combinación de escanes en omega y phi. Los datos de la integración se corrigieron en absorción con el programa SADABS y se resolvieron con la suite de programas SHELXTL.

ii) Difractómetro Enraf-Nonius Kappa CCD con un monocromador de grafito Mo-Ka. La reducción de datos y refinamiento de la celda unidad se realizó con los programas DENZO y SCALE-PACK.⁵⁷ La estructura fue resuelta por los métodos estándar de Patterson⁵⁸ y refinada por ajuste de mínimos cuadrados basados en F2 y utilizando los siguientes programas: SHELXTL-PLUS,⁵⁹ SHELXL-97⁶⁰ y WinGX.⁶¹ Todos los átomos, a excepción de los hidrógenos, fueron refinados anisotrópicamente. Los átomos de hidrógeno fueron ubicados en posiciones geométricas ideales de acuerdo con las consideraciones geométricas de la molécula y refinadas utilizando un modelo riding.

3.2.3 Síntesis de complejos *cis*-Pt^{II}

Para la síntesis de los complejos *cis*-[PtCl₂(amina)₂] se siguió la metodología descrita en la bibliografía.³⁴

cis-[PtCl₂(dimetilamina)₂]

A una suspensión de K₂PtCl₄ (500 mg; 1.2 mmol) en H₂O, se le añaden 4 equivalentes de dimetilamina (600 µL; 4.8 mmol). La mezcla se pone en agitación a temperatura ambiente y oscuridad 24 horas; durante este tiempo se produce un precipitado amarillo. Se filtra el precipitado, se lava con H₂O y cloroformo, y se seca a vacío.

⁵⁷ Otwinowski, Z.; Minor, W. DENZO and SCALEPACK, *Methods Enzymol.* **1997**, 276, 307

⁵⁸ Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr. A.* **1990**, 46, 467

⁵⁹ Sheldrick, G. M. SHELXTL-PLUS (VMS), Siemens Analytical X-Ray Instruments, Madison, WI, **1990**

⁶⁰ Sheldrick, G. M. SHELXL-97, program for crystal structure refinement, University of Goettingen, Germany, **1993**

⁶¹ Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, 32, 837

cis-[PtCl₂(dma)₂], sólido amarillo. Rendimiento 60%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 13.66; H, 3.93; N, 7.90. Calculado para C₄H₁₄N₂Cl₂Pt: C, 13.48; H, 3.96; N, 7.86. δ_{H} (300.13 MHz; DMSO-d₆) 2.52 (6 H, d, J_{HH} 5.7, CH₃), 5.69 (1 H, sa, NH); δ_{C} (125.76 MHz; DMSO-d₆) 43.6.

***cis*-[PtCl₂(isopropilamina)₂]**

A una suspensión de K₂PtCl₄ (500 mg; 1.2 mmol) en una mezcla de THF-H₂O, se le añaden 4 equivalentes de isopropilamina (413 μ L; 4.8 mmol). La mezcla se pone en agitación a temperatura ambiente y oscuridad 48 horas. El precipitado amarillo que se forma, se filtra, se lava con H₂O y cloroformo, y se seca a vacío.

cis-[PtCl₂(ipa)₂], sólido amarillo. Rendimiento 82%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 18.10; H, 4.56; N, 7.30. Calculado para C₆H₁₈N₂Cl₂Pt: C, 18.75; H, 4.72; N, 7.29. δ_{H} (300.13 MHz; DMSO-d₆) 1.2 (6 H, d, J_{HH} 6.5, CH₃), 3.09 (1 H, sp, J_{HH} 6.5, CH), 4.74 (2 H, sa, NH₂); δ_{C} (125.76 MHz; DMSO-d₆) 23.52 (CH₃), 47.6 (CH).

3.2.4 Síntesis de complejos *trans*- Pt^{II}

Se ha realizado la síntesis de los siguientes compuestos de Pt^{II}: *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (**1**), *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] (**2**) y *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (**3**). Como reactivos de partida se han utilizado los compuestos *cis*-Pt^{II} descritos anteriormente. Para la síntesis de estos complejos *trans*- Pt^{II} se siguió la metodología descrita.³⁴

En el caso específico del complejo **2**, se presenta en esta tesis por primera vez su síntesis y caracterización.

***trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(metilamina)] (**1**)**

A una suspensión de *cis*-[PtCl₂(ipa)₂] (150 mg; 0.39 mmol) en 4.5 mL de H₂O, se le añaden 20 equivalentes de metilamina (675 μ L; 7.8 mmol). La mezcla se pone en agitación a reflujo hasta obtener una disolución incolora que contiene la tetraamina. La disolución se enfría en baño de hielo y se filtra. A esta disolución se le añaden 13 equivalentes de HCl 35% (447 μ L; 5.07 mmol) y la mezcla se pone a reflujo durante 24 horas. La disolución amarilla resultante se enfría en baño de hielo. Se produce un precipitado amarillo que se filtra, se lava con agua y se seca a vacío.

trans-[PtCl₂(ipa)(ma)], sólido amarillo. Rendimiento 59%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 13.55; H, 3.76; N, 7.96. Calculado para C₄H₁₄N₂Cl₂Pt: C, 13.48; H, 3.96; N, 7.86. δ_H (300.13 MHz; CDCl₃) 1.33 (6 H, d, J_{HH} 6.5, CH₃-ipa), 2.57 (3 H, t, J_{HH} 6.5, CH₃-ma), 3.31 (1 H, sp, J_{HH} 6.5, CH), 3.41 (4 H, sa, NH₂-ipa y NH₂-ma); δ_C (75.47 MHz; CDCl₃) 23.97 (CH₃-ipa), 33.22 (CH₃-ma), 48.38 (CH); δ_{Pt} (64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2175.

***trans*-[PtCl₂(dimetilamina)(metilamina)] (2)**

A una suspensión de *cis*-[PtCl₂(dma)₂] (150 mg; 0.42 mmol) en 4.5 mL de H₂O, se le añaden 20 equivalentes de metilamina (725 μ L; 8.4 mmol). La mezcla se pone en agitación a reflujo hasta obtener una disolución incolora. La disolución se enfría en baño de hielo, se filtra y se rota hasta sequedad. El producto obtenido se disuelve en 3 mL de agua, se añaden 13 equivalentes de HCl 35% (480 μ L; 5.4 mmol) y la mezcla se pone a reflujo durante 24 horas. La disolución amarilla resultante se enfría en baño de hielo. El precipitado amarillo se filtra, se lava con agua y se seca a vacío.

trans-[PtCl₂(dma)(ma)], sólido amarillo. Rendimiento 64%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 10.48; H, 3.34; N, 8.14. Calculado para C₃H₁₂N₂Cl₂Pt: C, 10.53; H, 3.53; N, 8.18. δ_H (300.13 MHz; CDCl₃) 2.55 (3 H, t, J_{HH} 6.5, CH₃-ma), 2.66 (6 H, d, J_{HH} 6, J_{HPt} 30.5, CH₃-dma), 3.21 (2 H, sa, NH₂), 3.84 (1 H, sa, NH); δ_C (75.47 MHz; CDCl₃) 33.44 (CH₃-ma), 43.46 (CH₃-dma); δ_{Pt} (64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2208.

***trans*-[PtCl₂(dimetilamina)(isopropilamina)] (3)**

A una suspensión de *cis*-[PtCl₂(dma)₂] (320 mg; 0.89 mmol) en 3.2 mL de H₂O, se le añaden 4 equivalentes de isopropilamina (309 μ L; 3.6 mmol). La mezcla se mantiene bajo agitación a 70°C durante 3 horas y posteriormente durante 1 hora a reflujo. Se obtiene una disolución incolora que contiene la tetraamina, la cual se enfría en baño de hielo y se filtra. A esta disolución se le añaden 13 equivalentes de HCl 35% (1020 μ L; 11.57 mmol) y se deja a reflujo durante 20 horas. La disolución amarilla resultante se enfría en baño de hielo. El precipitado que se forma se filtra, se lava con agua y se seca a vacío.

trans-[PtCl₂(dma)(ipa)], sólido amarillo. Rendimiento 77%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 16.64; H, 4.10; N, 7.96. Calculado para C₅H₁₆N₂Cl₂Pt: C, 16.22; H, 4.35; N, 7.56. δ_H (300.13 MHz; CDCl₃) 1.33 (6 H, d, J_{HH} 6.5, CH₃-ipa), 2.67 (6 H, d, J_{HH} 6, CH₃-dma), 3.18 (2 H, sa, NH₂), 3.29 (1 H, sp, J_{HH} 6.5, CH), 3.86 (1 H, sa,

NH); δ_C (75.47 MHz; CDCl_3) 24.1 (CH_3 -ipa), 43.3 (CH_3 -dma), 48.9 (CH); δ_{Pt} (64.53 MHz; CDCl_3 ; Na_2PtCl_6) -2212.

3.2.5 Síntesis de complejos *trans*-Pt^{IV}

Se han sintetizado los siguientes compuestos *trans* de platino(IV): *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] (**1-IV**), *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] (**2-IV**) y *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)] (**3-IV**). Como reactivos de partida se han utilizado los compuestos *trans*-Pt^{II} (**1**, **2** y **3**) descritos anteriormente. La síntesis de los complejos octaédricos *trans*-Pt^{IV}, se llevo a cabo mediante los métodos descritos en la bibliografía^{55,62} con algunas modificaciones.

En el caso específico del complejo **2-IV**, al igual que como ocurría con su análogo de Pt^{II} **2**, se presenta por primera vez en esta memoria su síntesis y caracterización.

trans-[PtCl₂(OH)₂(isopropilamina)(metilamina)] (**1-IV**)

A una suspensión de *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (**1**) (70 mg; 0.2 mmol) en 850 μL de H_2O , se le añaden 22 equivalentes de H_2O_2 33% (412 μL ; 4.4 mmol). La mezcla se mantiene en agitación y oscuridad a 80°C durante 4 horas, tras las que se obtiene una disolución que se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, ésta se mantiene en agitación y oscuridad toda la noche. Tras este tiempo la disolución se filtra en placa y se concentra. Se añade acetona y un precipitado amarillo cristalino se observa tras varias horas. El sólido se filtra, se lava con acetona y se seca a vacío.

trans-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)], sólido amarillo. Rendimiento 45%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 12.16; H, 4.07; N, 7.06. Calculado para $\text{C}_4\text{H}_{16}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{O}_2\text{Pt}$: C, 12.31; H, 4.13; N, 7.18. δ_H (300.13 MHz; D_2O) 1.27 (6 H, d, J_{HH} 6.5, CH_3 -ipa), 2.27 (3 H, s, J_{HPt} 26, CH_3 -ma), 3.28 (1 H, sp, J_{HH} 6.5, CH); δ_C (75.47 MHz; D_2O) 22.2 (CH_3 -ipa), 29.9 (CH_3 -ma), 47.6 (CH); δ_{Pt} (64.53 MHz; D_2O ; Na_2PtCl_6) 749.

⁶² Montero, E. I. in PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Química Inorgánica. Madrid, 2002

***trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimetilamina)(metilamina)] (2-IV)**

A una suspensión de *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] (2) (287 mg; 0.84 mmol) en H₂O (3.5 mL) se le añaden 22 equivalentes de H₂O₂ 33% (1730 µL; 18.5 mmol). La mezcla se mantiene en agitación y oscuridad a 80°C durante 2 horas. Posteriormente la disolución se deja enfriar a temperatura ambiente y se mantiene en agitación y oscuridad toda la noche. La disolución resultante se filtra, se concentra y se le añade acetona. Un precipitado amarillo cristalino se observa tras varias horas. El sólido se filtra, se lava con acetona y se seca a vacío.

trans-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)], sólido amarillo. Rendimiento 50%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 9.71; H, 4.04; N, 7.41. Calculado para C₃H₁₄N₂Cl₂O₂Pt: C, 9.58; H, 3.75; N, 7.44. δ_H(300.13 MHz; D₂O) 2.33 (3 H, s, J_{HPt} 27, CH₃-ma), 2.66 (6 H, s, J_{HPt} 23, CH₃-dma); δ_C(75.47 MHz; D₂O) 30.4 (CH₃-ma), 41.9 (CH₃-dma); δ_{Pt}(64.53 MHz; D₂O; Na₂PtCl₆) 739.

***trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimetilamina)(isopropilamina)] (3-IV)**

A una suspensión de *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (3) (220 mg; 0.59 mmol) en H₂O (2.5 mL) se le añaden 22 equivalentes de H₂O₂ 33% (1218 µL; 13 mmol). La mezcla se mantiene en agitación a 80°C y oscuridad durante 1 hora y media. Transcurrido este tiempo se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se mantiene bajo agitación y oscuridad durante la noche. Posteriormente la disolución amarilla obtenida se concentra y aparece un precipitado amarillo, se añade acetona a la disolución para provocar una mayor precipitación. El sólido se filtra, se lava con acetona y se seca a vacío.

trans-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)], sólido amarillo. Rendimiento 54%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 14.66; H, 4.43; N, 6.81. Calculado para C₅H₁₈N₂Cl₂O₂Pt: C, 14.85; H, 4.48; N, 6.93. δ_H(300.13 MHz; D₂O) 1.38 (6 H, d, J_{HH} 6.5, CH₃-ipa), 2.55 (6 H, s, J_{HPt} 23.5, CH₃-dma), 3.37 (1 H, sp, J_{HH} 6.5, CH); δ_C(75.47 MHz; D₂O) 22.2 (CH₃-ipa), 41.8 (CH₃-dma), 47.8 (CH); δ_{Pt}(64.53 MHz; D₂O; Na₂PtCl₆) 798.

3.2.6 Estructuras de Rayos-X

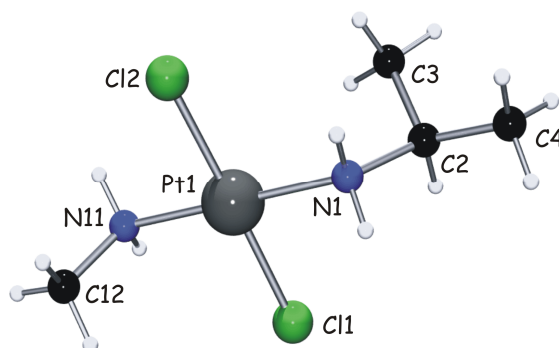
3.2.6.1 *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(metilamina)] (1)

Figura 3.2 Dibujo de la estructura del compuesto 1

Tabla 3.1 Distancias (Å) y ángulos (°) en el compuesto 1

Distancias (Å)		Ángulos (°)	
Pt1-N1	2.028(8)	N1-Pt1-Cl2	90.0(2)
Pt1-N11	2.036(9)	N1-Pt1-Cl1	90.5(2)
Pt1-Cl1	2.296(3)	N11-Pt1-Cl1	89.7(3)
Pt1-Cl2	2.290(3)	N11-Pt1-Cl2	89.8(3)
N1-C2	1.53(3)	N1-Pt1-N11	179.8(4)
C2-C4	1.500(10)	Cl1-Pt1-Cl2	178.44(12)
C2-C3	1.502(10)	Pt1-N11-C12	115.1(8)
N11-C12	1.437(15)	Pt1-N1-C2	120.8(10)

Tabla 3.2 Enlaces de hidrógeno en el compuesto 1[‡]

Distancias (Å)		Distancias (Å)	
N1(H)···Cl1 ⁽ⁱ⁾	3.388(9)	N1(H)···Cl2 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	3.404(9)
N11(H)···Cl1 ⁽ⁱⁱ⁾	3.361(9)	N11(H)···Cl2 ^(iv)	3.359(10)

[‡] Transformaciones de simetría: (i) $x-1, y, z$; (ii) $x, y+1, z$; (iii) $x, y-1, z$; (iv) $x+1, y, z$

Tabla 3.3 Datos cristalográficos del compuesto 1

Peso molecular	356.16 g mol ⁻¹
Simetría	monoclínico
Grupo espacial	P21/c
<i>Parámetros de celdilla:</i>	
	a (Å) 6.0480(12)
	b (Å) 6.0370(12)
	c (Å) 28.637(6)
	α (°) 90
	β (°) 93.70(3)
	γ (°) 90
Z	4
Volumen	1043.4(4) Å ³
Densidad calculada	2.267 g cm ⁻³
μ(Mo Kα)	13.897 mm ⁻¹
F(000)	656
Intervalo de θ	2.85-28.06°
Reflexiones recogidas	2267
Reflexiones observadas	1320
<i>Índices R finales [I>2σ(I)]:</i>	
Números de parámetros refinados	81
R ₁	0.0494
wR ₂	0.0872
Bondad del ajuste, S	1.077
Densidad residual ρ _{max} , ρ _{min}	1.695, -1.224 e Å ⁻³

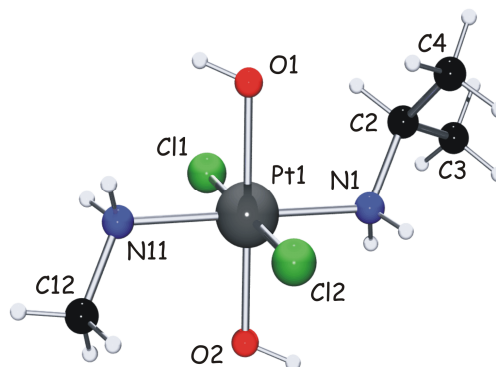
3.2.6.2 *trans*-[PtCl₂(OH)₂(isopropilamina)(metilamina)] (1-IV)

Figura 3.3 Dibujo de la estructura del complejo 1-IV

Tabla 3.4 Distancias (Å) y ángulos (°) en el compuesto 1-IV

Distancias (Å)		Ángulos (°)	
Pt1-O1	2.011(8)	O1-Pt1-O2	179.6(3)
Pt1-O2	2.016(8)	O1-Pt1-N1	92.7(4)
Pt1-N1	2.071(9)	O2-Pt1-N1	87.7(4)
Pt1-N11	2.075(9)	O1-Pt1-N11	88.0(4)
Pt1-Cl2	2.307(3)	O2-Pt1-N11	91.7(3)
Pt1-Cl1	2.312(3)	N1-Pt1-N11	179.0(4)
		O1-Pt1-Cl2	89.1(3)
		O2-Pt1-Cl2	90.7(2)
		N1-Pt1-Cl2	91.9(3)
		N11-Pt1-Cl2	88.9(3)
		O1-Pt1-Cl1	90.8(3)
		O2-Pt1-Cl1	89.4(2)
		N1-Pt1-Cl1	88.0(3)
		N11-Pt1-Cl1	91.3(3)
		Cl2-Pt1-Cl1	179.84(13)
		C2-N1-Pt1	119.0(8)
		C12-N11-Pt1	117.2(8)
		C4-C2-N1	110.8(12)
		C4-C2-C3	112.9(12)
		N1-C2-C3	108.7(11)

Tabla 3.5 Datos cristalográficos del compuesto **1-IV**

Peso molecular	390.18 g mol ⁻¹
Simetría	monoclínico
Grupo espacial	P21/c
<i>Parámetros de celdilla:</i>	
	a (Å) 8.4160(17)
	b (Å) 7.3210(15)
	c (Å) 18.708(5)
	α (°) 90
	β (°) 115.99(2)
	γ (°) 90
Z	4
Volumen	1036.1(4) Å ³
Densidad calculada	2.501 g cm ⁻³
μ(Mo Kα)	14.02 mm ⁻¹
F(000)	728
Intervalo de θ	2.42-22.19°
Reflexiones recogidas	1296
Reflexiones observadas	836
<i>Índices R finales [I>2σ(I)]:</i>	
Números de parámetros refinados	100
R ₁	0.0278
wR ₂	0.0642
Bondad del ajuste, S	0.975
Densidad residual ρ _{max} , ρ _{min}	0.693, -1.12 e Å ⁻³

Tabla 3.6 Enlaces de hidrógeno en el compuesto **1-IV**[†]

	Distancias (Å)
N11(H) ...O1 ⁽ⁱ⁾	2.802(12)
N1(H)...O2 ⁽ⁱⁱ⁾	2.877(12)

3.2.6.3 *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimetilamina)(metilamina)] (**2-IV**)

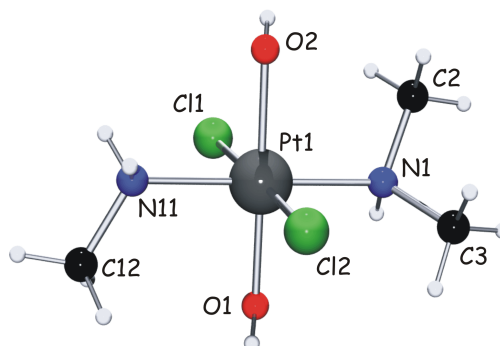


Figura 3.4 Dibujo de la estructura del compuesto **2-IV**

Tabla 3.7 Enlaces de hidrógeno en el compuesto **2-IV**[‡]

	Distancias (Å)
O3...O3 ⁽ⁱ⁾	2.755(5)
O3...O2	2.700(3)
O3...O5 ⁽ⁱⁱ⁾	2.780(4)
O4...O4 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	2.754(5)
O4...O2	2.761(3)
O4...O5	2.732(4)
O5...O3 ^(iv)	2.732(3)
N11...O5	2.892(3)
N11...O4 ^(v)	2.874(3)
N11...O1 ^(vi)	2.750(3)

[†] Transformaciones de simetría: (i) $-x, y-1/2, -z+1/2$; (ii) $-x+1, y+1/2, -z+1/2$

[‡] Transformaciones de simetría: (i) $-x+1, -y, -z+2$; (ii) $-x, -y+1, -z+2$; (iii) $-x+1, -y+1, -z+2$; (iv) $x, y+1, z$; (v) $-x, -y+1, -z+2$; (vi) $-x, -y+1, -z+1$

Tabla 3.8 Datos cristalográficos del compuesto **2-IV**

Peso molecular	430.20 g mol ⁻¹
Simetría	triclínico
Grupo espacial	P-1
<i>Parámetros de celdilla:</i>	
	a (Å) 6.1970(3)
	b (Å) 8.1633(5)
	c (Å) 12.9784(7)
	α (°) 77.605(3)
	β (°) 82.586(2)
	γ (°) 74.228(2)
Z	2
Volumen	615.36(6) Å ³
Densidad calculada	2.322 g cm ⁻¹
μ(Mo Kα)	11.832 mm ⁻¹
F(000)	408
Intervalo de θ	3.22-28.28°
Reflexiones recogidas	3024
Reflexiones observadas	2832
<i>Índices R finales [I>2σ(I)]:</i>	
Números de parámetros refinados	141
R ₁	0.0165
wR ₂	0.0374
Bondad del ajuste, S	1.062
Densidad residual ρ _{max} , ρ _{min}	1.116, -1.165 e Å ⁻³

Tabla 3.9 Distancias (Å) y ángulos (°) en el compuesto **2-IV**

Distancias (Å)		Ángulos (°)	
Pt1-O1	1.989(2)	O1-Pt1-O2	178.83(8)
Pt1-O2	2.0146(19)	O1-Pt1-N11	94.38(9)
Pt1-N11	2.056(2)	O2-Pt1-N11	85.37(9)
Pt1-N1	2.081(2)	O1-Pt1-N1	85.29(9)
Pt1-Cl2	2.3045(7)	O2-Pt1-N1	94.93(9)
Pt1-Cl1	2.3104(7)	N11-Pt1-N1	177.91(9)
		O1-Pt1-Cl2	91.29(7)
		O2-Pt1-Cl2	89.85(6)
		N11-Pt1-Cl2	88.02(7)
		N1-Pt1-Cl2	94.05(7)
		O1-Pt1-Cl1	89.14(7)
		O2-Pt1-Cl1	89.71(6)
		N11-Pt1-Cl1	88.50(7)
		N1-Pt1-Cl1	89.43(7)
		Cl2-Pt1-Cl1	176.51(2)
		Cl2-N11-Pt1	117.08(19)
		C2-N1-Pt1	114.43(18)
		C3-N1-Pt1	116.80(19)
		C2-N1-C3	108.2(3)

3.2.7 Estudios bioquímicos

Los estudios de citotoxicidad se realizaron en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en el grupo de investigación del Dr. Amancio Carnero.

3.2.7.1 Materiales

Los medios de cultivo, PBS, FCS y tripsina utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Los disolventes y los tampones fueron suministrados por Sigma-Aldrich, Merck, Panreac y BDH.

El cisplatino usado en los ensayos bioquímicos fue suministrado por Sigma-Aldrich. Las disoluciones stock de los complejos de platino de concentración

0.5 mM en 10 mM de NaClO₄ fueron guardadas y mantenidas en la oscuridad a 25°C.

3.2.7.2 Líneas celulares y evaluación de la citotoxicidad

Se han elegido las siguientes líneas celulares tumorales, utilizadas como modelo en el Instituto Nacional del Cáncer (USA) para evaluar la citotoxicidad de los complejos que forman parte de esta Tesis.

NCI-H460	Carcinoma de pulmón (NSCLC)
MCF-7	Carcinoma de mama
SF268	Glioblastoma cerebro

El procedimiento de cuantificación utilizado en los ensayos de citotoxicidad fue colorimétrico por tinción con cristal violeta.

Las células en crecimiento de la placa se despegan antes de llegar a confluir y se cuentan usando un hemocitómetro. Se diluyen con medio de cultivo ajustando la concentración celular al número requerido de células por cada 200 µL. Las células se siembran en placas de 96 pocillos, donde se ensayan los compuestos a una densidad dependiendo del tamaño celular, entre 10³ y 4 x 10³ células/pocillo. Las células se dejan crecer, durante 24 horas, en un incubador con 95% de aire y 5% de CO₂ a 37°C antes de añadir el fármaco.

Los compuestos se pesan y se disuelven en PBS, a una concentración de 10 mM o 5 mM. De aquí se prepara una placa madre con disoluciones en serie de hasta 200 veces la concentración final en el cultivo. Un volumen adecuado de la disolución del compuesto (generalmente 1-2 µL) se añade automáticamente (Beckman FX 96 tip) al medio hasta alcanzar la concentración final para cada fármaco. Cada concentración se hace por triplicado.

Una serie de pocillos control se deja en cada placa conteniendo medio, con la misma concentración de PBS pero sin fármaco. Una segunda serie de pocillos control se deja con células no tratadas justo antes de la adición de los fármacos (control de siembra, número de células con las que se empieza el cultivo).

Tras una exposición al fármaco de 96 horas, las células se lavan dos veces con tampón fosfato antes de ser fijadas con 10% de glutaraldehído. Las células fijadas se lavan dos veces y se tiñen con cristal violeta al 0.5% durante 30 min. Después, se lavan exhaustivamente las placas y se mide la absorbancia a 595 nm en un aparato Biorad Model 550 Microplate Reader.

Los datos obtenidos de absorbancia se analizan mediante el programa GraphPad Prism 4.00 para obtener el valor de IC₅₀.

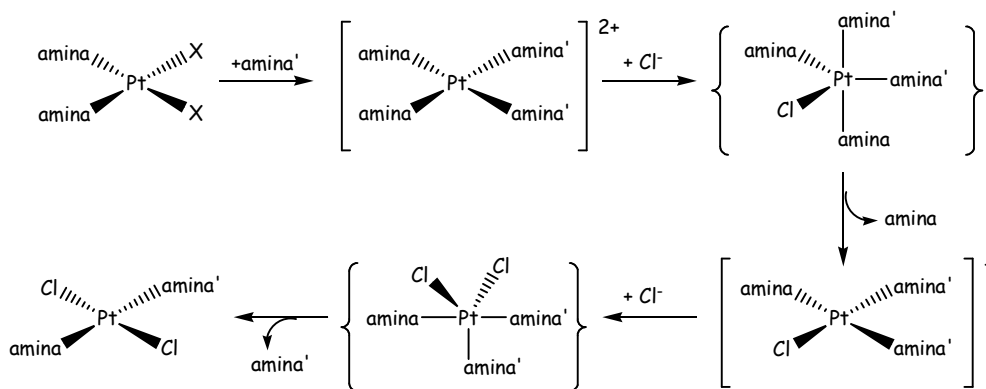
3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Síntesis

Se han sintetizado y caracterizado los complejos *cis*-[PtCl₂(dma)₂], *cis*-[PtCl₂(ipa)₂], *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (1), *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] (2), *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (3) *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] (1-IV), *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] (2-IV) y *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)] (3-IV).

La síntesis de los complejos se ha realizado de acuerdo con el esquema 3.1.⁶³ Como se observa en el mismo la síntesis de los compuestos *cis* es un paso previo.

La síntesis de los complejos *trans*-Pt^{II} implica dos sustituciones sucesivas, que se producen mediante mecanismos asociativos, generando una especie intermedia pentacoordinada.



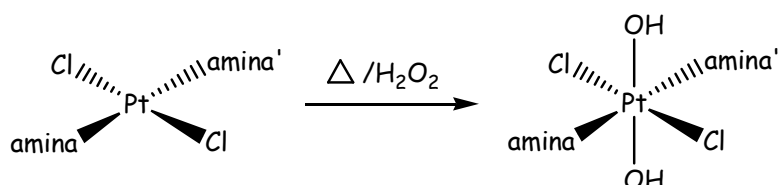
Esquema 3.1 Esquema general de la síntesis de compuestos *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')]

En el caso de los complejos *trans*-Pt^{IV} la síntesis se realiza mediante la oxidación de los compuestos de Pt^{II} con peróxido de hidrógeno.^{64,65} La reacción es una adición oxidativa en la que la estereoquímica del complejo se mantiene y donde las posiciones axiales del octaedro están ocupadas por ligandos hidroxilo (Esquema 3.2).

⁶³ Davies, J. A.; Hockensmith, C. M.; Kukushkin, V. Yu.; Kukushkin, Yu. N. in *Synthetic Coordination Chemistry: Theory and Practice*, Singapore, 1996, pp 452

⁶⁴ Kuroda, R.; Neidle, S.; Ismail, I. M.; Sadler, P. J. *Inorg. Chem.* 1983, 22, 3620

⁶⁵ Giandomenico, C. M.; Abrams, M. J.; Murrer, B. A.; Vollano, J. F.; Rheinheimer, M. I.; Wyer, S. B.; Bossard, G. E.; Higgins, J. D. *Inorg. Chem.* 1995, 34, 1015



Esquema 3.2 Esquema general de síntesis de complejos hidroxilo *trans*-Pt^{IV}

La caracterización de los complejos se ha realizado por análisis químico elemental, espectroscopía ¹H-RMN, ¹³C-RMN, ¹⁹⁵Pt-RMN y por difracción de rayos-X en los casos en los que ha sido posible la obtención de monocristales.

3.3.2 Caracterización por RMN

trans-[PtCl₂(dimetilamina)(metilamina)] (2)

La comparación de los desplazamientos químicos de ¹H de las señales de los ligandos amina en el complejo, con respecto a las de las aminas libres, muestra un desapantallamiento de las señales tras la coordinación (Tabla 3.10). Este hecho es atribuible al carácter dador σ de los grupos amino y, por consiguiente, al desapantallamiento general de los núcleos próximos al núcleo metálico.

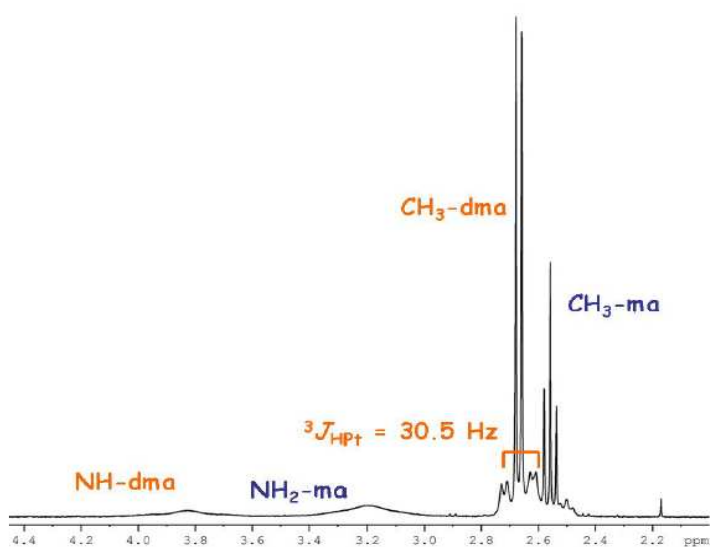


Figura 3.5 Espectro de RMN de ¹H del complejo 2 en CDCl₃

La coordinación del ligando al centro metálico se confirma también por la presencia de satélites de platino en el espectro de RMN de ^1H , en el que se observa el acoplamiento de los protones de los metilos de la dimetilamina con el platino ($^3\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^1\text{H})$ 30.5 Hz) (Figura 3.5). Recientemente, se han publicado dos revisiones sobre RMN de ^{195}Pt ^{66,67} que han recopilado los valores hasta ahora conocidos de constantes $^3\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^1\text{H})$ para numerosos complejos con muy diversos entornos; sin embargo, son escasos los valores conocidos de $^3\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^1\text{H})$ en un entorno PtN_2Cl_2 .³⁴

Tabla 3.10 Efecto de la coordinación en los desplazamientos químicos de los protones en los complejos **2** y **2-IV** en el espectro de RMN ^1H

$\delta(^1\text{H})$ ppm	dimetilamina		metilamina	
	CH_3	NH	CH_3	NH_2
libre	2.18 (s) ^a	1.63 (sa) ^a	2.18 (s) ^a	1.01 (s) ^a
	2.19 (s) ^b		2.28 (s) ^b	
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (dma)(ma)] (2) ^a	2.66 (d)	3.84 (sa)	2.55 (t)	3.21 (sa)
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (dma)(ma)] (2-IV) ^b	2.66 (d)		2.33 (s)	

d=doblete, s= singlete, sa= singlete ancho, t= triplete; ^a CDCl₃; ^b D₂O

De forma análoga, en el espectro de ^{13}C RMN se observa un gran desapantallamiento en los desplazamientos químicos de los carbonos de las cadenas alifáticas de las aminas con respecto a los observados en el ligando libre (ver sección experimental 3.2.4). Este hecho no sorprende si se tiene en cuenta que en estos ligandos amina todos los carbonos están enlazados directamente al nitrógeno.

El espectro de ^{195}Pt -RMN del complejo **2** presenta un único pico en torno a -2500 ppm, lo cual está en concordancia con un entorno de platino de PtN_2Cl_2 .⁶⁶

⁶⁶ Priqueler, J. R. L.; Butler, I. S.; Rochon, F. D. *Applied Spectroscopy Reviews*. **2006**, *41*, 185

⁶⁷ Still, B. M.; Kumar, P. G. A.; Aldrich-Wright, R.; Price, W. S. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 665

***trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimetilamina)(metilamina)] (2-IV)**

No se pudo realizar el estudio del efecto de la coordinación sobre los grupos amino, debido al intercambio rápido entre éstos y los deuterios del D₂O utilizado como disolvente.

Con respecto al resto de los protones de los ligandos, y al igual que ocurría para el compuesto de Pt^{II}, se observa el desapantallamiento de todas las señales tras la coordinación (Tabla 3.10).

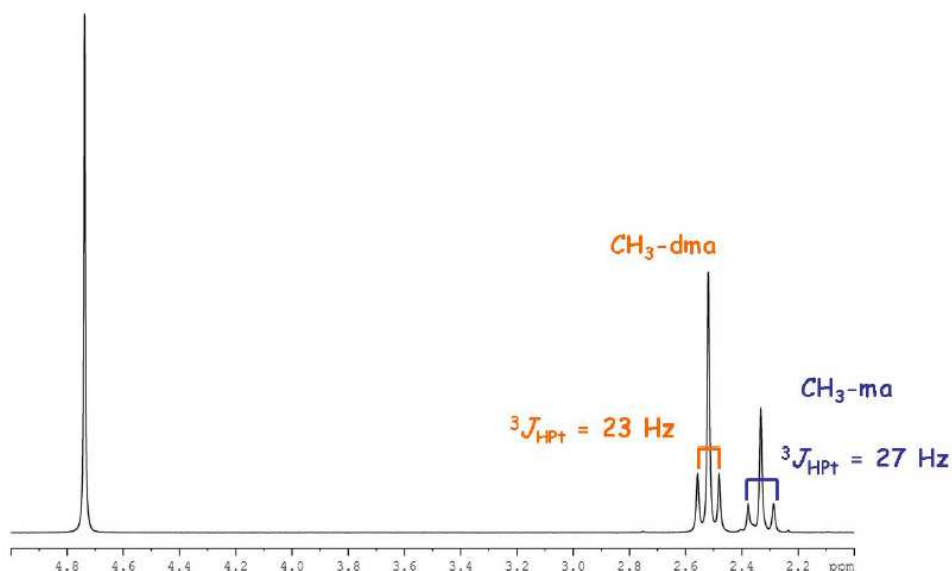


Figura 3.6 Espectro de RMN de ¹H del complejo 2-IV en D₂O

Nuevamente, la coordinación del ligando al platino queda patente por la presencia de satélites de platino en el espectro de RMN ¹H (³J(¹⁹⁵Pt-¹H) 23 y 27 Hz para la dimetilamina y metilamina, respectivamente) (Figura 3.6). Los satélites de platino de este complejo son de una gran intensidad, lo que se debe a que estamos ante un complejo de alta simetría. Como en el caso del complejo de Pt^{II}, se han publicado pocos valores de constantes ³J(¹⁹⁵Pt-¹H) dentro de un entorno de platino de PtN₂Cl₂O₂.⁶²

El espectro de RMN de ¹⁹⁵Pt confirma la obtención del complejo de Pt^{IV}, con una señal a 739 ppm (Figura 3.7), que se corresponde con lo esperado para un complejo con un entorno de platino de PtN₂Cl₂O₂.⁶⁶

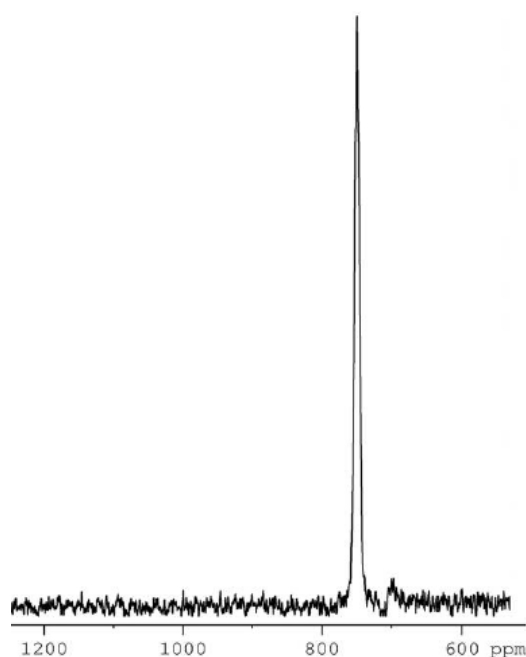


Figura 3.7 Espectro de RMN de ^{195}Pt del complejo 2-IV en D_2O

La comparación de los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C en los complejos de Pt^{II} o Pt^{IV} no es posible ya que los espectros se registraron en disolventes diferentes (CDCl_3 y D_2O , respectivamente) debido a sus diferentes solubilidades.

3.3.3 Determinación estructural por difracción de Rayos-X

***trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(metilamina)] (1)**

En la Figura 3.2 se muestra la estructura del complejo *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (1) junto con el esquema de numeración atómica.

El átomo de platino está enlazado a dos aminas y a dos ligandos cloro que se encuentran en disposición *trans*, donde el entorno del platino es planocuadrado.

Las distancias y ángulos en el entorno del platino y en los ligandos amina están en el rango esperado (Tabla 3.1).³⁶

El ligando metilamina está situado ligeramente por encima del plano definido por la geometría plano cuadrada del platino (Pt1,Cl1,Cl2,N1,N11), con un ángulo

diedro (Pt1,N11,C12) de 89.97°, mientras que el ligando isopropilamina está situado por debajo.

Se han observado interacciones intermoleculares en las que están implicados los ligandos cloro y los hidrógenos de los grupos amino de las moléculas vecinas (Tabla 3.2).

***trans*-[PtCl₂(OH)₂(isopropilamina)(metilamina)] (1-IV)**

En el complejo *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] (Figura 3.3) el átomo de platino tiene un entorno octaédrico, con valores de distancias Pt-N, Pt-Cl y Pt-O (Tabla 3.4) comparables a las encontradas en la bibliografía para los complejos *cis,trans*-dicloro-dihidroxi-bis(isopropilamina)-platino⁶⁸ y ((amino)-dicloro-dihidroxi-((2,2,6,6-tetrametil-1-oxilpiperidin-4-il)amina)-platino(IV)⁶⁹ y *cis,trans,cis*-dicloro-dihidroxi-amina-(2-picolinato)-platino(IV).⁷⁰ Los valores medidos para los ángulos que componen la estructura no pueden compararse debido a la diferente disposición de sus ligandos, aunque están dentro de las medidas normales para geometría octaédrica.

Con respecto a los ángulos diedros, como el C12 del ligando metilamina está situado por encima de los planos definidos por los átomos (Pt1,Cl1,Cl2,N1,N11) y (Pt1,O1,O2,N1,N11), los ángulos diedros que forman los planos anteriores con el plano (Pt1,N11,C12) son de 65.54° y 25.16°, respectivamente. El C2 del ligando isopropilamina, por su parte, está situado por debajo de los planos definidos por los átomos (Pt1,Cl1,Cl2,N1,N11) y (Pt1,O1,O2,N1,N11), y los ángulos diedros que forman dichos planos con el plano (Pt1,N1,C2) son de 65,73° y 24.97°, respectivamente.

Las moléculas están interconectadas por enlaces de hidrógeno en los que están implicados los oxígenos de los ligandos hidroxilo y los hidrógenos de los grupos amina (Tabla 3.6).

***trans*-[PtCl₂(OH)₂(dimetilamina)(metilamina)] (2-IV)**

En la Figura 3.4 se muestra la estructura cristalográfica del compuesto *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)], junto con el esquema de numeración atómica. Este

⁶⁸ Barnard, C. F. J.; Hydes, P. C.; Griffiths, W. P.; Mills, O. S. *J. Chem. Res.* **1983**, 302, 2801

⁶⁹ Sen, V. D.; Tkachev, V. V.; Volkova, L. M.; Goncharova, S. A.; Raevskaya, T. A.; Konvalova, N. P. *Russ. Chem. Bull.* **2003**, 403

⁷⁰ Battle, A. R.; Choi, R.; Hibbs, D. E.; Hambley, T. W. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 6317

complejo presenta una geometría octaédrica con valores de distancias y ángulos similares a los descritos para el complejo anterior **1-IV** (Tabla 3.9).

Con respecto a los ángulos diedros, en esta estructura el C12 del ligando metilamina está situado por encima del plano definido por los átomos (Pt1,C11,C12,N1,N11) y sobre el plano definido por (Pt1,O1,O2,N1,N11); así pues, los ángulos diedros que forman los planos anteriores con el plano (Pt1,N11,C12) son de 88.01° y 1.9°, respectivamente. El C2 del ligando dimetilamina por su parte, está situado por debajo del plano definido por los átomos (Pt1,C11,C12,N1,N11) y el ángulo diedro que forma dicho plano con el plano (Pt1,N1,C2) es de 64.95°. El ángulo diedro entre los planos (Pt1,O1,O2,N1,N11) y (Pt1,N1,C2) es de 25.47°.

Además del complejo, en esta estructura se encontraron tres moléculas de agua. Entre estas moléculas de agua y el complejo existen varias interacciones intermoleculares que se muestran en la Tabla 3.7.

3.3.4 Citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se han realizado cuantificando colorimétricamente las células que sobreviven tras su tratamiento con el fármaco, ya que éstas son las que permanecerán en la placa de ensayo tras el tratamiento de lavado y fijación con glutaraldehído. Estos ensayos nos proporcionan un valor de IC₅₀ normalizado a un tiempo de 96 horas. El valor de IC₅₀ ha sido calculado en todos los casos a partir de gráficas que representan supervivencia celular (%) frente al logaritmo de la concentración de fármaco de platino (μM) (Figura 3.8).

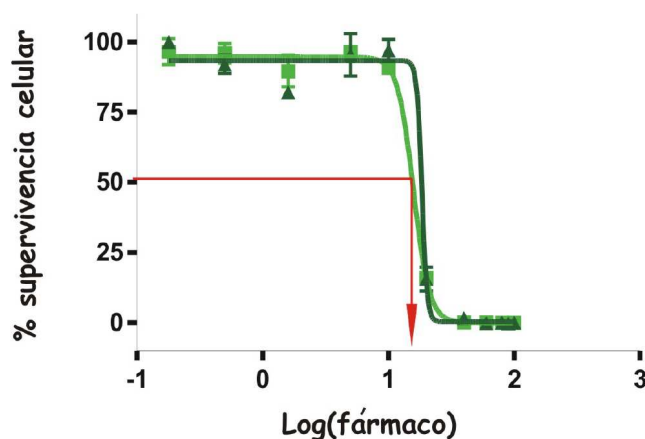


Figura 3.8 Ejemplo de análisis de datos citotóxicos

Se ha determinado la actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] **1**, *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] **2** y *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] **3** en las siguientes líneas celulares tumorales: SF268, MCF-7 y NCI-H460.

Según la definición de IC₅₀ cuanto menor sea este valor más activo es el fármaco. A la vista de los resultados (Figura 3.9) es de destacar la citotoxicidad del complejo **2** en la línea celular MCF-7, que indica que su actividad es aproximadamente cinco veces mayor que la del cisplatino.⁷¹ Anteriormente se habían descrito valores tan superiores al cisplatino sólo en la línea celular Pam212-ras resistente al cisplatino,³⁴ pero nunca para células sensibles a este fármaco. En el caso de las líneas celulares SF268 y NCI-H460, el complejo **2** es el que presenta valores de IC₅₀ más próximos a los del cisplatino.

Los resultados menos favorables han sido los obtenidos para el complejo **1** frente a la línea celular NCI-460, y los del complejo **3** frente a SF268 y MCF-7, y aún así, estamos hablando de valores de IC₅₀ en un rango micromolar y menores de 25 µM.

Comparando las citotoxicidades de los complejos *trans*-Pt^{II} entre sí, vemos como la actividad de los complejos **2** y **3** es muy similar en la línea NCI-H460, al igual que ocurre con la de **1** y **2** en la línea SF268. Sin embargo, la mayor diferencia de actividades se presenta en la línea celular MCF-7, donde el complejo **2** es 7 y 18 veces más activo que **1** y **3**, respectivamente.

Los nuevos valores de IC₅₀ obtenidos en estas líneas celulares muestran la alta actividad citotóxica que presentan estos complejos. Incluso, en algunos casos los resultados son más relevantes que los obtenidos en estudios citotóxicos previos.^{34,55}

Se ha determinado la actividad citotóxica de los hidroxilo complejos de Pt^{IV}: *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] **1-IV**, *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] **2-IV** y *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)] **3-IV**.

Los datos de citotoxicidad para los compuestos *trans*-Pt^{IV} (Figura 3.9), muestran valores similares en la línea celular SF268 para los tres complejos así como para **2-IV** y **3-IV** en la línea MCF-7, y **1-IV** y **2-IV** en la línea NCI-H460. Sin embargo, los complejos **1-IV** y **3-IV** son aproximadamente cuatro veces menos activos en las líneas MCF-7 y NCI-H460, respectivamente.

Comparando los valores de IC₅₀ con los del cisplatino podemos observar una citotoxicidad muy similar de los complejos **2-IV** y **3-IV** en la línea MCF-7, y de **1-IV** y **2-IV** en la línea NCI-H460 con respecto a este fármaco.

⁷¹ Ramos-Lima, F. J. in PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Química Inorgánica. Madrid, 2006

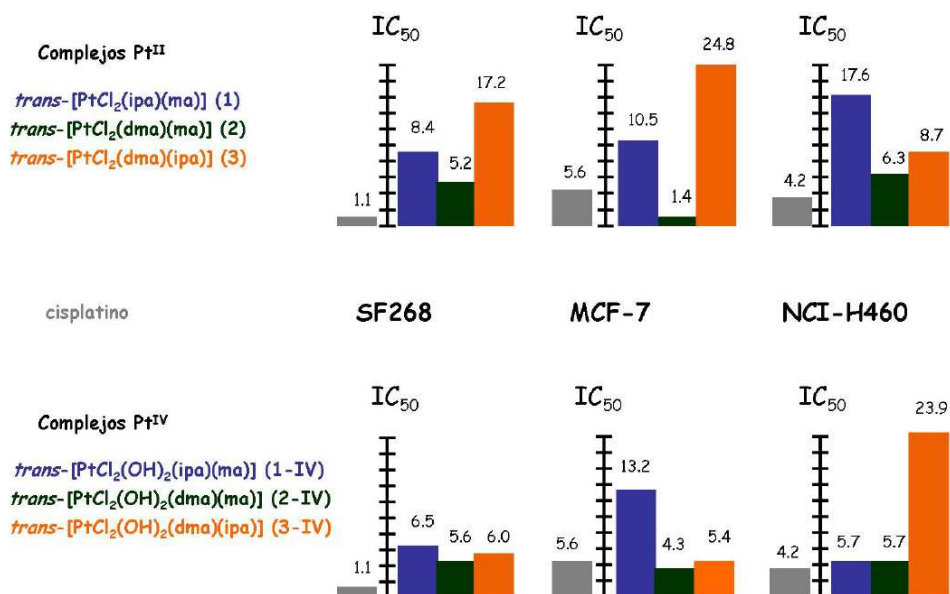


Figura 3.9 Diagramas de citotoxicidad

El diagrama de la Figura 3.9 donde se presentan los valores de IC₅₀ de los complejos *trans*-Pt^{II} y Pt^{IV} facilita la comparación de datos entre las correspondientes parejas de complejos análogos.

En la línea celular MCF-7 el valor de IC₅₀ del complejo 2 es tres veces menor que el de su correspondiente Pt^{IV}, es decir, el complejo 2-IV es menos activo. Este efecto se observa también para el par 3/3-IV en la línea celular NCI-H460 donde el complejo de Pt^{II} es casi tres veces más activo. Por el contrario, el complejo 1-IV en la línea celular NCI-H460 y el complejo 3-IV en las líneas SF268 y MCF-7 son entre 3 y 5 veces más activos que sus respectivos Pt^{II}. Finalmente, en el par 2/2-IV se observa una actividad similar en las líneas celulares SF268 y NCI-H460 al igual que en el par 1/1-IV en las líneas SF268 y MCF-7.

No parece posible establecer a la vista de estos resultados, relaciones entre la actividad citotóxica y el estado de oxidación del platino en las distintas líneas celulares.^{39,55} Nos gustaría destacar que los mejores resultados han sido los obtenidos para el par *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] 2/*trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] 2-IV, que corresponde a los complejos con ligandos que crean un pequeño impedimento estérico como la metilamina y la dimetilamina.

Los valores de IC₅₀ obtenidos en este estudio nos animaron a investigar su mecanismo de acción.

Capítulo 4. Estudios de hidrólisis de
complejos *trans*-Pt^{II} por RMN 2D [¹H, ¹⁵N]
HSQC y conductimetría

4.1 Introducción

En este capítulo se presentan los estudios de acuación de los complejos *trans*-Pt^{II} realizados por RMN y conductimetría. A continuación, y a modo de introducción, se describen los estudios de hidrólisis descritos en la bibliografía para complejos similares, así como algunos aspectos generales de las técnicas.

Resonancia Magnética Nuclear

La RMN es la técnica más ampliamente utilizada en investigaciones estructurales o dinámicas de compuestos químicos en fase condensada a pesar de algunas de sus limitaciones debido a la sensibilidad. Los fármacos de platino están constituidos generalmente por átomos de platino, nitrógeno, hidrógeno, cloro, oxígeno y carbono. Los isótopos de mayor utilidad para su estudio por RMN son ¹H, ¹⁵N, ¹³C y ¹⁹⁵Pt.

Por sus características, el ¹⁹⁵Pt es un heteronúcleo asequible para la observación directa por RMN, sin embargo, sus límites de detección (10 mM) no permiten que su estudio se realice fácilmente en medios biológicos. La característica más destacable de la RMN de ¹⁹⁵Pt es la de su ancha ventana espectral (13000 ppm), siendo especialmente sensible a los cambios de su estado de oxidación, a la sustitución de los ligandos y a la estereoquímica alrededor del núcleo de Pt,⁶⁷ por lo que ésta ha sido una técnica muy útil en nuestra investigación.

El isótopo más abundante del nitrógeno es el ¹⁴N, el cual posee un momento cuadrupolar que acorta los tiempos de relajación provocando un ensanchamiento de las señales y, como consecuencia, una disminución de la sensibilidad (1.0 × 10⁻³ relativa a ¹H). Por el contrario, el núcleo de ¹⁵N genera señales estrechas, es poco sensible, y su abundancia natural es baja. Los límites de receptividad del ¹⁵N le hacen poco útil para una detección directa. Existen técnicas que realizan experimentos denominados de transferencia de polarización (INEPT, DEPT) que permiten mejorar en ~10 veces la sensibilidad con respecto de la detección directa (Tabla 4.1).^{*} La detección indirecta ¹H-¹⁵N (HMQC, HSQC, HMBC) se beneficia de las mejores propiedades de los protones con respecto del ¹⁵N y fue la que decidimos utilizar en el estudio de nuestros complejos. Una limitación a su utilización es que el sistema en estudio debe contener el átomo de ¹⁵N con una

* En esta tabla se resumen la relación de sensibilidad teórica (basada en la expresión S/R) entre las técnicas descritas.

constante de acoplamiento medible con un ^1H vecino, por ello es necesario trabajar con compuestos enriquecidos en ^{15}N .

Tabla 4.1 Relación de sensibilidades de las diferentes técnicas de RMN de ^{15}N

Experimento	Factor S/R ^a	Amplificación	$^{15}\text{N}^b$
a) Detección directa	$\gamma_{\text{N}}(\gamma_{\text{N}})^{3/2}$		1
b) INEPT	$\gamma_{\text{H}}(\gamma_{\text{N}})^{3/2}$	Comparado con detección directa $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}}$	9.9
c) Detección de protones	$\gamma_{\text{H}}(\gamma_{\text{H}})^{3/2}$	Comparado con detección directa $\gamma_{\text{H}}(\gamma_{\text{N}})^5$	306
	$\gamma_{\text{H}}(\gamma_{\text{H}})^{3/2}$	Comparado con INEPT $\gamma_{\text{H}}(\gamma_{\text{N}})^{3/2}$	31

^a Para un núcleo dado, la intensidad de la señal en una medida de RMN se expresa por medio de la denominada relación S/R. Al valor de S/R contribuyen parámetros propios del núcleo como el número de moléculas en el volumen de muestra analizada N, la abundancia de los espines activos en RMN presentes en el experimento A, la constante magnetogírica del núcleo excitado γ_{exc} y del observado γ_{obs} , junto con otros de naturaleza instrumental como el campo magnético utilizado B_0 , la temperatura de la medida T, el número total de escaneos acumulados NS, así como, el tiempo de relajación transversal efectivo T_2^* .

$$S/R \sim \text{NAT}^{-1}\gamma_{\text{exc}}\gamma_{\text{obs}}^{3/2}B_0^{3/2}T_2^*(\text{NS})^{1/2}$$

^b sensibilidad relativa

RMN 2D [^1H , ^{15}N] HSQC en el estudio de complejos de platino

Como se ha mencionado en el punto anterior la investigación de fármacos de platino por las técnicas de RMN de ^{15}N y ^{195}Pt ^{72,73,74} ha permitido avanzar en el conocimiento de su mecanismo molecular y de acción. Sin embargo, dichos estudios se vieron limitados por la intrínseca insensibilidad de estos núcleos, hasta la introducción de la técnica de RMN 2D [^1H , ^{15}N] HSQC.

La técnica de RMN 2D [^1H , ^{15}N] HSQC fue utilizada por primera vez en 1992 para el estudio de la hidrólisis del cisplatino por el Prof. Sadler.⁴⁸ La utilización de este método supone teóricamente un aumento de 306 en la sensibilidad, con respecto a la detección directa del ^{15}N (Tabla 4.1). Los límites de detección para esta técnica están próximos a las concentraciones utilizadas en los estudios en medios fisiológicos. Otra de las ventajas es que permite el estudio de la

⁷² Ismail, I. M.; Kerrison, S. J. S.; Sadler, P. J. *Polyhedron*. **1982**, *1*, 57

⁷³ Macdonald, F. S.; Sadler, P. J. in *Biochemical Mechanisms of Platinum Antitumor Drugs*, eds. McBrien, D. C. H. and Slater, T. F., IRL Press, Oxford, **1986**, pp.361-381

⁷⁴ Bancroft, D. P.; Lepre, C. A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6860

interacción de complejos de platino con biomoléculas (ADN, proteínas,...) en medios biológicos (cultivos celulares), en los que los ligandos no salientes son aminas, debido a que sólo se produce la detección de aquellos protones unidos directamente al ^{15}N en el complejo.

Así, mediante esta técnica, se ha conseguido establecer el mecanismo de acción de estos fármacos, incluyendo su comportamiento en disolución acuosa, unión a proteínas, y la cinética y selectividad en sus interacciones con el ADN.^{75,76,77,78} Otro ejemplo es el estudio de la nueva generación de fármacos de platino, como los compuestos polinucleares desarrollados por el Prof. Farrell. En concreto, para el compuesto trinuclear BBR3464 se han podido conocer aspectos fundamentales de su cinética y de la formación de aductos específicos con el ADN.⁷⁹

Hidrólisis

En el mecanismo de acción de los fármacos de platino, la etapa de hidrólisis está considerada como la limitante dentro de la sucesión de pasos que finalizan en la muerte celular. Entre estos pasos se incluyen, además, preasociación con el ADN, formación de aductos monofuncionales y, posteriormente, evolución a aductos bifuncionales, distorsión de la doble hélice y reconocimiento de dicha distorsión.

Los fármacos de platino en uso clínico son administrados por infusión intravenosa. Una vez el fármaco se encuentra en la sangre, cierta cantidad será excretada a través de los riñones, provocando nefrototoxicidad, y otra parte llegará a la superficie externa de las células. Esta última fracción de fármaco entra finalmente en la célula, principalmente por difusión pasiva.^{11,12}

La hidrólisis tiene lugar en el interior de la célula debido a la baja concentración de cloruros en el citoplasma, aproximadamente 3-20 mM, en comparación con la concentración extracelular 100 mM (Figura 4.1). Así, se produce en los complejos de platino la sustitución de los ligandos Cl^- por los ligandos H_2O , formándose las especies activas, es decir, aquellas que poseen enlaces Pt-OH_2 , los cuales son más lábiles frente a las bases nitrogenadas del

⁷⁵ Murdoch, P. del S.; Guo, Z.; Parkinson, J. A.; Sadler, P. J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 32

⁷⁶ Liu, Y. Z.; Intini, F. P.; Natile, G.; Sletten, E. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 3489

⁷⁷ Vinje, J.; Intini, F. P.; Natile, G.; Sletten, E. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3569

⁷⁸ Berners-Price, S. J.; Ronconi, L.; Sadler, P. J. *Prog. NMR Spect.* **2006**, *49*, 65

⁷⁹ Davies, M. S.; Thomas, D. S.; Hegmans, A.; Berners-Price, S. J.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 1101

ADN que los enlaces Pt-Cl o Pt-OH.⁸⁰ Posteriormente, mediante un proceso en dos etapas, el complejo de platino se enlaza a su principal diana biológica produciendo los distintos aductos Pt-ADN.^{81,82}

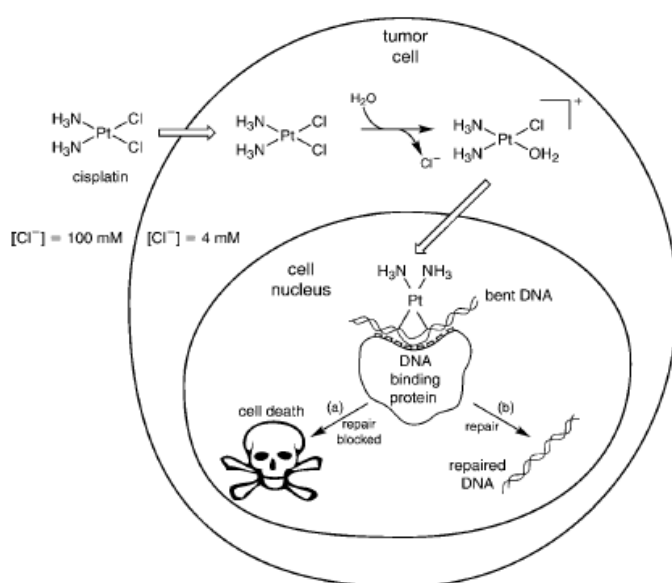


Figura 4.1. Mecanismo de entrada y acución del cisplatino previa unión al ADN[‡]

Hidrólisis del cisplatino

La hidrólisis del cisplatino ha sido ampliamente estudiada por métodos muy diferentes.⁸³

En el grupo de investigación del Prof Sadler se determinaron por primera vez los valores de pK_a de las acuoespecies del cisplatino utilizando la RMN 2D [¹H, ¹⁵N] HSQC.⁴⁸ Posteriormente, y aprovechando las posibilidades de esta técnica, se obtuvieron también las constantes de velocidad y equilibrio de su hidrólisis.⁴⁹

⁸⁰ Martin, R. B. in *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, ed. Lippert, B., Wiley-VCH, Zurich, **1999**, pp. 183-205

⁸¹ Kelland, L. R. *Drugs*. **2000**, *59*, 1

⁸² Brabec, V.; Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 5345

[‡] Imagen obtenida de Alderden, R. A.; Hall, M. D.; Hambley, T. W. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 728

⁸³ Berners-Price, S. J.; Appleton, T. G. in *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*, eds. Kelland L. R. and Farrell, N. P., Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, **2000**, pp. 3-35

Estos datos permitieron conocer tanto las especies, producto de la hidrólisis, presentes en disolución en condiciones fisiológicas, como su porcentaje.

Tras estos estudios, se ha concluido que la acuación del cisplatino conduce predominantemente a la formación de *cis*-[PtCl(¹⁵NH₃)₂(H₂O)]⁺, y se ha calculado que tras 30 horas en disolución dicha especie representa el 65% del total de platino, y que tan sólo un 23% permanece como cisplatino.

Hidrólisis de complejos *trans*-Pt^{II}

Al contrario de lo que sucede para el cisplatino, los estudios de hidrólisis de su isómero geométrico *trans* no han conseguido los mismos objetivos, debido a la existencia de discrepancias entre las publicaciones, probablemente consecuencia de la utilización en estos estudios de diferentes condiciones, y la aplicación de diferentes métodos y técnicas.^{84,85}

Por otro lado, en el estudio de hidrólisis de complejos *trans*-Pt^{II} con aminas alifáticas como ligandos, realizado en nuestro grupo de investigación, se obtuvieron sorprendentes resultados para el complejo *trans*-[PtCl₂(¹⁵NH₃)(¹⁵N-2-metilbutilamina)].⁸⁶ Este estudio puso de manifiesto que para este complejo no sólo se formaban las acuoespecies producto de la hidrólisis, sino que había presentes en disolución especies oxidadas. La actividad citotóxica de este complejo es comparable a la del cisplatino en algunas líneas celulares (Tabla A3-1), por lo que el comportamiento observado en disolución podría ser de gran relevancia para justificar la actividad antitumoral de este tipo de complejos.

Existen otros estudios de hidrólisis de complejos con geometría *trans*, como los del complejo *trans*-[PtCl₂(¹⁵NH₃)(¹⁵N-2-picolina)]⁸⁷ que se realizaron para su comparación con los de su isómero geométrico *cis*.⁸⁸ Los bajos valores de pK_a encontrados para la especie monoacuado de este complejo (5.35-5.55) implican que esta especie está presente esencialmente en su forma hidroxido en condiciones fisiológicas. En general, se ha comprobado que los complejos *trans* presentan un menor grado de acuación, a pesar de que el primer paso en la hidrólisis es relativamente rápido (t_{1/2} 1,5-7.5 h a 277 K).^{†,78} De esta comparación se ha

⁸⁴ Appleton, T. G.; Bailey, A. J.; Barnham, K. J.; Hall, J. R. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 3077

⁸⁵ Kankia, B. I.; Funck, T.; Marky, L. A. *Journal of Solution Chemistry.* **1999**, *28*, 1249

⁸⁶ Pizarro, A. M.; Munk, V. P.; Navarro-Ranninger, C.; Sadler, P. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5339

⁸⁷ McGowan, G.; Parsons, S.; Sadler, P. J. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7459

⁸⁸ Chen, Y.; Guo, Z.; Parsons, S.; Sadler, P. J. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 672

† t_{1/2} es el tiempo de vida media de una reacción y corresponde al tiempo que tardan en convertirse en productos la mitad de los reactivos

indicado, además, que la mayor velocidad de aciación debido al mayor efecto *trans* del Cl^- con respecto al NH_3 , tiene probablemente una influencia fundamental en la actividad antitumoral de los complejos *trans* en comparación con la de los *cis*.

De particular interés son también los estudios realizados para los complejos de fórmula general *trans*- $[\text{PtCl}_2\{E\text{-HN}=\text{C}(\text{OMe})\text{Me}\}_2]$ (*trans-EE*), compuestos que no sólo han demostrado ser mucho más citotóxicos que sus isómeros *cis*,⁸⁹ sino que incluso poseen actividad antitumoral *in vivo*.⁹⁰ Comparando la hidrólisis del *trans-EE* con la del cisplatino se observa que la constante de equilibrio del primer paso de hidrólisis es similar para ambos. Por el contrario, es un orden de magnitud menor para el transplatino.⁷⁶ Lo observado en este estudio apoya la hipótesis de que factores cinéticos determinan la diferente actividad entre complejos *cis* y *trans* de platino.

La relevancia biológica de estas investigaciones pone de manifiesto la importancia del estudio de la hidrólisis de los complejos que componen esta Tesis, ya que los resultados podrían ser analizados junto a la actividad citotóxica (resultados presentados en el Capítulo 3 de esta memoria).

Relación hidrólisis-conductividad

Ya hemos definido la velocidad de reacción como el modo en el que la concentración de algunas especies varía en función del tiempo.

Cuando la reacción es de primer orden la velocidad de reacción viene dada por el cambio en la concentración de un reactivo en un período de tiempo dado.

En cualquier reacción de primer orden, hay una relación lineal entre el $\ln[\text{reactivo}]$ o $\ln[\text{producto}]$ y el tiempo, como se puede ver en la ecuación 4.1. Por lo tanto, representando el $\ln[\text{reactivo}]$ o $\ln[\text{producto}]$ frente al tiempo obtendremos una recta cuya pendiente corresponderá a $\pm k$.

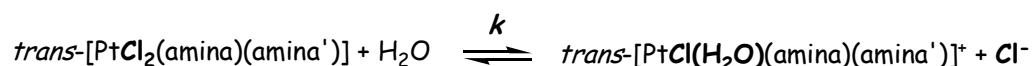
$$\ln[X] = \pm kt + C \quad (4.1)$$

Hay varias cuestiones importantes a la hora de diseñar experimentos para medir y determinar las constantes de velocidad. Por ejemplo, es necesario disponer de un método que distinga entre reactivos y productos. Otra de las cuestiones es cómo analizar los datos cinéticos para determinar las constantes de velocidad.

⁸⁹ Farrell, N. in *Metal Ions in Biological Systems*, ed. Sigel, H., Marcel Dekker Inc., New York, 1996, vol 32, pp. 603-639

⁹⁰ Natile, G.; Coluccia, M. in *Topics in Biological Inorganic Chemistry, Metallopharmaceuticals I*, eds. Clarke, M. J. and Sadler, P. J., Springer-Verlag, Berlin, 1999, pp 73-98

Teniendo en cuenta que en la acuación se produce la formación de especies cargadas en la disolución (acuoespecies) y la liberación de iones cloruro (reacciones de sustitución de un ligando cloro por un ligando acuo en el complejo) es posible su estudio mediante el seguimiento de la variación de la conductividad frente al tiempo, en la disolución acuosa de estos compuestos. De aquí que nos planteáramos la posibilidad de utilizar métodos electroquímicos para el estudio de la cinética de la hidrólisis de los complejos *trans*-Pt^{II} de esta Tesis.



Esquema 4.1 Esquema del primer paso de hidrólisis de los complejos *trans*-Pt^{II}

Basándonos en el esquema de hidrólisis 4.1, vemos como la conductimetría puede proporcionarnos información cualitativa. Por ejemplo, nos va a permitir realizar una comparación de la velocidad de acuación del primer paso de la hidrólisis de los complejos entre sí y con respecto al cisplatino, conocer el tiempo en el que estos complejos alcanzan una situación de equilibrio, y el grado de hidrólisis que experimentan en disolución

4.2 Experimental

4.2.1 Materiales

Los productos de partida utilizados para la síntesis de los compuestos fueron suministrados por Chambers Hispania, S.L. y Sigma-Aldrich, y son los siguientes: K_2PtCl_4 , ^{15}N -ftalimida potásica, hidracina hidratada, bromuro de isopropilo, cloruro de ^{15}N -metilamina y cloruro de ^{15}N -dimetilamina. KOH, NaOH, $AgNO_3$, $NaClO_4$, HCl 35% y $HClO_4$ 70% fueron suministrados por Sigma-Aldrich y Prolabo.

Los disolventes se purifican como se describe en la sección 3.2.1.

4.2.2 Instrumentación

4.2.2.1 Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear para la caracterización de los compuestos fueron registrados en los espectrómetros BRUKER AMX-300 (^{15}N 30.41 MHz) y DRX 500 (^{15}N 50.68 MHz). Para más detalles de estos equipos ver sección 3.2.2.2.

El registro de los espectros de RMN 1D 1H y 2D [1H , ^{15}N] HSQC para los estudios de hidrólisis se realizó en un espectrómetro BRUKER 600 MHz, con una sonda de detección inversa para triple resonancia TXI $^1H/^{13}C/^{15}N$ de 5 mm (1H 600.1 MHz, ^{15}N 60.8 MHz). Para la calibración del espectrómetro se utilizaron las siguientes referencias: 1,4-dioxano ($\delta(^1H)$ 3.76 ppm, interna) y $^{15}NH_4Cl$ (1.0 M en 1.0 M HCl en 10% D_2O /90% H_2O , $\delta(^{15}N)$ 0.0 ppm, externa).^{*91}

* Dado que existe la posibilidad de utilizar diferentes referencias en RMN de ^{15}N , comprobaremos como a pesar de obtener valores de $\delta(^{15}N)$ distintos en el estudio cinético de hidrólisis y en la caracterización de los complejos, estos datos están en concordancia teniendo en cuenta que existe una interrelación de $\delta(^{15}N)$ de 23.6 ppm entre las referencias NH_4Cl y el NH_3 líquido, que han sido las referencias utilizadas en cada caso

⁹¹ Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Yao, J.; Abildgaard, F.; Dyson, H. J.; Oldfield, E.; Markley, J. L.; Sykes, B. D. *J. Biomol. NMR.* **1995**, *6*, 135

4.2.2.2 Determinación de los valores de pK_a

Para la obtención de medidas de pH, en las valoraciones se utilizó un pHmetro Shindengen pH Boy-P2 (su19A) calibrado utilizando tampones estándar de pH 6.9 y 4.0. Para evitar la contaminación y variación de la concentración de Cl^- en el volumen de muestra, se tomaron alícuotas de 10 μL de la disolución y se llevaron al pHmetro para las mediciones. Los ajustes de pH se realizaron añadiendo cantidades a escala micromolar de disoluciones 0.1 M y 0.01 M de $HClO_4$ o $NaOH$.

4.2.2.3 Conductimetría

Para la determinación de la conductividad se empleó un Sensor de conductividad Pasport, con una sonda Pasco C1-6739 (10x). El software que se utilizó para la recogida y análisis de datos fue DataStudio (TM) 1.6.

Para las medidas de pH se utilizó un pHmetro HI991002 (Hanna instruments) el cual fue calibrado utilizando tampones estándar de pH 6.9 y 4.0 (Aldrich).

4.2.3 Métodos

4.2.3.1 Determinación de los valores de pK_a

Preparación de muestras

Se utilizaron dos métodos distintos en la preparación de las muestras para este estudio:

i) El compuesto se disolvió en 1 mL de una disolución 100 mM $NaClO_4$ al 90% $H_2O/10\%D_2O$ y 1,4-dioxano, para dar una concentración final de ~ 2 mM. La muestra fue incubada a 298 K durante 72 horas, tras las que se comenzó el registro de espectros de RMN 1D 1H y 2D [$^1H,^{15}N$] HSQC en un rango de pH entre 2-10. Dicho método se utilizó en algunos complejos para realizar la valoración de la especie monoacuo.

ii) La especie diacuo se obtuvo mediante metátesis con nitrato de plata, provocando así la hidrólisis del complejo de partida. Para ello se realizó la adición de 1.8 equivalentes de $AgNO_3$ sobre 1 mL de una disolución de complejo 100 mM $NaClO_4$ al 90% $H_2O/10\% D_2O$ y 10 μL de 1,4-dioxano, de concentración ~ 2 mM. Tras la incubación de la mezcla a 298 K durante 24 horas, se eliminó el $AgCl$ precipitado mediante centrifugación y se comenzó la adquisición de espectros

RMN 1D ^1H y [$^1\text{H},^{15}\text{N}$] HSQC en un rango de pH entre 2-10. Mediante este método se consiguió obtener al mismo tiempo en la disolución la especie monoacuo, lo que fue útil, en la mayoría de los casos, para realizar la valoración de ambas especies.

Análisis de datos para la determinación de los valores de $\text{p}K_a$

Las curvas de valoración de pH de las disoluciones de las acuo especies frente al desplazamiento químico, para la determinación de los valores de $\text{p}K_a$, fueron ajustadas según la metodología establecida⁹² utilizando las ecuaciones de Henderson-Hasselbalch (ecuaciones 4.2 y 4.3) y el programa Kaleidagraph.

$$\delta = (\delta_A [\text{H}^+] + \delta_B K_a) / ([\text{H}^+] + K_a) \quad (4.2)$$

$$\delta = (\delta_{AB} + \delta_{AA} [\text{H}^+] / K_{a1} + \delta_{BB} K_{a2} / [\text{H}^+]) / (1 + [\text{H}^+] / K_{a1} + K_{a2} / [\text{H}^+]) \quad (4.3)$$

En dichas ecuaciones K_a es la constante de disociación ácida para la especie monoacuo $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{amina})(\text{amina}')]^+$, K_{a1} y K_{a2} las de la especie diacuo $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{amina})(\text{amina}')]^{2+}$, δ el desplazamiento químico medido en el espectro y δ_A , δ_B , δ_{AA} , δ_{AB} y δ_{BB} los desplazamientos químicos límite de ^1H y/o ^{15}N de las especies $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{amina})(\text{amina}')]^+$, $[\text{PtCl}(\text{OH})(\text{amina})(\text{amina}')]$, $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{amina})(\text{amina}')]^{2+}$, $[\text{Pt}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{amina})(\text{amina}')]^+$ y $[\text{Pt}(\text{OH})_2(\text{amina})(\text{amina}')]$, respectivamente.

Estas ecuaciones se deducen teniendo en cuenta las ecuaciones 4.4 y 4.5 y los equilibrios ácido-base de las acuo especies indicados en el esquema 4.2.[‡]

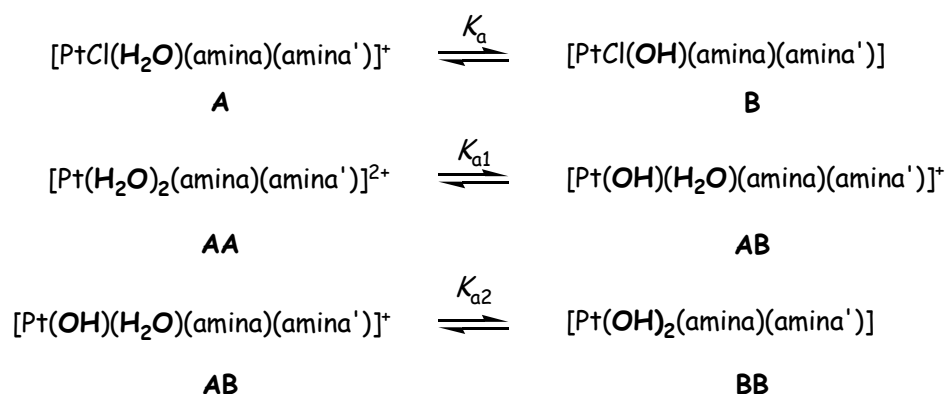
$$\delta = ([A] \delta_A + [B] \delta_B) / ([A] + [B]) \quad (4.4)$$

$$\delta = ([AB] \delta_{AB} + [AA] \delta_{AA} + [BB] \delta_{BB}) / ([AB] + [AA] + [BB]) \quad (4.5)$$

⁹² Appleton, T. G.; Hall, J. R.; Ralph, S. F.; Thompson, C. S. M. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 1989

[‡] Dado que la protonación/desprotonación de los ligandos acuo tiene lugar a una velocidad demasiado rápida en términos o escala de RMN, únicamente se observa una señal para los conjuntos de especies con ligandos acuo y/o hidroxilo $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{amina})(\text{amina}')]/[\text{PtCl}(\text{OH})(\text{amina})(\text{amina}')]$ y $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{amina})(\text{amina}')]^{2+}/[\text{Pt}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{amina})(\text{amina}')]+/[\text{Pt}(\text{OH})_2(\text{amina})(\text{amina}')]$. Por lo tanto, el desplazamiento químico para estos dos conjuntos de especies sólo se mantiene constante en los rangos de pH entre 0-4 (donde la valoración no se ha producido todavía) y entre 9-14 (en el que la valoración ha tenido ya lugar), sin embargo, en el rango de pH entre 4-9 el desplazamiento químico es muy sensible a los cambios de pH

Estudios de hidrólisis



Esquema 4.2 Esquema general de los equilibrios ácido-base de las acuoespecies de complejos de Pt^{II}

4.2.3.2 Estudios de cinética

Preparación de muestras

Las muestras de RMN para el estudio cinético de hidrólisis fueron preparadas en 490 μL de una disolución 100 mM NaClO_4 al 90% H_2O /10% D_2O con 10 μL de 1,4-dioxano con una concentración final de complejo entre ~2-2.7 mM, comenzándose de manera inmediata la adquisición de espectros de RMN ^1H y 2D [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$] HSQC durante un período de entre 64-68 horas.

Análisis de datos y cálculo de constantes de hidrólisis

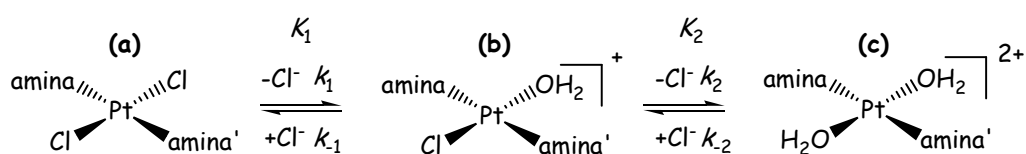
Para la obtención de las constantes de acuación-anación y equilibrio se realizó el seguimiento durante unas 64-68 horas de la variación de las señales en los espectros de RMN 2D [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$] HSQC.⁹ De la integración de las señales se obtuvo la relación de concentración de cada una de las especies del compuesto presentes en disolución.⁵

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis cinético utilizando un esquema general de ecuaciones de hidrólisis basado en el conocido del cisplatino

⁹ Los valores de pH a los que se llevaron a cabo los estudios de cinética fueron aquellos en los que, o bien no se producía solapamiento de señales en los espectros, o dichos solapamientos eran fácilmente identificables, permitiendo obtener el cálculo de las integrales

⁵ Tanto en los estudios de cinética, como en la determinación de pK_a , se siguieron las señales de los grupos $^{15}\text{NHR}_2$ cuyo análisis no se vio dificultado por el solapamiento con otras señales

(Esquema 4.3), y el programa Scientist (Version 2.01, MicroMath). Los modelos cinéticos utilizados en estos estudios (M1 y M2) pueden encontrarse en el Apéndice de esta memoria.



Esquema 4.3 Esquema general hipotético de hidrólisis para los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')]

4.2.3.3 Conductimetría

Preparación de muestras

Los compuestos fueron disueltos en 20 mL de H₂O (purificada mediante un sistema Milli-Ro Milli-Q de Millipore) para dar una concentración final de ~2 mM de platino, comenzándose de manera inmediata la medida de la conductividad de las disoluciones a 298 K y pH 6.

4.2.4 Síntesis

¹⁵N-isopropilamina

A una suspensión de ¹⁵N-ftalimida potásica (2 g; 10.74 mmol) en 44 mL de DMF (recién destilada sobre hidruro cálcico) bajo atmósfera inerte (de argón), se le añade un equivalente de bromuro de isopropilo (1,12 mL; 10.74 mmol). La mezcla en agitación se deja reaccionar durante 4 días a 200°C. Tras enfriar a 0°C, se filtra para eliminar la ¹⁵N-ftalimida potásica sin reaccionar, y de la disolución naranja obtenida se elimina la DMF a vacío. Sobre la imida formada se adiciona un equivalente de NH₂NH₂·H₂O (532 μL; 10.74 mmol) y 976 μL de metanol. La mezcla se calienta sobre vapor de agua durante 1 hora y en este proceso se forma un sólido blanco. Tras la adición de 3.22 mL de H₂O se elimina el MeOH a vacío y se añaden 4.88 mL de HCl concentrado, dejando reaccionar la mezcla durante 1 hora a 100°C. Se enfría la mezcla en baño de hielo y se filtra para eliminar la ftalazina-1,4-diona precipitada, obteniéndose así una disolución amarilla que se reduce hasta sequedad. El sólido obtenido (cloruro de ¹⁵N-isopropilamina) es de color amarillo, y el rendimiento de la reacción es del 48% (basado en la ftalimida potásica de partida).

Para la obtención de la ^{15}N -isopropilamina libre se realiza una hidrólisis básica, añadiendo un equivalente de hidróxido potásico sobre el clorhidrato de la amina, disuelto éste en la mínima cantidad de agua que, posteriormente, se elimina mediante destilación (p.e. isopropilamina pura 34°C).

***cis*-[PtCl₂(^{15}N -dimetilamina)₂]**

A una suspensión de K_2PtCl_4 (188.5 mg; 0.445 mmol) en THF, se le añaden 4 equivalentes de cloruro de ^{15}N -dimetilamina (150 mg; 1.78 mmol). La mezcla se pone en agitación a temperatura ambiente y oscuridad. Sobre dicha mezcla se añaden 377 μL de una disolución de KOH (99.93 mg; 1.78 mmol) en una relación estequiométrica 1:1 con respecto al cloruro de ^{15}N -dimetilamina. Cuando la adición ha terminado, la reacción se mantiene a temperatura ambiente, oscuridad y agitación 14 horas más, durante las cuales se produce la precipitación de un sólido amarillo. Se filtra el precipitado, se lava con agua y cloroformo y se seca a vacío.

cis-[PtCl₂(^{15}N -dma)₂], sólido amarillo. Rendimiento 56%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 13.7; H, 3.9; N, 7.9. Calculado para $\text{C}_4\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$: C, 13.5; H, 4.0; N, 7.9. δ_{H} (300.13 MHz; DMSO- d_6) 2.47 (6 H, d, CH₃), 5.64 (1 H, dsp, J_{HH} 5.5; J_{HN} 73.8, ^{15}NH); δ_{NH} (50.68 MHz; 500.13 MHz; DMSO- d_6 , liq. NH₃) -29.53, 5.65 (J_{NPt} 368.4, J_{HPt} 69.8); δ_{CH} (125.76 MHz; 500.13 MHz; DMSO- d_6) 43, 2.5.

***cis*-[PtCl₂(^{15}N -isopropilamina)₂]**

A una suspensión de K_2PtCl_4 (599 mg; 1.44 mmol) en una mezcla de THF-H₂O, se le añaden 4 equivalentes de ^{15}N -isopropilamina (500 μL ; 5.7 mmol) recién destilada. La mezcla se pone en agitación a temperatura ambiente y oscuridad durante 48 horas, se produce un precipitado amarillo que se filtra, se lava con agua, cloroformo y se seca a vacío.

cis-[PtCl₂(^{15}N -ipa)₂], sólido amarillo. Rendimiento 15%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 19.2; H, 4.7; N, 7.3. Calculado para $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$: C, 18.75; H, 4.7; N, 7.3. δ_{H} (300.13 MHz; DMSO- d_6) 1.08 (6 H, d, J_{HH} 6.3, CH₃), 2.97 (1 H, sp, J_{HH} 6.4, CH) 4.63 (2 H, dd, J_{HH} 6.4, J_{HN} 71.3, $^{15}\text{NH}_2$); δ_{NH} (50.68 MHz; 500.13 MHz; DMSO- d_6 , liq. NH₃) -2.89, 4.63 (J_{NPt} 338.5); δ_{CH} (125.76 MHz; 500.13 MHz; DMSO- d_6) 23.5, 1.2 (CH₃), 47.0, 3.1 (CH).

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-isopropilamina)(¹⁵N-metilamina)] (¹⁵N-1)**

A una suspensión de *cis*-[PtCl₂(¹⁵N-*ipa*)₂] (65.4 mg; 0.16 mmol) en H₂O (1.6 mL), se le añaden 20 equivalentes de cloruro de ¹⁵N-metilamina (236.8 mg, 3.38 mmol). La mezcla se pone en agitación a temperatura ambiente y oscuridad. Sobre dicha mezcla se añade una disolución de KOH (3.38 mmol) para mantener una relación 1:1 con el cloruro de ¹⁵N-metilamina. Cuando la adición ha terminado, se mantiene en un baño a 40°C, oscuridad y agitación hasta obtener una disolución incolora. La disolución se deja enfriar a temperatura ambiente y se filtra. A esta disolución se le añaden 13 equivalentes de HCl 35% (184 µL; 2.08 mmol) y la mezcla se pone a reflujo durante 24 horas. La disolución amarilla resultante se enfría en baño de hielo. Se produce un precipitado amarillo que se filtra, se lava con agua fría y se seca a vacío.

trans-[PtCl₂(¹⁵N-*ipa*)(¹⁵N-*ma*)], sólido amarillo. Rendimiento 50%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 13.6; H, 3.9; N, 7.8. Calculado para C₄H₁₄N₂Cl₂Pt: C, 13.5; H, 4.0; N, 7.9. δ_H(300.13 MHz; CDCl₃) 1.33 (6 H, d, J_{HH} 6.34, CH₃-*ipa*), 2.56 (3 H, t, J_{HH} 6.2, CH₃-*ma*), 3.31 (1 H, sp, J_{HH} 6.25, CH) 3.43 (4 H, m, J_{HH} 6, J_{HN} 72.1, ¹⁵NH₂-*ipa* y ¹⁵NH₂-*ma*); δ_{Pt}(64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2193 (dd, J_{PtN} 293.5, J_{PtN} 291.9); δ_{NH}(50.68 MHz; 500.13 MHz; CDCl₃, liq. NH₃) -36.0, 3.44 (¹⁵NH₂-*ma*), 1.2, 3.43 (¹⁵NH₂-*ipa*); δ_N(50.68 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -36.0 (d, J_{NPt} 284.7, J_{NN} 5, ¹⁵NH₂-*ma*), 1.24 (d, J_{NPt} 295.2, J_{NN} 5, ¹⁵NH₂-*ipa*).[‡]

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-dimetilamina)(¹⁵N-metilamina)] (¹⁵N-2)**

A una suspensión de *cis*-[PtCl₂(¹⁵N-*dma*)₂] (88.6 mg; 0.25 mmol) en H₂O (586 µL), se le añaden 20 equivalentes de cloruro de ¹⁵N-metilamina (345.9 mg, 4.94 mmol). La mezcla se pone en agitación a temperatura ambiente y oscuridad. Sobre dicha mezcla se añade una disolución de KOH (4.94 mmol) para mantener una relación 1:1 con el cloruro de ¹⁵N-metilamina. La adición de la disolución de KOH se realiza lentamente. Cuando la adición ha terminado, la reacción se pone en baño a 40°C y se mantiene en la oscuridad y agitación hasta obtener una disolución incolora. La disolución se deja enfriar a temperatura ambiente y se filtra. A esta disolución se le añaden 13 equivalentes de HCl 35% (287 µL; 3.25 mmol) y la mezcla se pone a reflujo durante 24 horas. La disolución

[‡] Debido al solapamiento en los espectros de RMN 1D ¹H de las señales de los grupos ¹⁵NH₂ de ambas aminas, para la caracterización del compuesto se registró el espectro 2D [¹H,¹⁵N] HSQC-¹H,¹H TOCSY que nos proporcionó información útil para la asignación de estas señales en los espectros RMN 2D [¹H,¹⁵N] HSQC y 1D ¹⁵N INEPT. Así, pudimos asignar la señal con un δ(¹⁵N) de -35.95 y -35.89 ppm como perteneciente al grupo ¹⁵NH₂ de la metilamina, en los espectros 2D [¹H,¹⁵N] HSQC y 1D ¹⁵N INEPT respectivamente, mientras que la señal de δ(¹⁵N) de 1.18 y 1.23 ppm, se asignó al grupo ¹⁵NH₂ de la isopropilamina

amarilla resultante se enfría en baño de hielo. Se produce un precipitado amarillo que se filtra, se lava con agua fría y se seca a vacío.

trans-[PtCl₂(¹⁵N-dma)(¹⁵N-ma)], sólido amarillo. Rendimiento 58%. Análisis elemental CHN, encontrado: C, 10.35; H, 3.4; N, 8.2. Calculado para C₃H₁₂N₂Cl₂Pt: C, 10.5; H, 3.3; N, 8.2. δ_H(300.13 MHz; CDCl₃) 2.60 (6 H, d, J_{HH} 6, CH₃-dma), 2.49 (3 H, t, J_{HH} 6.4, CH₃-ma), 3.13 (1 H, dsp, J_{HH} 6.4, J_{HN} 72.9, ¹⁵NH), 3.76 (2 H, dc, J_{HH} 6, J_{HN} 73.2, ¹⁵NH₂); δ_{Pt}(64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2210 (dd, J_{PtN} 300.5, J_{PtN} 274.3); δ_{NH}(50.68 MHz; 500.13 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -28.7, 3.73 (¹⁵NH), -38.6, 3.10 (¹⁵NH₂); δ_N(30.41 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -28.7 (d, J_{NPt} 303.5, J_{NN} 5.3, ¹⁵NH), -38.6 (d, J_{NPt} 268, J_{NN} 5.3, ¹⁵NH₂).

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-dimetilamina)(¹⁵N-isopropilamina)] (¹⁵N-3)**

A una suspensión de *cis*-[PtCl₂(¹⁵N-dma)₂] (67.3 mg; 0.19 mmol) en H₂O (673 μL), se le añaden 16 equivalentes de ¹⁵N-isopropilamina (67 μL, 0.75 mmol) recién destilada. La mezcla se pone en agitación a 70°C durante 48 horas hasta la obtención de una disolución incolora. Dicha disolución se enfría a temperatura ambiente y se filtra. Posteriormente se le añaden 12 equivalentes de HCl 35% (200 μL; 2.28 mmol), y la mezcla se pone a reflujo durante 17 horas. La disolución amarilla resultante se enfría en baño de hielo y se produce un precipitado amarillo que se filtra, se lava con agua fría y se seca a vacío.

trans-[PtCl₂(¹⁵N-dma)(¹⁵N-ipa)], sólido amarillo.[§] δ_H(300.13 MHz; CDCl₃) 1.37 (6 H, d, J_{HH} 6.42, CH₃-ipa), 2.72 (6 H, d, J_{HH} 6.22, CH₃-dma), 3.34 (1 H, sp, J_{HH} 6.5, CH) 3.19 (2 H, dd, J_{HH} 6.85, J_{HN} 70.8, ¹⁵NH₂-ipa), 3.88 (1 H, dsp, J_{HH} 6, J_{HN} 73.5, ¹⁵NH-dma); δ_{Pt}(64.53 MHz; CDCl₃; Na₂PtCl₆) -2215; δ_{NH}(50.68 MHz; 500.13 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -27.52, 3.84 (¹⁵NH), -0.24, 3.15 (¹⁵NH₂); δ_N(50.68 MHz; CDCl₃; liq. NH₃) -27.52 (d, J_{NN} 5.1, ¹⁵NH), -0.25 (d, J_{NN} 5.2, ¹⁵NH₂).

§ Este compuesto presentaba señales correspondientes a pequeñas impurezas; sin embargo, la presencia de éstas no impidieron realizar los estudios de hidrólisis

4.3 Resultados y discusión

Dado que uno de los objetivos principales de esta investigación es estudiar la hidrólisis de los complejos *trans*-Pt^{II} utilizando la Resonancia Magnética Nuclear 2D [¹H,¹⁵N] HSQC, se realizó la síntesis, purificación y caracterización estructural de los siguientes complejos con aminas alifáticas marcadas con ¹⁵N: *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-*ipa*)(¹⁵N-*ma*)] ¹⁵N-1, *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-*dma*)(¹⁵N-*ma*)] ¹⁵N-2 y *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-*dma*)(¹⁵N-*ipa*)] ¹⁵N-3.

Previamente se sintetizó la ¹⁵N-isopropilamina marcada y los complejos *cis*-[PtCl₂(¹⁵N-*dma*)₂] y *cis*-[PtCl₂(¹⁵N-*ipa*)₂].

4.3.1 Síntesis

4.3.1.1 ¹⁵N-isopropilamina

La síntesis de la ¹⁵N-isopropilamina se realizó siguiendo la metodología descrita, basada en la de Gabriel,^{93,94} que permite la alquilación controlada de aminas primarias. Para ello se emplea como reactivo nucleófilo la sal potásica de la ftalimida, que evita las alquilaciones múltiples que se producen cuando el amoniaco reacciona con halogenuros de alquilo.

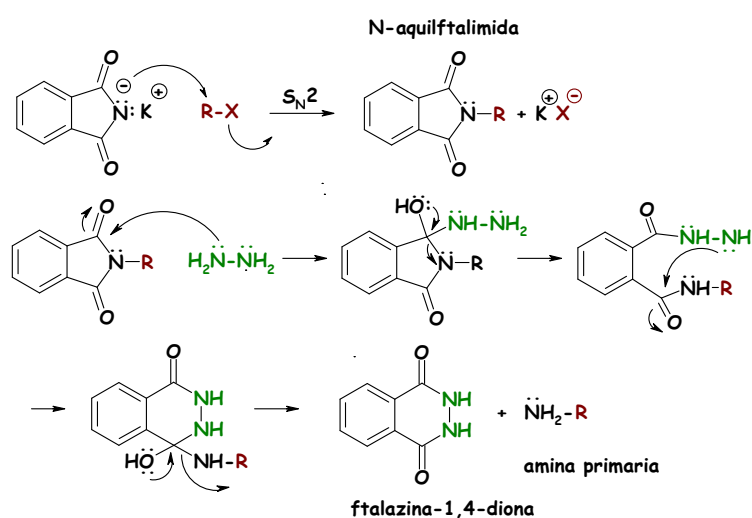


Figura 4.2 Esquema de la síntesis de Gabriel

⁹³ Gabriel, S. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20*, 2224

⁹⁴ Gibson, M. S.; Bradshaw, R. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, *7*, 919

La ftalimida es bastante ácida (pK_a 9) y se puede convertir en su sal potásica mediante reacción con hidróxido potásico. El resultado de esta reacción ácido-base es la formación del anión ftalimida, que es un buen nucleófilo. La reacción S_N2 con halogenuros de alquilo genera una *N*-alquilftalimida. Dicha *N*-alquilftalimida se puede hidrolizar con ácido o con base, aunque la hidrólisis es a menudo difícil. Por ello, es más conveniente tratar la *N*-alquilftalimida con hidrazina (NH_2NH_2) en metanol, lo que lleva a la obtención de la amina primaria y la ftalazina-1,4-diona (Figura 4.2).

4.3.1.2 Compuestos *cis*- y *trans*-[^{15}N -Pt^{II}]

El complejo *cis*-[PtCl₂(^{15}N -dma)₂] se preparó a partir de K₂PtCl₄ con la adición de 4 equivalentes del cloruro de la ^{15}N -dimetilamina y tratando la mezcla con una disolución de base KOH, para liberar la ^{15}N -dimetilamina en el medio de reacción. El complejo *cis*-[PtCl₂(^{15}N -ipa)₂] se sintetizó por el método descrito anteriormente,⁶² con la utilización en este caso de la ^{15}N -isopropilamina sintetizada previamente.

Los complejos *cis*-[PtCl₂(^{15}N -dma)₂] y *cis*-[PtCl₂(^{15}N -ipa)₂] constituyeron los reactivos de partida para la síntesis de los complejos *trans*-[^{15}N -Pt^{II}]: ^{15}N -1, ^{15}N -2 y ^{15}N -3. En la síntesis del complejo ^{15}N -1 se siguió básicamente la misma metodología descrita para el complejo 1 (Capítulo 3). En el caso específico de los complejos ^{15}N -2 y ^{15}N -3 se realizó inicialmente *in situ* una hidrólisis básica, añadiendo una disolución de hidróxido potásico en una cantidad estequiométrica con respecto al ^{15}N -clorhidrato de la amina, para conseguir la liberación de la amina en el medio de reacción. Posteriormente, la síntesis se desarrolla a través de las etapas ya descritas (Capítulo 3), en las que se producen los mecanismos de sustitución asociativos.

4.3.2 Caracterización por RMN de los compuestos *cis*- y *trans*-[^{15}N -Pt^{II}]

La caracterización de los complejos marcados se realizó por RMN 1D 1H , ^{15}N , ^{195}Pt y 2D [1H , ^{15}N] HSQC. A continuación y a modo de ejemplo se describen algunos espectros para la caracterización del complejo ^{15}N -1.

Los hidrógenos amínicos se acoplan con el ^{15}N dando lugar a dobletes para los grupos ^{15}NH con una constante $^1J_{HN}$ de 72.1 Hz (Figura 4.3). En el espectro RMN 1D 1H del complejo ^{15}N -1 los grupos $^{15}NH_2$ de la isopropilamina y dimetilamina tienen un $\delta(^1H)$ similar, por lo que se produce un solapamiento de señales que hace imposible su análisis y por consiguiente su asignación en el espectro monodimensional (Figura 4.3).

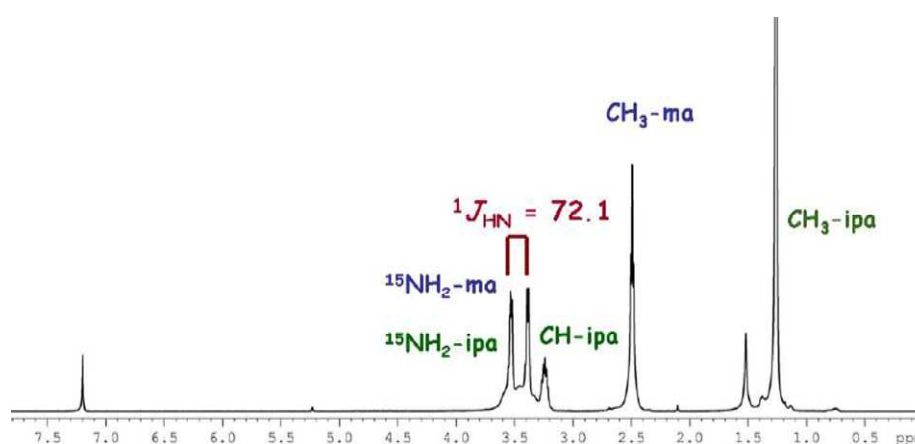


Figura 4.3 Espectro de RMN de ^1H del complejo $^{15}\text{N-1}$ en CDCl_3

En el espectro RMN 2D [^1H , ^{15}N] HSQC las señales de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ de ambas aminas aparecen en regiones de $\delta(^{15}\text{N})$ claramente diferenciadas; sin embargo, para su definitiva asignación fue necesario registrar el espectro RMN 2D HSQC-TOCSY. Este último experimento permite realizar las conexiones entre los protones de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ con los de su cadena alifática (CH y/o CH_3). El análisis del espectro hizo posible resolver sin ninguna ambigüedad la asignación de las señales de los grupos como se muestra en la Figura 4.4.

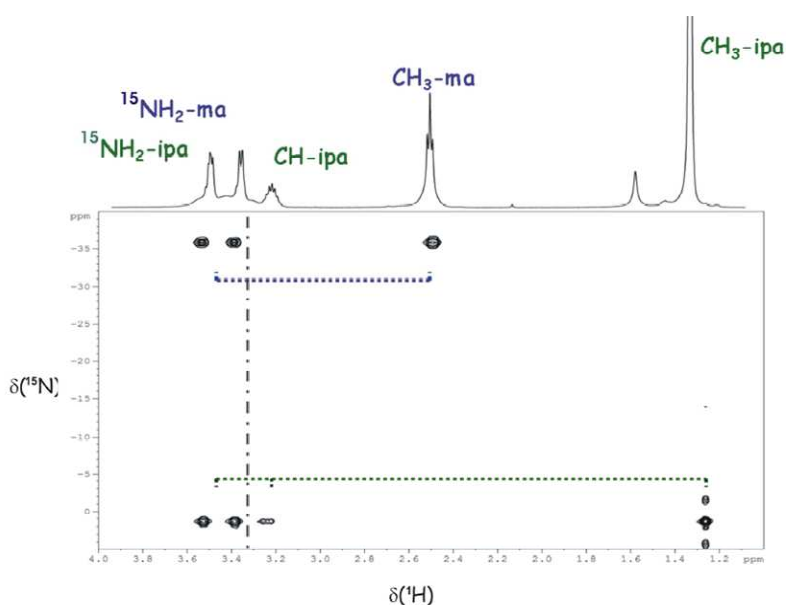


Figura 4.4 Espectro de RMN 2D HSQC-TOCSY del complejo $^{15}\text{N-1}$ en CDCl_3

De los espectros de RMN de ^{195}Pt y las constantes de acoplamiento, como hemos mencionado con anterioridad, obtenemos información del estado de oxidación y entorno del platino.

En el caso concreto del acoplamiento $^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N}$, se sabe que las constantes dependen del carácter *s* de los orbitales que el átomo de platino utiliza en su unión al átomo de N, y que varían con la naturaleza del ligando en posición *trans* al ligando amina.^{95,96} En general, se esperan $^1\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$ menores para ligandos nitrogenados en *trans* a ligandos con gran efecto *trans* como consecuencia del debilitamiento del enlace del primero. Esto justifica y está de acuerdo con los valores de $^1\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$ obtenidos para los complejos ^{15}N -*trans* en comparación con los publicados del cisplatino.⁹⁷ La dependencia de los valores de $^1\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$ con respecto al ligando en *trans* queda reflejada en los datos medidos para el complejo *cis*- $\text{Pt}^{\text{II}}-\text{NH}_3$ que se muestran en la Tabla 4.3. Los valores de $^1\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$ están en un rango de 150-350 Hz.

Tabla 4.3 Dependencia de los valores de $^1\mathcal{J}(^{15}\text{N}-^{195}\text{Pt})$ con respecto al ligando en *trans* para complejos *cis*- $[\text{Pt}(^{15}\text{NH}_3)_2\text{Z}_2]^{\text{m}+}$

Ligando Z en trans	$^1\mathcal{J}(^{15}\text{N}-^{195}\text{Pt})$, Hz ^a	ref
H ₂ O	391	98
Cl ⁻	326	99
NH ₃	299	92
OH ⁻	293	98
tiourea	237	99

^a Espectros registrados en H₂O

Debido precisamente al acoplamiento del ^{195}Pt con los grupos $^{15}\text{NH}_2$ de la isopropilamina y metilamina (Figura 4.5), el espectro de ^{195}Pt -RMN del complejo $^{15}\text{N}-1$ se presenta como un doblete de dobletes con dos $^1\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$ (Figura 4.6).

⁹⁵ Ismail, I. M.; Sadler, P. J. *ACS Symp. Ser.* **1983**, 209, 171

⁹⁶ Barton, S. J.; Barnham, K. J.; Habtemariam, A.; Sue, R. E.; Sadler, P. J. *Inorg. Chim. Acta.* **1998**, 273, 8

⁹⁷ Pregosin, P. S. *Coord. Chem. Rev.* **1982**, 44, 247

⁹⁸ Appleton, T. G.; Berry, R. D.; Davis, C. A.; Hall, J. R.; Kimlin, H. A. *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 3514

⁹⁹ Appleton, T. G.; Hall, J. R.; Ralph, S. F. *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 4685

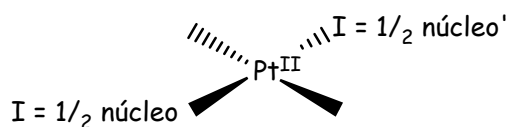


Figura 4.5 Complejo plano cuadrado de platino con dos núcleos activos en posición *trans*

A pesar de observarse las dos $^1J(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$ en el espectro de RMN de ^{195}Pt , los valores son muy semejantes para ^{15}N -*ipa* y ^{15}N -*ma*, y esto hizo imposible su cálculo sin riesgo a dar valores poco precisos.

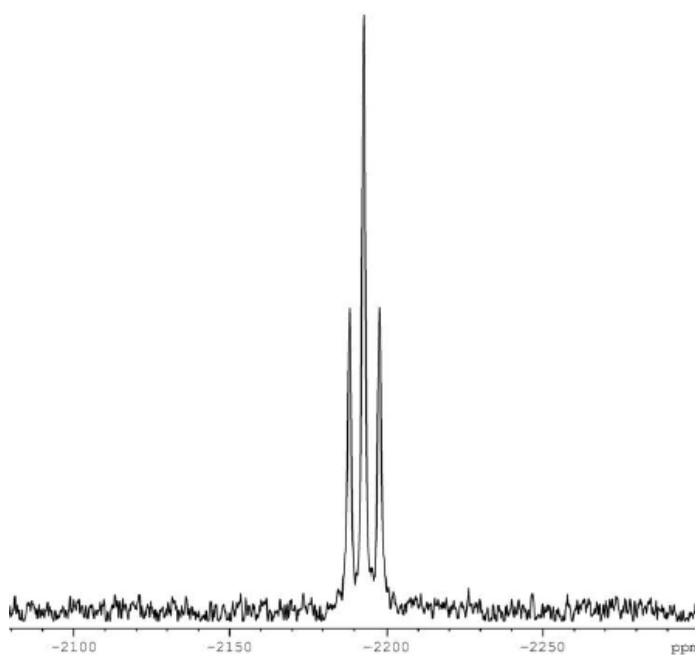


Figura 4.6 Espectro de RMN de ^{195}Pt en CDCl_3 del complejo ^{15}N -1

Las constantes pueden ser obtenidas también en los espectros de RMN de ^{15}N por lo que para su obtención se registraron los espectros de RMN de ^{15}N .^{100,101} En estos complejos las señales del ^{15}N aparecen en sus espectros flanqueadas por

¹⁰⁰ Pregosin, P. S.; Omura, H.; Venanzi, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2047

¹⁰¹ Appleton, T. G.; Hall, J. R.; Ralph, S. F. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 4685

satélites debido al acoplamiento con el núcleo de ^{195}Pt ,[‡] lo que permite la obtención de las $^1J(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$ y comprobar su similitud.

Así, las constantes de $^1J(^{15}\text{N}-^{195}\text{Pt})$ obtenidas para los complejos $^{15}\text{N-1}$ (295.2 y 284.7 MHz) (Figura 4.7) y $^{15}\text{N-2}$ (303.5 y 268 MHz) están dentro del rango esperado para un grupo $^{15}\text{NHR}_2$ en *trans* a un átomo de nitrógeno (Tabla 4.3).^{*} Para el complejo $^{15}\text{N-3}$ no pudieron obtenerse las constantes a través de este espectro, ya que no se observaron los satélites.

Adicionalmente, en estos espectros se observa que las señales de los núcleos ^{15}N son dobletes con una $^2J(^{15}\text{N}-^{15}\text{N})$ de 5 Hz (Figura 4.7). No hemos podido comparar este dato con otros bibliográficos, puesto que no hemos encontrados datos publicados de $^2J(^{15}\text{N}-^{15}\text{N})$ en este tipo de complejos, con los que contrastar estos valores.

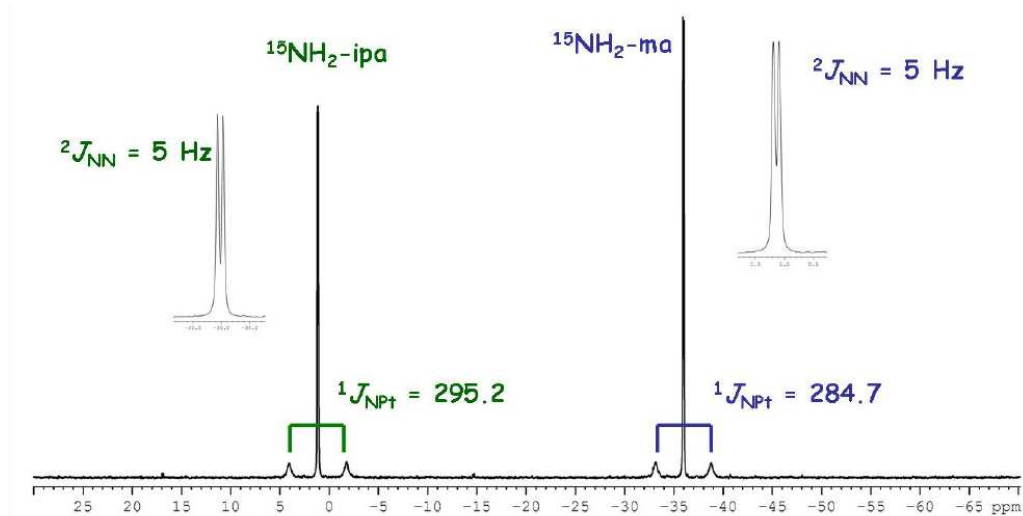


Figura 4.7 Espectro de RMN de ^{15}N del complejo $^{15}\text{N-1}$ en CDCl_3

4.3.3 Estudios de hidrólisis

Alcanzado el objetivo inicial de la síntesis de complejos *trans* con aminas alifáticas que contienen el isótopo ^{15}N como marcador, llevamos a cabo el estudio

[‡] abundancia natural del ^{195}Pt 33.8%

^{*} aunque los valores de $^1J(^{15}\text{N}-^{195}\text{Pt})$ de nuestros complejos *trans*- $^{15}\text{N-Pt}^{\text{II}}$ han sido medidos en espectros registrados en CDCl_3 , se puede realizar la comparación con los apuntados en la Tabla 4.3, puesto que estas constantes no se ven afectadas por el disolvente utilizado

del comportamiento en disolución acuosa de estos complejos de platino bajo condiciones fisiológicas.

4.3.3.1 Asignación de señales y determinación de los valores de pK_a

Para comenzar el estudio de hidrólisis nos basamos inicialmente en el esquema general basado en la hidrólisis del cisplatino⁴⁸ (Esquema 4.3). Los complejos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-amina)(¹⁵N-amina')], presentan en RMN 2D [¹H,¹⁵N] HSQC señales correspondientes a los grupos ¹⁵NHR₂ (R = H ó cadena alifática) para cada una de las especies (dicloro, monoacuo y diacuo) presentes en disolución.

El primer paso por tanto, para poder llevar a cabo el estudio de la cinética de hidrólisis, fue la identificación inequívoca de las señales de las especies en los espectros. Para ello se realizaron las valoraciones de las disoluciones de los complejos, ya que el desplazamiento químico de las señales se ve afectado por la variación de pH de manera distinta dependiendo de la especie a la que correspondan. Por ejemplo, cuando en el complejo el ligando cloro es sustituido por un ligando acuo, el entorno del platino se ve afectado y esto se detecta en el desplazamiento químico de los grupos ¹⁵N-H en posición *cis* al ligando involucrado.

Para asignar las especies acuo, se forzaron las condiciones de hidrólisis mediante metátesis con sales de plata (o por incubación en H₂O a 298K). En general, en dichas disoluciones se encontraba presente también la especie dicloro inicial sin reaccionar, lo que resultó muy útil para la asignación de todas las especies. Y así, además, se obtiene una concentración de acuo especies en disolución suficiente para el seguimiento de sus señales en los espectros.

Una vez preparadas las muestras, la modificación del pH, y posterior adquisición de los espectros 2D [¹H,¹⁵N] HSQC, permitió reconocer y diferenciar las distintas especies (acuo e hidrox) de cada compuesto mediante la representación de la variación del $\delta(^1\text{H})$ y/o $\delta(^{15}\text{N})$ de las señales de los grupos ¹⁵N-H frente al pH (Figura 4.8).

Dicha asignación se realizó basándonos en que:

- i) La señal correspondiente a la especie dicloro no mostraría cambios en su desplazamiento químico al modificarse el pH.
- ii) La señal asignable a la especie monoacuo presentaría una curva de desplazamiento químico frente al pH en la que se observaría un punto de inflexión debido a la desprotonación/protonación de la molécula de agua.

iii) Finalmente, la misma representación para la especie diacuo daría lugar a una curva con dos puntos de inflexión, indicativos de la desprotonación/protonación de los dos ligandos acuo (Figura 4.8).

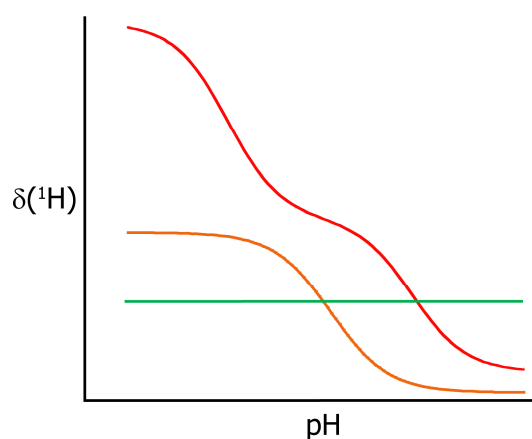


Figura 4.8. Diagrama general de la variación del $\delta(^1\text{H})$ de las señales de los grupos $^{15}\text{N-H}$ para cada especie durante su valoración. Asignaciones: especies dicloro (-), monoacuo (-) y diacuo (-)

En estos estudios y para la determinación de los valores de pK_a puede utilizarse tanto el desplazamiento químico de ^1H como el de ^{15}N . Sin embargo, los datos derivados de los $\delta(^{15}\text{N})$ son menos precisos para el cálculo de los valores de pK_a debido a la menor resolución de los espectros en esta dimensión.

A continuación, se describe con detalle cada complejo durante la valoración.

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-isopropilamina)(¹⁵N-metilamina)] (¹⁵N-1)**

Las señales de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ de la isopropilamina y metilamina aparecen en regiones bien diferenciadas en el espectro de RMN 2D [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$] HSQC, y no se producen solapamientos con la señal residual de agua, por lo que ambas fueron analizadas durante la valoración. Las dos curvas en la Figura 4.9 ambas, con un punto de inflexión, representan la variación del $\delta(^1\text{H})$ de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ en la especie monoacuo (**1b-ipa** y **1b-ma**).

De forma análoga, la variación del $\delta(^1\text{H})$ frente al pH de las señales de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ de la especie diacuo (**1c-ipa** y **1c-ma**) está representada en la Figura 4.9, y corresponde a las curvas con dos puntos de inflexión.

Con esta información, y para un pH de 4.8 el espectro del complejo $^{15}\text{N-1}$ se presenta en la Figura 4.9, donde se muestran las asignaciones realizadas.

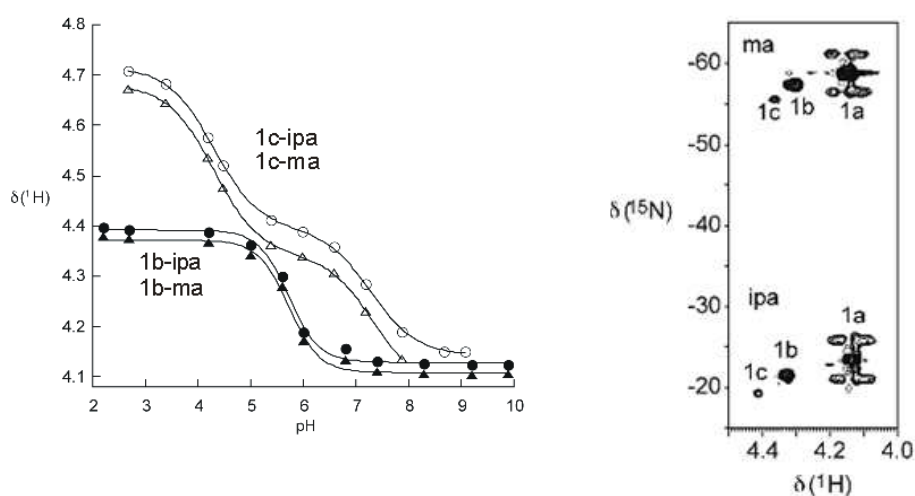


Figura 4.9. Variación del desplazamiento químico $\delta(^1\text{H})$ de las señales de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ -ipa y -ma en la valoración de las acuoespecies, y espectro de RMN 2D [$^1\text{H},^{15}\text{N}$] HSQC del complejo $^{15}\text{N-1}$ a pH 4.8. Asignaciones: especies dicloro (1a), monoacuo (1b) y diacuo (1c)

***trans*-[PtCl₂(^{15}N -dimetilamina)(^{15}N -metilamina)] ($^{15}\text{N-2}$)**

En este complejo debido a la proximidad de la señal del grupo ^{15}NH de la dimetilamina con la señal residual del agua, durante la valoración se produjeron solapamientos que no hicieron viable el análisis de esta señal para la especie diacuo, por lo que solamente se analizó la del grupo $^{15}\text{NH}_2$ de la metilamina (2c-ma). Sin embargo, el seguimiento de la valoración de la especie monoacuo (2b-ma y 2c-dma) pudo realizarse para ambos grupos. En la Figura 4.10 están representadas las curvas obtenidas durante la valoración.

Una vez realizado el análisis de dicha valoración se asignaron las señales. En la Figura 4.10 se muestra el espectro del complejo $^{15}\text{N-2}$ a pH 4.8.

Estudios de hidrólisis

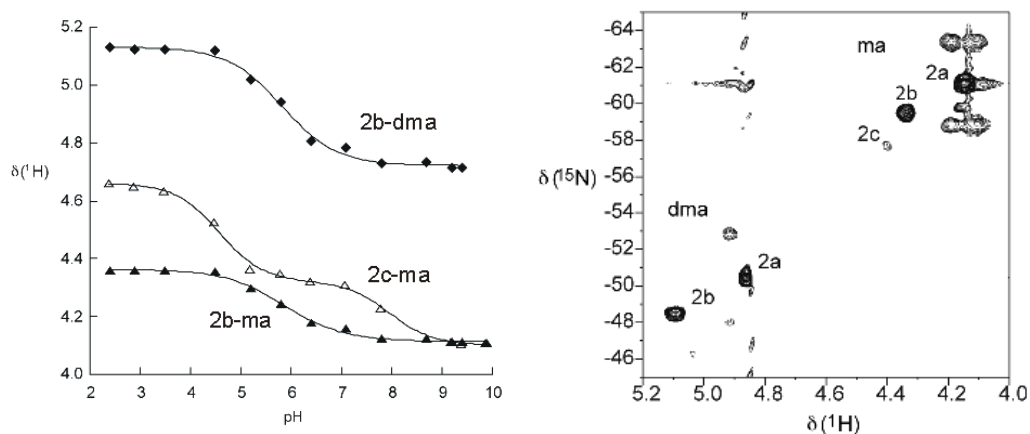


Figura 4.10 Variación del desplazamiento químico $\delta(^1\text{H})$ de las señales de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ -ma y ^{15}NH -dma en la valoración de las acuoespecies, y espectro de RMN 2D [^1H , ^{15}N] HSQC del complejo ^{15}N -2 registrado a pH 4.8. Asignaciones: especies dicloro (2a), monoacuo (2b) y diacuo (2c)

Como se ha comentado, este tipo de estudios puede realizarse también por la observación de las variaciones del desplazamiento químico de ^{15}N . Un ejemplo de esta posibilidad se muestra para este complejo en la Figura 4.11. En concreto, se muestra la variación del $\delta(^{15}\text{N})$ para el grupo ^{15}NH de la dimetilamina (2b-dma) en la especie monoacuo, y para el grupo $^{15}\text{NH}_2$ de la metilamina (2c-dma) en la especie diacuo.

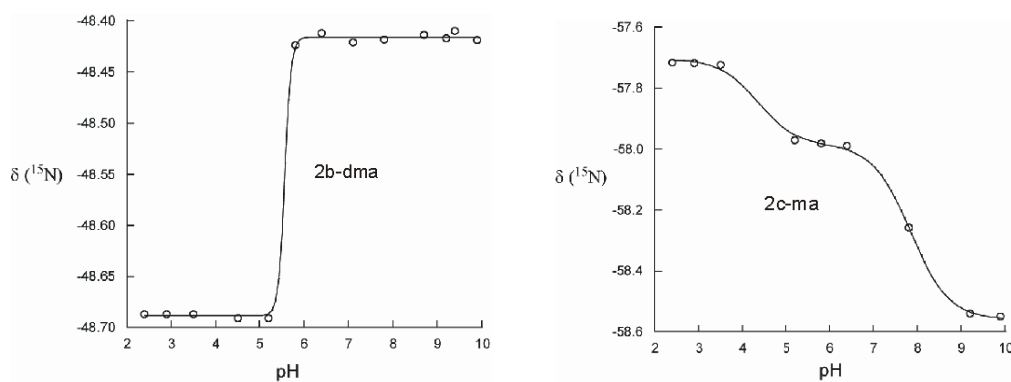


Figura 4.11 Variación del desplazamiento químico $\delta(^{15}\text{N})$ de la señal de los grupos ^{15}NH (2b-dma) y $^{15}\text{NH}_2$ (2c-ma) en la valoración de las especies mono y diacuo del complejo ^{15}N -2

***trans*-[PtCl₂(¹⁵N-dimetilamina)(¹⁵N-isopropilamina)] (¹⁵N-3)**

El grupo ¹⁵NH₂ de la isopropilamina fue el que se siguió en la valoración de las acuoespecies (**3b-ipa** y **3c-ipa**) de este complejo. En la Figura 4.12 están representadas las curvas obtenidas en la valoración de las especies monoacuo y diacuo, en las que se observan los puntos de inflexión correspondientes.

Un ejemplo de la asignación de las señales del complejo ¹⁵N-3 a pH 4.2 se muestra en el espectro de la Figura 4.12.

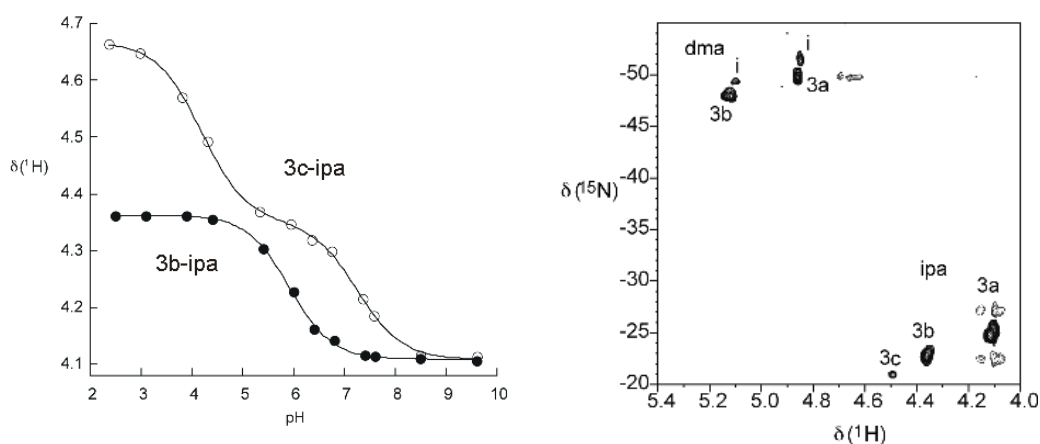


Figura 4.12 Variación del desplazamiento químico $\delta(^1\text{H})$ de la señal del grupo ¹⁵NH₂-ipa en la valoración de las acuoespecies, y espectro RMN 2D [¹H,¹⁵N] HSQC del complejo ¹⁵N-3 a pH 4.2. Asignaciones: especies dicloro (**3a**), monoacuo (**3b**), diacuo (**3c**) e impurezas (i)

Una recopilación de los desplazamientos químicos $\delta(^1\text{H},^{15}\text{N})$ de todas las señales de las especies asignadas para los complejos ¹⁵N-1, ¹⁵N-2 y ¹⁵N-3 se encuentra recogida en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Desplazamientos químicos de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ y ^{15}NH de las especies asignadas en los espectros^a de RMN 2D [^1H , ^{15}N] HSQC para los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$ y $^1\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$

Complejo	X	X'	δ / ppm						
			$^{15}\text{NH}_2$				^{15}NH		
			ipa		ma		dma		
			^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	^1H	^{15}N	
<i>trans</i> -[PtXX' (^{15}N -ipa)(^{15}N -ma)]	1a	Cl	Cl	4.13	-23.5(286)	4.15	-59.1(285)		
	1b^b	Cl	H ₂ O	4.40	-21.6	4.38	-57.7		
		Cl	OH	4.13	-21.6	4.11	-57.2		
	1c^c	H ₂ O	H ₂ O	4.72	-19.7	4.69	-55.8		
		OH	OH	4.15	-20.2	4.09	-56.3		
<i>trans</i> -[PtXX' (^{15}N -dma)(^{15}N -ma)]	2a	Cl	Cl			4.15	-61.3(268)	4.86	-50.6
	2b^b	Cl	H ₂ O			4.36	-59.6	5.13	-48.7
		Cl	OH			4.11	-59.6	4.71	-48.4
	2c^c	H ₂ O	H ₂ O			4.65	-57.7	5.45	-46.5
		OH	OH			4.10	-58.6	4.62	-47.3
<i>trans</i> -[PtXX' (^{15}N -dma)(^{15}N -ipa)]	3a	Cl	Cl	4.11	-25.2(267)			4.86	-50.0
	3b^b	Cl	H ₂ O	4.36	-22.9			5.12	-48.2
		Cl	OH	4.11	-22.8			4.68	-47.7
	3c^c	H ₂ O	H ₂ O	4.67	-21.0			5.45	-46.3
		OH	OH	4.13	-21.4			4.57	-46.5

^a 100 mM NaClO₄, 298 K, $\delta(^{15}\text{N}) \pm 0.5$ ppm. ^b Valores obtenidos por el ajuste de la ecuación (4.2). ^c Valores obtenidos por el ajuste de la ecuación (4.3)

A continuación se describen los cambios más representativos y útiles en la asignación de los valores de $\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ y $^1\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$ obtenidos para estos complejos (Tabla 4.4).

Los $\delta(^{15}\text{N})$ de los grupos $\text{Pt}^{\text{II}}-^{15}\text{NH}_2$ de la isopropilamina y metilamina muestran un $\Delta\delta$ de 36 ppm. Este hecho evidencia la gran influencia que tienen los grupos o cadena coordinada al nitrógeno en el grupo $^{15}\text{NH}_2\text{R}$ (secuencia de enlaces). Los $\delta(^{15}\text{N})$ de estos mismos grupos, con respecto al del grupo $\text{Pt}^{\text{II}}-^{15}\text{NH}$ de la dimetilamina, se diferencian en 10 y 25 ppm, respectivamente.

La dependencia de la resonancia de ^{15}N con respecto al ligando en posición *trans* al núcleo observado se refleja en la variación del $\delta(^{15}\text{N})$ de los grupos en los distintos complejos. Así, el $\delta(^{15}\text{N})$ de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ de la isopropilamina y metilamina varía ~ 2 ppm dependiendo de si tiene en *trans* un grupo $^{15}\text{NH}_2$ (complejo $^{15}\text{N-1}$) ó un grupo ^{15}NH (complejos $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$) (Tabla 4.4). El $\delta(^{15}\text{N})$ del grupo ^{15}NH de la dimetilamina es el mismo en los complejos $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$, lo cual es coherente ya que en ambos complejos el ligando en *trans* a éste es un grupo $^{15}\text{NH}_2$ (metilamina e isopropilamina, respectivamente). Esto está de acuerdo con lo observado en la acución de otros complejos *trans*.^{49,79,87}

Las variaciones de los $\delta(^1\text{H})$ de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ por la desprotonación del ligando H_2O ($\Delta\delta$ 0.3 ppm) son similares a las observadas para un grupo amino en *cis* a un ligando $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}$.^{87,102,86}

Los datos de las $^1\mathcal{J}(^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N})$ extraídos de los espectros 2D [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$] HSQC (Tabla 4.4) de este estudio de cinética son comparables a los ya apuntados en la descripción de los complejos (ver parte experimental).[‡]

La Figura 4.13 representa el diagrama de las regiones de $\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ para las señales de complejos $^{15}\text{N}-\text{Pt}^{\text{II}}$ encontradas en la bibliografía. Al incluir los datos que aporta esta investigación en el diagrama ($^{15}\text{NH}_2$ -ma Δ , $^{15}\text{NH}_2$ -ipa \square y ^{15}NH -dma \circ), se observa como los mismos suponen la ampliación de la región de desplazamientos químicos $\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ para grupos $^{15}\text{NHR}_2$ en posición *trans* a un átomo de nitrógeno ($\text{NH}_2-\text{Pt}^{\text{II}}-\text{N}$ y $\text{NH}-\text{Pt}^{\text{II}}-\text{N}$).

¹⁰² Zhang, J.; Thomas, D. S.; Davies, M. S.; Berners-Price, S. J.; Farrell, N. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 652

[‡] En los espectros RMN 2D [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$] HSQC el acoplamiento $^{195}\text{Pt}-^{15}\text{N}$ sólo pudo observarse en la especie dicloro por poseer ésta una mayor simetría que las acuoespecies y estar en una mayor concentración

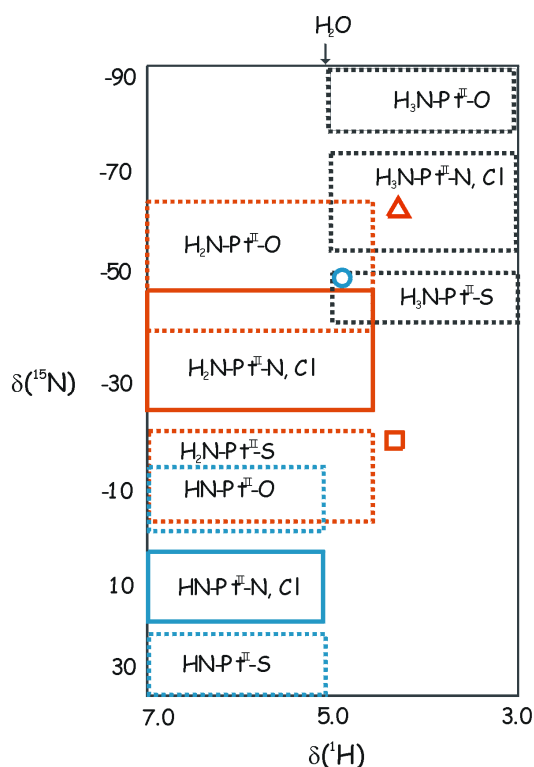


Figura 4.13 Representación esquemática de un espectro 2D [^1H , ^{15}N] HSQC con las regiones delimitadas de $\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ publicadas para grupos $\text{Pt}^{\text{II}}\text{-}^{15}\text{NH}_3$, $\text{Pt}^{\text{II}}\text{-}^{15}\text{NH}_2$ y $\text{Pt}^{\text{II}}\text{-}^{15}\text{NH}^{78}$ y los observados en esta investigación para los ligandos: $^{15}\text{NH}_2\text{-ma}$ Δ , $^{15}\text{NH}_2\text{-ipa}$ \square y $^{15}\text{NH-dma}$ \circ en los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}^\psi$

Los valores de $\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ del grupo ^{15}NH de la dimetilamina representan además, los primeros obtenidos para este tipo de ligandos, puesto que sólo se habían realizado anteriormente estudios con el ligando quelante dietilentriamina.¹⁰³

Adicionalmente a toda la información descrita hasta ahora, a través de las valoraciones, se determinaron los valores de pK_a , es decir, se estudió el carácter ácido de los protones de las moléculas de agua enlazadas al platino en las acuospecies.

^{ψ} referenciados externamente al $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ $\delta(^{15}\text{N})$ 0.0 ppm

¹⁰³ Guo, Z.; Chen, Y.; Zang, E.; Sadler, P. J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 21, 4107

Tabla 4.5 Constantes de disociación ácido-base de las acuoespecies de los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$ y las publicadas de otros complejos *cis*-y *trans*- Pt^{IIa}

Complejo	$\text{p}K_{\text{a}}$	$\text{p}K_{\text{a1}}$	$\text{p}K_{\text{a2}}$	ref
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N-ipa})(^{15}\text{N-ma})]$ (1) ^c	5.98 ± 0.01	4.32 ± 0.01	7.33 ± 0.02	^b
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N-dma})(^{15}\text{N-ma})]$ (2) ^d	5.85 ± 0.07	4.59 ± 0.08	7.98 ± 0.14	^b
	$5.57 \pm 0.08^{\text{i}}$	$4.34 \pm 0.27^{\text{i}}$	$7.85 \pm 0.06^{\text{i}}$	^b
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N-dma})(^{15}\text{N-ipa})]$ (3) ^e	5.91 ± 0.02	4.28 ± 0.03	7.29 ± 0.04	^b
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{NH}_3)(2\text{-Me-}^{15}\text{N-but})]$	5.90	4.16	7.17	86
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{ipa})(2\text{-Me-}^{15}\text{N-but})]$	5.86	4.21	7.33	104
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$	5.63	4.35	7.40	84
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{ciclohexilamina})]$	5.40	^h	^h	96
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(2\text{-picolina})]$	5.55	4.03	7.01	87
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(3\text{-picolina})]$	5.35	3.97	6.78	87
<i>trans</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(4\text{-picolina})]$	5.39	3.94	6.88	87
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$	6.41	5.37	7.21	48
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{dma})_2]$	6.37	5.17	6.47	105
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2\text{NH}_3(\text{ciclohexilamina})]$	6.73^{f}	5.68^{g}	7.68^{g}	96
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2\text{NH}_3(2\text{-picolina})]$	6.13/6.49	5.22	7.16	88
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2\text{NH}_3(3\text{-picolina})]$	5.98/6.26	5.07	6.94	88

^a $\text{p}K_{\text{a}}$ es el valor de la especie monoacuo $\text{p}K_{\text{a1}}$ y $\text{p}K_{\text{a2}}$ son los valores de las especies diaquo. ^b resultados de este trabajo. ^c valores de $\text{p}K_{\text{a}}$ determinados del ^1H de los grupos $^{15}\text{NH}_2\text{-ipa}$ y -ma (Figura 4.9). ^d valores de $\text{p}K_{\text{a}}$ determinados del ^1H del grupo $^{15}\text{NH}_2\text{-ma}$ (Figura 4.10). ^e valores de $\text{p}K_{\text{a}}$ determinados del ^1H del grupo $^{15}\text{NH}_2\text{-ipa}$ (Figura 4.12). ^f valores idénticos para los dos isómeros. ^g valor medido para el ligando acuo en *trans* a ligando NH_3 . ^h no calculado. ⁱ valor de $\text{p}K_{\text{a}}$ determinado del $\delta(^{15}\text{N})$ del grupo $^{15}\text{NH-dma}$ y los valores de $\text{p}K_{\text{a1}}$ y $\text{p}K_{\text{a2}}$ del grupo $^{15}\text{NH}_2\text{-ma}$ (Figura 4.11)

¹⁰⁴ Pizarro, A. in PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Química Inorgánica. Madrid, 2004

¹⁰⁵ Cubo, L.; Thomas, D. S.; Zhang, J.; Quiroga, A. G.; Navarro-Ranninger C.; Berners-Price, S. J. *Inorg. Chim. Acta.* 2008, in press

Los valores de pK_a obtenidos en las valoraciones para las acuoespecies de los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$ están recogidos en la Tabla 4.5. Como ejemplo se muestran también para el complejo $^{15}\text{N-2}$ los resultados obtenidos con los datos de $\delta(^{15}\text{N})$, los cuales están en concordancia con los obtenidos de los $\delta(^1\text{H})$.

Comparando los pK_a de los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$ se deduce que la naturaleza de las distintas aminas alifáticas parece no tener un efecto importante en los valores de pK_a de los ligandos H_2O de sus acuoespecies, puesto que no se aprecian diferencias significativas. Los resultados son análogos a los únicos publicados anteriormente para este tipo de complejos: *trans*- $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{NH}_3)(2\text{-metil-}(^{15}\text{N}\text{-butilamina})]$ y *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{isopropilamina})(\text{S})\text{-}2\text{-metil-}(^{15}\text{N}\text{-butilamina})]$ ^{86,104} (Tabla 4.5). Sin embargo, en comparación con otros compuestos *trans* como, por ejemplo, los que contienen aminas planares^{87,96} los pK_a son superiores, luego los complejos **1-3** se encuentran en una mayor proporción en su forma más reactiva $\text{Pt-H}_2\text{O}$. Por otro lado, los pK_a son 0.4 unidades menores que los obtenidos para el cisplatino y *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{dma})_2]$, y notablemente mayores que los del transplatino (0.3-0.5 unidades de pH).

En la especie diacu, sin embargo, los valores pK_{a1} y pK_{a2} no son similares, siendo en el caso del complejo **2** mayores que los de los complejos **1** y **3**. Por otro lado, el valor del pK_{a1} de los complejos **1-3** es aproximadamente una unidad menor que la de los complejos análogos *cis*, lo que concuerda con la tendencia descrita anteriormente.⁸⁷

4.3.3.2 Cinética de hidrólisis y cálculo de las constantes de velocidad

Asignadas las señales en los espectros, el siguiente paso fue el estudio del comportamiento en disolución de los complejos, analizando la evolución de las señales de las especies dicloro **a**, monoacu **b** y diacu **c**, esta vez, sin forzar las condiciones.

El estudio de la cinética de hidrólisis de los complejos nos permitió obtener las constantes de aciación-anación y equilibrio del primer y segundo paso de dicha hidrólisis (Esquema 4.3). Esto nos proporcionó la información necesaria para conocer tanto las especies presentes en disolución como su tanto por ciento en relación al compuesto inicial.

En la Figura 4.14 se muestran los espectros RMN 2D [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$] HSQC de la disolución de todos los compuestos tras un período de tiempo de 64 horas.

En el espectro del compuesto $^{15}\text{N-1}$ (Figura 4.14) pueden identificarse las señales para las especies dicloro (**1a**), monoacu (**1b**) y diacu (**1c**) para los grupos $^{15}\text{NH}_2$ de la isopropilamina y metilamina.

Las señales presentes en el espectro del compuesto $^{15}\text{N-2}$ son las de los grupos $^{15}\text{NH}_2$ y ^{15}NH correspondientes a las especies dicloro (**2a**) y monoacuo (**2b**). Adicionalmente, para el grupo $^{15}\text{NH}_2$ de la metilamina se detectó además la señal asignable a la especie diacuo (**2c**) (Figura 4.14).

El caso del compuesto $^{15}\text{N-3}$ es algo diferente, puesto que no se llegaron a detectar señales asignables a la especie diacuo (**3c**) tras este período de tiempo. Además, como se ha indicado en su caracterización, se observaron señales adicionales debidas a impurezas (**i**) (Figura 4.14). A pesar de esto consideramos que el cálculo de la constante del primer paso de hidrólisis no se ve afectado por esta circunstancia, ya que la señal del grupo $^{15}\text{NH}_2$ de la isopropilamina, utilizada para este estudio, aparece en una región en la que su análisis y seguimiento pudieron realizarse independientemente del resto de las señales.

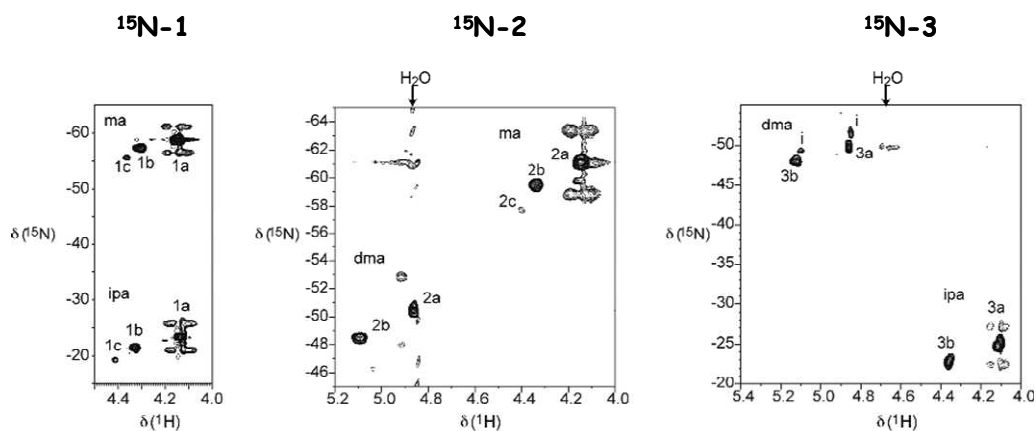


Figura 4.14 Espectros de RMN 2D [^1H , ^{15}N] HSQC de los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$ tras 64 horas. Asignaciones: especies dicloro (**a**), monoacuo (**b**), diacuo (**c**) e impureza (**i**)

No se han encontrado evidencias de la presencia de especies oxidadas de Pt^{IV} en la disolución de estos complejos, incluso tras la incubación prolongada de los complejos **1-3** durante 3 días a 298 K y hasta durante 19 días para el complejo **1**. Este hecho contrasta con lo observado en el estudio de la acuación del complejo *trans*- $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{NH}_3)(2\text{-Me-}^{15}\text{N-but})]$ para el que se observaron especies de Pt^{IV} tras 24 horas de incubación bajo condiciones similares.⁸⁶ Tiene que transcurrir hasta un mes de incubación en el complejo **1** a 310 K para detectar señales débiles en las regiones asignables a especies de Pt^{IV} con $\delta(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ 5,16/-3,1 (ipa) y 5,43/-33,1 (ma), cuyo porcentaje con respecto al total de especies presentes en disolución fue del 4%.

Los valores de las concentraciones de las especies en disolución durante la hidrólisis de los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$ en unas condiciones de pH 4.2-4.8 y 298 K, con las que se calcularon las constantes de velocidad de acuación-anación, están basadas en la integración de las señales en los espectros de RMN 2D [^1H , ^{15}N] HSQC y se recogen en la Figura 4.15. Las líneas en los gráficos representan el mejor de los ajustes a los datos experimentales obtenidos con el programa Scientist,^Ø y nos proporcionaron los valores de las constantes de velocidad (Tabla 4.6).

Como puede verse en estas curvas (Figura 4.15), en todos los complejos se detectó la presencia de la especie monoacuo (b) ya en el espectro inicial, lo que nos da una idea de la rápida velocidad de acuación de estos complejos.

Tras alcanzar una situación de equilibrio, el porcentaje de especie monoacuo (b) corresponde a un 18, 16 y 25% para los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$, respectivamente.

La detección de la señal asignable a la especie diacuo (c) se produjo tras 20 y 9 horas en el caso de los complejos $^{15}\text{N-1}$ y $^{15}\text{N-2}$, respectivamente. Su porcentaje, una vez establecido el equilibrio, fue de 2 y 0.6%.

Las constantes de velocidad calculadas para los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$ se muestran en la Tabla 4.6. La acuación del primer paso de hidrólisis (k_1) del complejo $^{15}\text{N-2}$ se produce a una mayor velocidad. Del mismo modo, la velocidad de anación (k_{-1}) del complejo $^{15}\text{N-2}$ es más rápida. Ambos factores se reflejan en un menor valor de la constante de equilibrio K_1 comparada con la de los complejos $^{15}\text{N-1}$ y $^{15}\text{N-3}$ y, por consiguiente, con una menor presencia de la especie monoacuo en disolución y el establecimiento del equilibrio en un menor período de tiempo para $^{15}\text{N-2}$.

Teniendo en cuenta que lo único que diferencia a los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$ es la naturaleza de sus ligandos amina, podríamos basar las diferencias cinéticas en la influencia de factores estéricos. Dado que el mecanismo por el que transcurren las reacciones de sustitución de ligandos en complejos plano cuadrados supone el paso por una especie intermedia pentacoordinada, el menor impedimento estérico que presenta el complejo $^{15}\text{N-2}$ con respecto a los complejos $^{15}\text{N-1}$ y $^{15}\text{N-3}$ favorece las reacciones de sustitución.

^Ø Los modelos cinéticos utilizados están recogidos en el apéndice de esta memoria M1 y M2

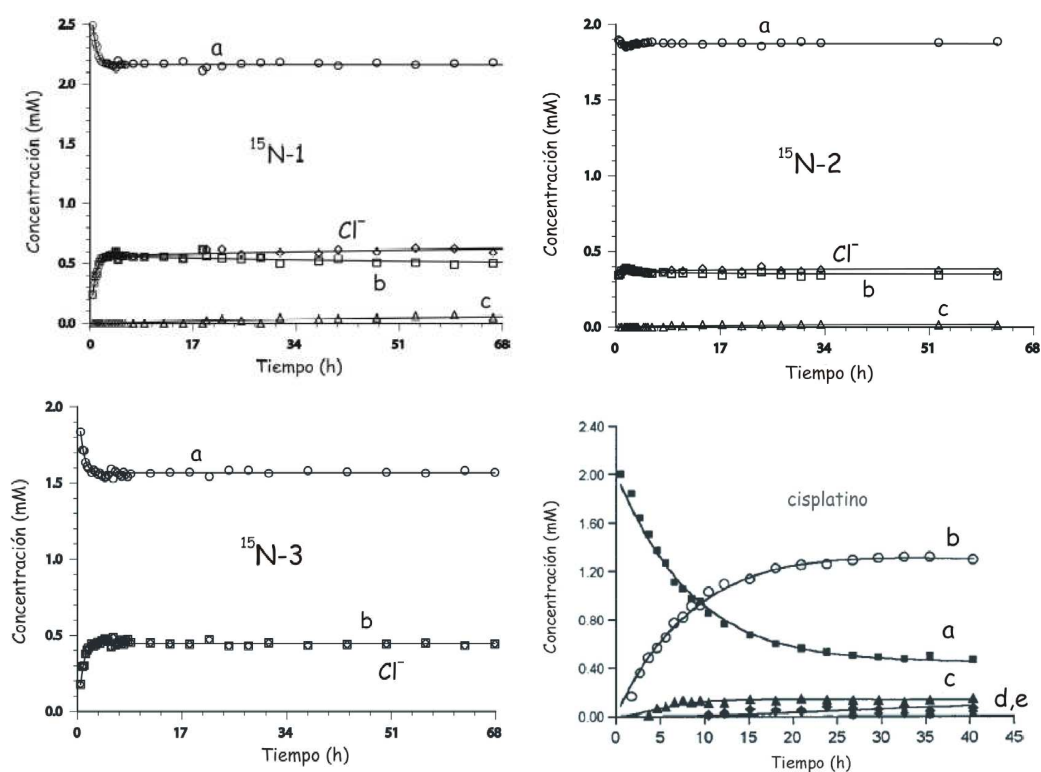


Figura 4.15 Cinética de hidrólisis de los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$ y del cisplatino.^{9,49} Asignaciones: especies dicloro (a), monoacuó (b), diaacuó (c) y subproductos de condensación (d, e)

Debido a las concentraciones tan bajas en disolución de la especie diaacuó no pudieron calcularse valores precisos de las constantes de velocidad de acuación y anación del segundo paso de la hidrólisis (k_2 y k_{-2}).

Aún así se han podido calcular las constantes de equilibrio de ambos pasos de hidrólisis (K_1 y K_2) a través de la relación de integrales de las señales de las especies en los espectros de RMN 2D [^1H , ^{15}N] HSQC registrados una vez establecido el equilibrio (Figura 4.14).

Hemos publicado recientemente el estudio de hidrólisis del complejo *cis*- $[\text{PtCl}_2(^{15}\text{N-dma})_2]$,¹⁰⁵ que nos permite su comparación con la de los complejos *trans* con la dimetilamina como ligando desarrollados en este trabajo. Las constantes de velocidad de acuación (k_1) y anación (k_{-1}) de los complejos $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$ son de entre 3-7 y 70-300 veces superiores, respectivamente, a las del complejo *cis*

⁹ 9 mM NaClO_4

(Tabla 4.6). Este hecho se atribuye al diferente efecto labilizador de los ligandos ($\text{Cl}^- > \text{NH}_3$).

Tabla 4.6 Constantes de velocidad y equilibrio de la hidrólisis de complejos de Pt^{II}

Complejo	T ^a	k_1 (10^{-5} s^{-1})	k_{-1} ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$\text{p}K_1$	$\text{p}K_2$
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-ipa)(¹⁵ N-ma)] (1) ^a	298 K	5.5(2)	0.37(1)	3.90	4.2
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-dma)(¹⁵ N-ma)] (2) ^a	298 K	14 (7)	2(1)	4.18	4.7
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-dma)(¹⁵ N-ipa)] (3) ^a	298 K	6.1(3)	0.46(2)	3.89	^b
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-dma) ₂] ^c	298 K	2.12(1)	0.0067(8)	2.50	3.69
cisplatino ^d	298 K	2.38(4)	0.0046(3)	2.07	3.49
<i>trans</i> -[PtCl ₂ NH ₃ (2-picolina)] ^e	277 K 310 K	2.6(2)		3.41 3.43	^b
<i>trans</i> -[PtCl ₂ NH ₃ (3-picolina)] ^e	277 K	12.7(8)		3.70	^b
<i>trans</i> -[PtCl ₂ NH ₃ (4-picolina)] ^e	277 K	5.2(3)		3.40	^b
<i>trans</i> -[PtCl ₂ {E-HN=C(OMe)Me ₂ } ₂] ^f	298 K	21.0(3)	0.0890(5)	2.63	2.27

^a 0.1 M NaClO₄, pH 4.2-4.8, resultados de esta Tesis; los valores de k_1 y k_{-1} representan el mejor ajuste de los datos experimentales al modelo cinético (Esquema 4.3 y Figura 4.15), el error calculado para las constantes k_2 and k_{-2} fue muy grande por lo que sus valores no se incluyen; los cálculos de las constantes de equilibrio ($\text{p}K_1$ and $\text{p}K_2$) están basados en la relación de integrales de los picos ¹H/¹⁵N para las especies **a**: **b**: **c** en el espectro de RMN [¹H, ¹⁵N] alcanzado el equilibrio (Figura 4.14). ^b No se observó el segundo paso de la hidrólisis. ^c 0.1 M NaClO₄, pH 5.8. ref ¹⁰⁵ ^d 0.009 M NaClO₄, ref ⁴⁹. ^e ref ⁸⁷ ^f 0.05 M NaClO₄, 298 K., ref ⁷⁶

En relación a otros complejos *trans* como el *trans*-[PtCl₂{E-HN=C(OMe)Me₂}₂]⁷⁶ y *trans*-[PtCl₂NH₃(*n*-picolina)] (*n* = 2, 3 y 4)⁸⁷ los complejos ¹⁵N-1 y ¹⁵N-3 presentan una acuación significativamente más lenta, sin embargo, la del complejo ¹⁵N-2 es similar. Además, la constante de equilibrio K_1 es menor para los complejos ¹⁵N-1, ¹⁵N-2 y ¹⁵N-3 en relación a la de los anteriores (Tabla 4.6).

La comparación con la hidrólisis del transplatino no resulta sencilla dado que los datos existentes en la bibliografía son muy dispares como puede observarse en los recogidos en la Tabla 4.7.

Comparando la hidrólisis de estos complejos con la del cisplatino vemos como existen diferencias importantes (Figura 4.15). Lo más significativo es que las constantes de equilibrio K_1 y K_2 de los complejos ¹⁵N-1, ¹⁵N-2 y ¹⁵N-3 son

aproximadamente de uno y dos órdenes de magnitud menores, respectivamente, que las obtenidas para el cisplatino en condiciones similares.⁴⁹ Estos datos justifican el menor grado de hidrólisis y la menor presencia de acuospecies en disolución para estos complejos *trans*.

Tiempos de vida media de las especies

El tiempo de vida media de una reacción ($t_{1/2}$) es el tiempo que tardan en convertirse en productos la mitad de los reactivos. En una reacción de primer orden $t_{1/2}$ es una constante y se puede calcular a partir de la constante de velocidad.

Tabla 4.7 Tiempo de vida media ($t_{1/2}$ (h)) de las especies de complejos de Pt^{II}

Complejo	T (K)	cloro $t_{1/2}$ (h)	monoacuo $t_{1/2}$ (h)	ref
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-ipa)(¹⁵ N-ma)] (1)	298	3.5	352	a
	310	1.7	74.6	
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-dma)(¹⁵ N-ma)] (2)	298	1.3	270	a
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (¹⁵ N-dma)(¹⁵ N-ipa)] (3)	298	3.1	b	a
<i>trans</i> -[PtCl ₂ NH ₃ (2-picolina)]	277	7.43	b	87
	310	0.9	70.2	
<i>trans</i> -[PtCl ₂ NH ₃ (3-picolina)]	277	1.52	b	87
<i>trans</i> -[PtCl ₂ NH ₃ (4-picolina)]	277	3.68	b	87
<i>trans</i> -[PtCl ₂ {E-HN=C(OMe)Me ₂ }]	298	0.92	77	76
transplatino	298	1.96	>3.9	106
	298.2	10.13		107
	318.2	0.18	48	108
cisplatino	298	8.1	13.7	49

^a Resultados de esta Tesis ^b No observado

¹⁰⁶ Aprile, F.; Martin, D. S. J. *Inorg. Chem.* **1962**, *1*, 551

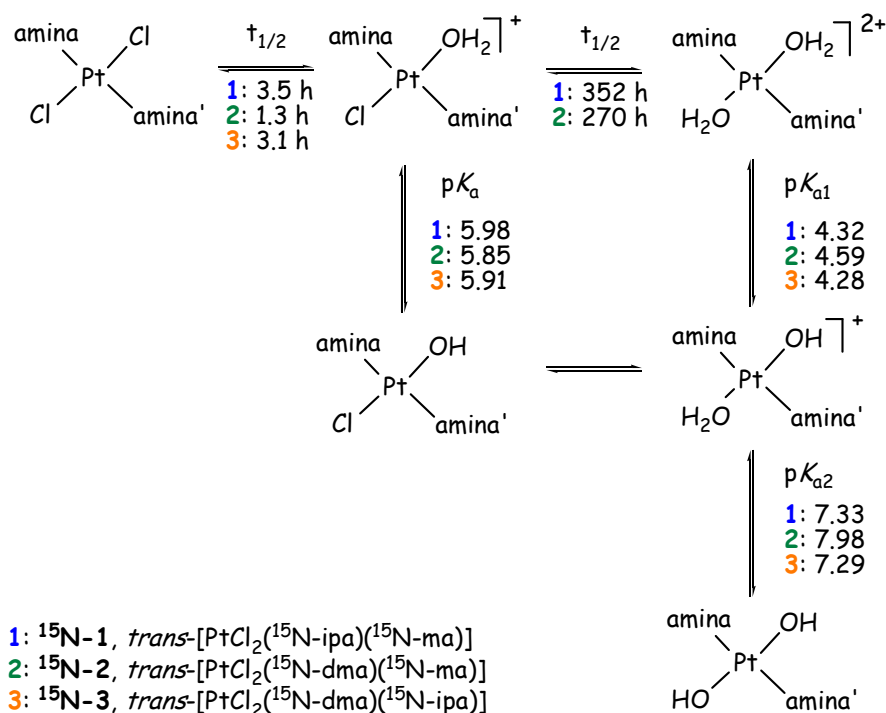
¹⁰⁷ Miller, S. E.; Gerard, K. J.; House, D. A. *Inorg. Chim. Acta.* **1991**, *190*, 135

¹⁰⁸ Mikola, M.; Arpalahhti, J. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4439

Como las reacciones de acuación de nuestros complejos pueden ser consideradas reacciones de primer orden, tanto en la primera, como en la segunda etapa, se calculó la vida media ($t_{1/2}$ (h)) de las especies dicloro y monoacuo utilizando los datos de sus constantes de velocidad de acuación (k_1 y k_2).

Los valores de $t_{1/2}$ de la especie monoacuo obtenidos para los complejos fueron $^{15}\text{N-1}$ (3.5h) \approx $^{15}\text{N-3}$ (3.1 h) $>$ $^{15}\text{N-2}$ (1.3 h). Estos datos reflejan nuevamente la rápida acuación del complejo 2 (Tabla 4.7). Los valores de $t_{1/2}$ para la especie dicloro ($t_{1/2}$ 1.3-3.5 h) y monoacuo ($t_{1/2}$ 270-352 h) de los complejos $^{15}\text{N-(1-3)}$ manifiestan su diferente cinética con respecto a, por ejemplo, el *trans*-[PtCl₂((E)-HN=C(OMe)Me)₂] ($t_{1/2}$ 0.9 h especie dicloro y 77 h especie monoacuo),⁷⁶ y también la poca tendencia de estos complejos a la sustitución del segundo ligando cloro para permitir la entrada de la segunda molécula de agua.

Como resumen de todo lo descrito en este capítulo, en el Esquema 4.4 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la cinética de hidrólisis y equilibrios ácido-base de las acuo especies de los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$, donde se presentan los valores del tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de las especies dicloro y monoacuo, y los valores de pK_a de las acuo especies.



Esquema 4.4 Esquema general de los resultados del estudio de la hidrólisis de los complejos $^{15}\text{N-1}$, $^{15}\text{N-2}$ y $^{15}\text{N-3}$

Productos de hidrólisis y porcentajes bajo condiciones fisiológicas

Se realizó el cálculo teórico del porcentaje de las especies presentes en disolución para los complejos ^{15}N -(1-3) en condiciones fisiológicas intracelulares utilizando los datos de las constantes de velocidad de acuación, anación y equilibrio y los valores de pK_a de las acuospecies obtenidos previamente (Tabla 4.5 y 4.6), y siguiendo la metodología utilizada en el mismo estudio desarrollado para el complejo BBR3463.⁷⁹

Los resultados de estos cálculos (Tabla 4.8) muestran el bajo grado de hidrólisis (<1%) que estos compuestos experimentarían bajo condiciones fisiológicas en células cancerígenas, siendo éste mucho menor en comparación con los datos publicados para complejos como BBR3464.

Tabla 4.8 Porcentaje de las especies presentes en disolución bajo condiciones fisiológicas teóricas de pH 7.4 y $[\text{Cl}^-]$ 22.7 mM

Complejo	%		% productos de hidrólisis				
	Cl/Cl	Productos hidrólisis	Cl/H ₂ O	Cl/OH	H ₂ O/H ₂ O	H ₂ O/OH	OH/OH
1 ^a	99.3	0.7	5.6	93.2	0	0.7	0.5
2 ^a	99.7	0.3	4.3	95.6	0	0.08	0.01
3 ^a	99.4	0.6	4.9	95.1	0	0	0
1,0,1/t,t,t (BBR3464) ^b	98.7	1.3	2.5	96.1	0	0.06	1.3

^a Cálculos basados en las constantes de disociación ácido-base y equilibrio de las Tablas 4.5 y 4.6, una concentración de fármaco de 1.8×10^{-8} M, pH 7.2 y $[\text{Cl}^-]$ 22.7 mM; las especies Y/Y' representan complejos mononucleares *trans*-[PtYY'(amina)₂] para los complejos 1-3 y especies dinucleares [PtY(NH₃)₂NR]₂ para el complejo BBR3464. ^b ref ⁷⁹

4.3.3.3 Estudios de hidrólisis por conductimetría

Hidrólisis-conductividad

El comportamiento en disolución acuosa de los complejos: *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (1), *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] (2) y *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (3) se ha estudiado mediante medidas conductimétricas. El cisplatino se utilizó como control¹⁰⁴ y se comparan los resultados con los obtenidos por RMN.

La gráfica de conductividad frente al tiempo en la hidrólisis del cisplatino a 298 K (Figura 4.16) muestra que este complejo alcanza un estado inicial de equilibrio en disolución en 18 horas, con un valor de $\sim 150 \mu\text{S}/\text{cm}$, mientras que los complejos *trans*-Pt^{II} alcanzan el equilibrio en menos de 4 horas, con unos valores de conductividad mucho menores ($30\text{-}45 \mu\text{S}/\text{cm}$).

Basándonos en los valores de conductividad de los complejos *trans*-Pt^{II} podemos deducir que la hidrólisis para estos complejos es mucho menor que la que se produce en el caso del cisplatino y que además, el establecimiento de una situación de equilibrio se produce en un período de tiempo muy inferior.

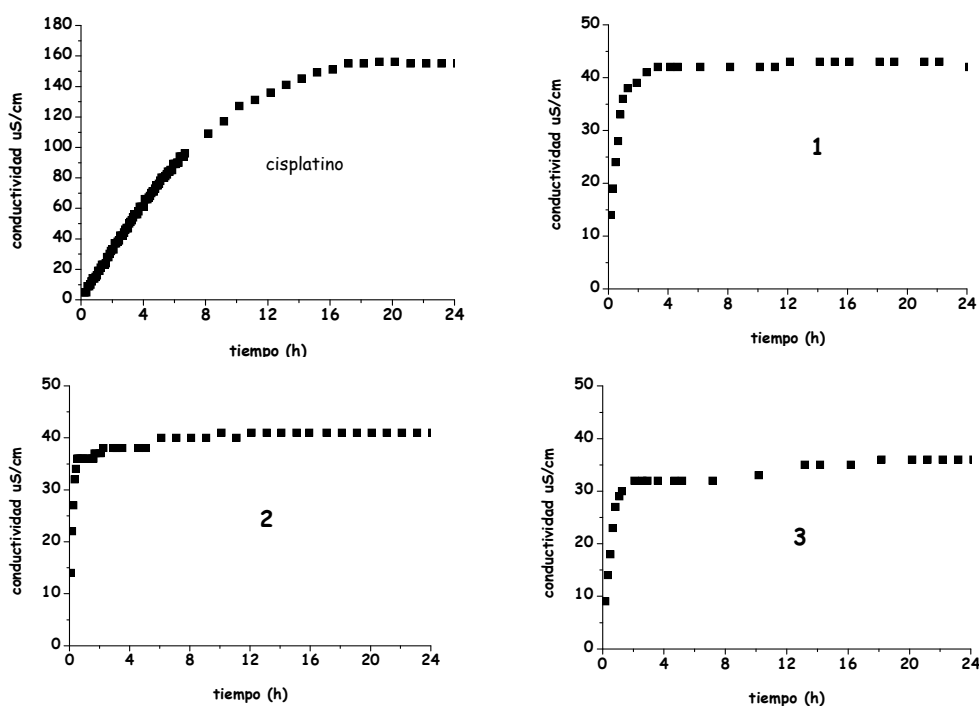


Figura 4.16 Variación de la conductividad frente al tiempo para: cisplatino, *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (1), *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] (2) y *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (3)

Cálculo de las constantes de velocidad de hidrólisis

Según el Esquema 4.1, la variación de la conductividad estará, en su etapa inicial, directamente relacionada con la formación de la especie monoacu (y los iones cloruro liberados). Se puede así establecer una relación directa entre la variación de la conductividad y la velocidad del primer paso de acuación para estos complejos. Por lo tanto, el término X en las ecuaciones de cinética (Ecuación 4.1) lo

asociamos, en este caso particular, a la conductividad producida por las especies cargadas presentes en disolución: acuospecies e iones cloruros.

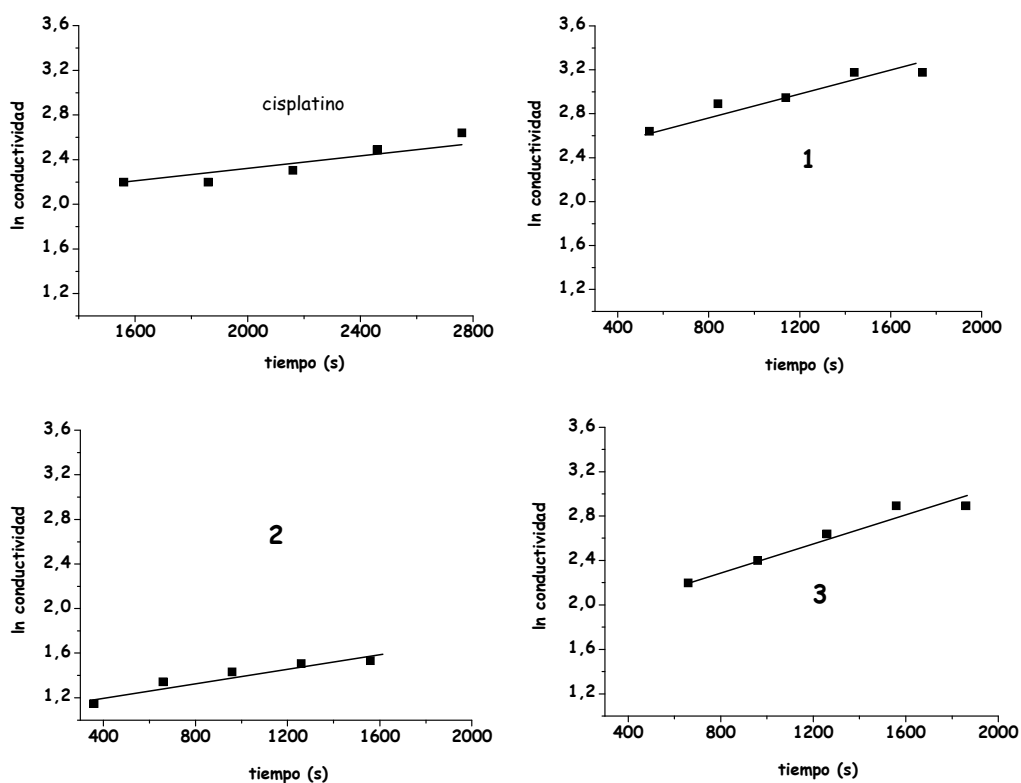


Figura 4.17 Variación del logaritmo de la conductividad frente al tiempo en los primeros momentos de la hidrólisis para los compuestos cisplatino, $trans$ -[PtCl₂(ipa)(ma)] (1), $trans$ -[PtCl₂(dma)(ma)] (2) y $trans$ -[PtCl₂(dma)(ipa)] (3)

La representación del logaritmo de la conductividad frente al tiempo (Figura 4.17) genera una recta cuya pendiente nos proporciona la constante de velocidad de acuación (k). La única consideración a tener en cuenta, es que dicha constante corresponde al doble de la real, debido a que en la medida de la conductividad contribuyen las dos concentraciones de las acuospecies y los iones cloruro. Por lo tanto, los valores de constantes de velocidad se corresponden con la mitad del valor de las pendientes de las rectas de las gráficas.

Teniendo en cuenta que este valor corresponde sólo a la velocidad de acuación (k_1) en los primeros momentos de hidrólisis, el análisis de estos datos debe ser considerado orientativo (Tabla 4.9) y pueden servir como guía, aunque nunca serán tan precisos como los de RMN.

Estudios de hidrólisis

Así pues, en este capítulo se ha mostrado que la medida de la conductividad en la disolución acuosa de este tipo de complejos, es una buena herramienta para realizar una estimación de su velocidad de hidrólisis y conocer aspectos importantes de su cinética como la formación de acuospecies y el establecimiento del equilibrio. Podemos observar cómo en este sentido los resultados están en concordancia con los obtenidos por RMN.

Tabla. 4.9 Constantes de velocidad de la primera etapa de acuación obtenidas por conductimetría

Complejo	$k(10^{-4} \text{ s}^{-1})$
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]	2
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)]	2.2
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (dma)(ma)]	1.5
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (dma)(ipa)]	3

Capítulo 5. Fotoactivación de la hidrólisis de complejos *trans*-Pt^{II} y fotorreacciones con nucleobases

5.1 Introducción

El diseño de fármacos fotosensibles es uno de los campos de investigación más actuales en la quimioterapia del cáncer. La administración de fármacos que pueden ser selectivamente fotoactivados en tejidos cancerígenos es una de sus aplicaciones, y podría minimizar los efectos secundarios de la quimioterapia.

Dentro de la fototerapia se está desarrollando activamente el campo de los complejos de metales de transición fotosensibles.

La fotoquímica de los compuestos de platino es de especial interés debido al amplio rango de transiciones d-d y de transferencia de carga accesibles en la región del espectro visible. Dependiendo del estado de oxidación del metal, del tipo de ligandos, así como del enlace metal-ligando, la radiación puede llevar a la sustitución de los ligandos o bien a reacciones redox. Por tanto, la fotoquímica de los complejos de platino no es fácilmente previsible.

Estudios previos de la fotoquímica del cisplatino, transplatino y $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ han demostrado cómo la irradiación induce la sustitución de los ligandos cloro por moléculas de disolventes como H_2O ó DMSO .^{109,110}

Se ha realizado recientemente un amplio estudio fotoquímico del transplatino.⁵⁰ En este estudio se demuestra cómo a través de la fotoactivación de este complejo, en presencia de ADN se produce la pérdida de los dos ligandos cloro, lo que genera un aumento de la formación de aductos bifuncionales. Se ha comprobado además, como la citotoxicidad del transplatino tras su fotoactivación, es comparable a la del cisplatino en algunas líneas celulares, es decir, el efecto de la irradiación puede transformar en un fármaco activo a un complejo inactivo como el transplatino.

Como se ha mencionado con anterioridad la etapa de hidrólisis de los complejos de Pt^{II} está considerada como la reacción limitante del conjunto de etapas que terminan en muerte celular. Podría por tanto, al igual que los complejos de Pt^{IV} , considerarse a los complejos de Pt^{II} como prodrogas, ya que a través de su hidrólisis, se activan generándose especies más activas (acuopecies) frente a los componentes celulares, tales como ADN y proteínas.

Sin embargo, esta etapa de hidrólisis no es un proceso selectivo y la formación de acuopecies tiene lugar tanto en células cancerígenas como en células normales.

¹⁰⁹ Perumareddi, J. R.; Adamson, A. W. *J. Phys. Chem.* **1968**, *72*, 414

¹¹⁰ Fry, H.; Deal, C.; Barr, E.; Cummings, S. D. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2002**, *150*, 37

Estudios de fotoactivación

En el caso concreto de los complejos *trans*-Pt^{II} se ha demostrado, además, que su hidrólisis no está favorecida y que por tanto se generan un número muy reducido de enlaces activos Pt-OH₂ en disolución.

En este contexto, nos planteamos estudiar la fotoquímica de nuestros complejos *trans*-Pt^{II}, con el objetivo de investigar los efectos de la irradiación sobre su comportamiento en disolución acuosa y en sus reacciones con biomoléculas de relevancia biológica, comprobando si siguen la tendencia observada,^{109,110} lo que supondría la posibilidad de considerarlas prodrogas fotosensibles.

5.2 Experimental

5.2.1 Materiales

Las nucleobases guanosina-5'-monofosfato (5'-GMP), citidina-5'-monofosfato (5'-CMP) y la 9-metiladenina (9-MetAde) fueron suministradas por Sigma-Aldrich; la adenosina -5'-monofosfato (5'-AMP) por Acros Organic.

5.2.2 Preparación de muestras

Las disoluciones utilizadas en los diferentes experimentos fueron preparadas partiendo de una inicial de platino de 2.5 mM. Las diluciones se llevaron a cabo como se describe en las secciones correspondientes a cada técnica.

Las medidas de pH se realizaron con un pHmetro Martini Mi150 (Progen Scientific Ltd) con un microelectrodo Thermo Fisher Scientific. Todas las medidas fueron hechas a 298 K. La calibración se realizó con disoluciones estándar de pH 4.0 y 7.0 (Aldrich). El pH de las disoluciones en cada experimento fue ajustado en un rango de 6-7. Los ajustes de pH en las disoluciones se realizaron añadiendo cantidades en escala micromolar de disoluciones 0.1 y 0.01 M de HClO₄ o NaOH.

Las reacciones entre los complejos de platino y las nucleobases se llevaron a cabo en una relación 1:2 y 310 K.

5.2.3 Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear fueron registrados en un equipo Bruker 500 MHz en tubos de RMN de 5 mm a 310 K. Las disoluciones fueron preparadas en 90% de H₂O y con una concentración final de platino de ~2.5 mM. La referencia en los espectros de ¹H fue 1,4-dioxano ($\delta(^1\text{H})$ 3.76 ppm).

5.2.4 Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas

Los estudios de Cromatografía Líquida fueron realizados en un equipo Agilent ChemStation 1100 Series, con un detector DAD UV-vis (275 nm) y una columna de fase reversa C18 (25 cm x 4.6 mm, 100 Å, Hichrom). El gradiente utilizado fue el siguiente: 95% A durante 5 min; de 95% A a 70% A en 30 min;

Estudios de fotoactivación

70% A durante 5 min; de 70% A a 95% A en 1 min y 95% A durante 5 min con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) como par iónico y un flujo de 1 ml/min (A: agua; B: acetonitrilo). Como software se utilizó Hystar 3.0.

Los estudios de espectrometría de masas fueron desarrollados con un espectrómetro de masas modelo Bruker HCT Plus con fuente de ionización electrospray y en un rango de masas de 50-3000 Da. El software para el análisis de datos fue Esquire Control 5.2.

5.2.5 Irradiación

La fuente de irradiación se genera en un fotorreactor Luzchem LZC-ICH2, con lámparas Luzchem LZC-UVA (Hitachi) y LZ-VIS (Sylvania cool White) que operaba a 365 nm con un controlador de temperatura y con el que la irradiación fue de 1.9 mW/cm².[†] La potencia de irradiación fue monitorizada con un medidor OAI-306 UV (Optical Associates, Inc).

[†] Esta irradiación de UVA corresponde a ~5 Jcm⁻² (1.77 mWcm⁻²; λ 365nm) que equivale a la exposición solar de 30-60 días (Escocia) ref ⁵⁰

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Fotoactivación de la hidrólisis

Los estudios fotoquímicos del complejo *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (**1**) en disolución acuosa a pH ~ 6 se han realizado utilizando las técnicas de RMN ¹H y la LC-MS. El análisis de los resultados se ha hecho teniendo en cuenta los obtenidos previamente del estudio de su hidrólisis, descritos en el Capítulo 4.

Así, todos los experimentos han sido llevados a cabo bajo dos condiciones diferentes: manteniendo la disolución en la oscuridad (**D-dark**) y sometiéndola a irradiación (**I-irradiated**).

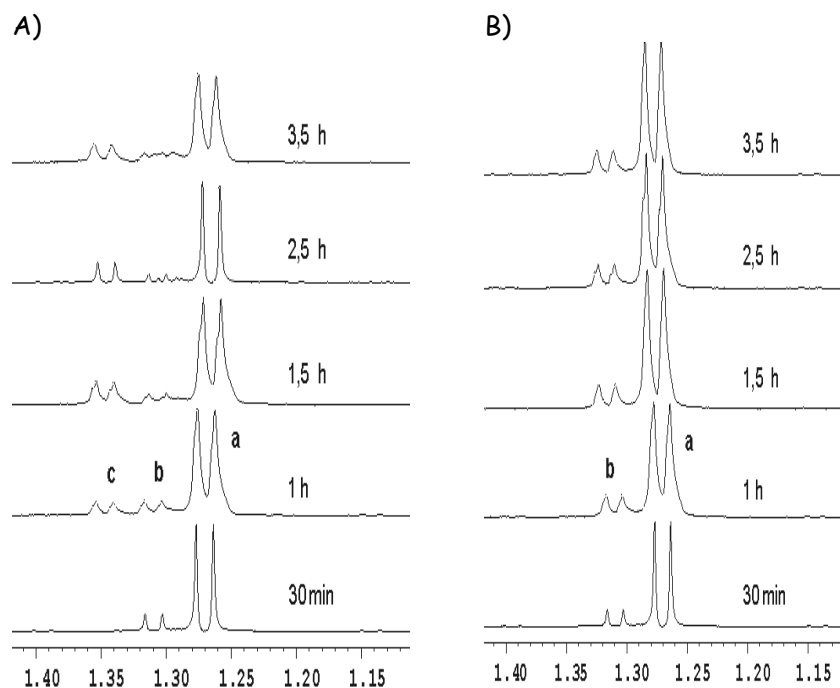


Figura 5.1 Seguimiento de la hidrólisis[‡] del complejo **1** por RMN de ¹H de las muestras: A) irradiada **I** y B) en la oscuridad **D**. En los espectros se muestra la región de los CH₃ de la isopropilamina. Asignaciones: especies dicloro **a**, monoacuo **b** y diacuo **c**

[‡] 100 mM NaClO₄ y 310 K

La señal analizada en los espectros de RMN de $^1\text{H}^\Psi$ fue la correspondiente a los grupos metilo de la isopropilamina, dado que es la señal que reúne las condiciones idóneas para su seguimiento.

En los espectros de la muestra no irradiada (**D**), como se apuntó en el Capítulo 4, se observan dos señales en la región de los CH_3 de la isopropilamina a $\delta(^1\text{H})$ 1.27 (**a**) y 1.31 ppm (**b**) (Figura 5.1) asignables a las especies dicloro y monoacuo, respectivamente. Sin embargo, para la muestra irradiada (**I**), tan sólo en 1 hora, además de las señales **a** y **b** se observó otra adicional **c** a $\delta(^1\text{H})$ 1.35 ppm (Figura 5.1), asignable a la especie diacuo.

En la Figura 5.2 se muestran los porcentajes de cada una de las especies presentes en disolución, calculados de la integración de las señales en los espectros de RMN ^1H para las muestras **I** y **D**, donde se observa claramente que la concentración de la especie diacuo (**c**) en la muestra **I** es superior a la de la especie monoacuo (**b**) tras 1,5 horas de irradiación, y llega a representar hasta casi un 20% del total de especies presentes en disolución. Al contrario, en la muestra **D** la presencia de esta especie no fue detectada en este período de tiempo (3,5 h).

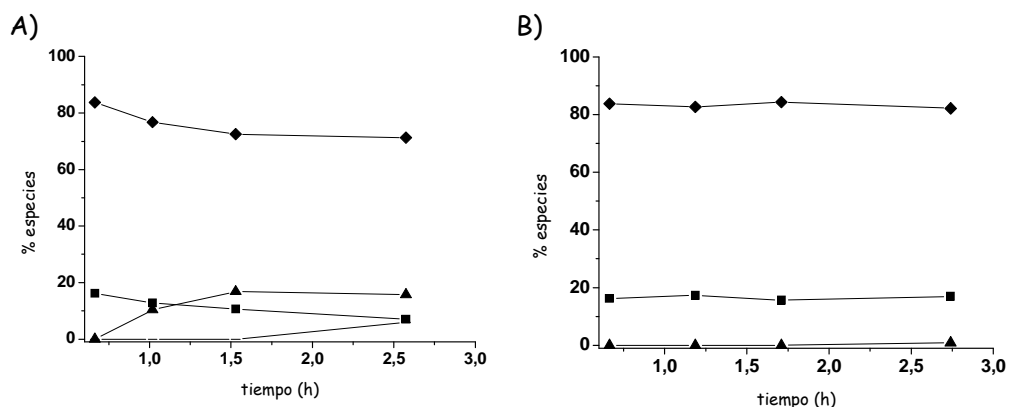


Figura 5.2 Cinética de hidrólisis^Ψ del complejo **1** para las muestras: **A**) irradiada **I** y **B**) en la oscuridad **D**. Asignaciones: especies **◆** dicloro (**a**), **■** monoacuo (**b**), **▲** diacuo (**c**) y (-) otras^Ψ

^Ψ En los espectros de RMN ^1H de la muestra irradiada **I** se observó la aparición de otras señales (-) con un desplazamiento químico próximo al de la especie monoacuo y cuya intensidad no fue significativa hasta transcurridas 2,5 horas de la disolución. Estas especies podrían deberse a productos de hidrólisis generados por reacciones de condensación

La rápida formación de la especie diacu en la muestra **I** contrasta con los estudios del complejo **1** en la oscuridad (ver Capítulo 4) donde la especie diacu (**c**) no fue detectada hasta 20 horas después de la disolución del complejo y su concentración nunca representó más del 3% del total de las especies, siendo incluso diez veces menor que la de la especie monoacu.

Estos resultados indican que la sustitución de los ligandos cloro en el complejo **1** es activada por la irradiación, lo que se traduce en un mayor grado de hidrólisis.

La técnica de LC-MS se utilizó con el propósito de confirmar la naturaleza de los productos de hidrólisis del complejo **1** observados por RMN ^1H .

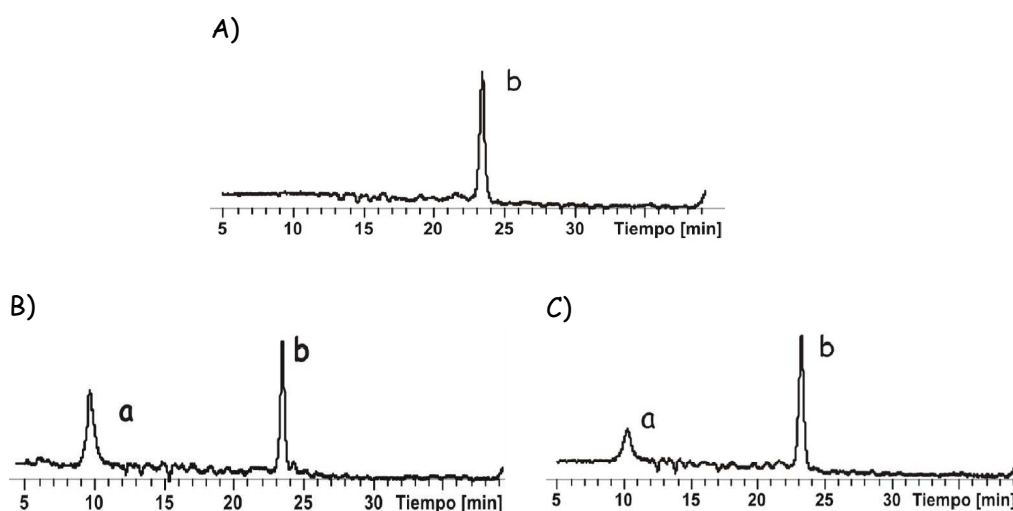


Figura 5.3 Cromatogramas obtenidos de las disoluciones del complejo **1**: A) inicial y tras 4 horas para las muestras B) irradiada **I** y C) en la oscuridad **D**

Los cromatogramas de LC-MS obtenidos para las muestras **I** y **D** del complejo **1**, tras 4 horas de disolución, se muestran en la Figura 5.3. Se ha añadido también en esta figura el cromatograma de la disolución inicial del complejo para su comparación.

Inicialmente, el complejo **1** en disolución muestra un pico **b** con un tiempo de retención de 23.4 min (Figura 5.3A). Tras 4 horas, los cromatogramas de las muestras **I** y **D** (Figura 5.3B y C) presentan dos picos **a** y **b** con un tiempo de retención muy similar en ambas muestras (9.7 y 23.3 min; 10.1 y 23.2 min, respectivamente). Si bien estos cromatogramas podrían indicar que se encuentran presentes en disolución las mismas especies, este hecho no puede confirmarse con

los datos que ofrecen los espectros de masas, ya que las especies en general no ionizan o se fragmentan (Figura A5-1 apéndice). Este hecho no es sorprendente ya que no hemos encontrado condiciones idóneas en la bibliografía para la detección de la especie diacu de este tipo de complejos.

A pesar de la escasa información obtenida a través de la técnica LC-MS, basándonos en la obtenida por RMN podemos decir que la hidrólisis del complejo **1** se induce en mayor medida por efecto de la irradiación, es decir, el complejo se transforma en acuoespecies de una manera más rápida y se provoca la sustitución de los dos ligandos cloro.

Se ha evaluado también la fotoactivación de la hidrólisis del complejo *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] **2**, aunque no pudo realizarse un análisis profundo dada la proximidad de las señales en los espectros de las especies formadas en disolución. Sin embargo, el comportamiento observado parece ser similar al descrito para el complejo **1**.

5.3.2 Fotorreacciones de complejos *trans*-Pt^{II} con nucleobases

Las fotorreacciones de los complejos *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (**1**) y *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] (**2**) con las purinas 5'-GMP y 5'-AMP y pirimidina 5'-CMP (Figura 5.4) se realizaron en disolución acuosa a pH 6-7 y en una relación 1:2 (Pt:nucleótido).

Las técnicas utilizadas para estos estudios fueron la RMN ¹H, la MS y en ocasiones LC-MS. De forma general se presentan a continuación los resultados obtenidos para el complejo *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (**1**); ya que los resultados para el complejo *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] (**2**), son muy similares y se recogen en el apéndice (Figuras A5-2 y A5-3).

Para facilitar el seguimiento de este estudio, se ha establecido una nomenclatura para las diferentes especies y aductos detectadas en los espectros de RMN que se muestra en la Tabla 5.1.

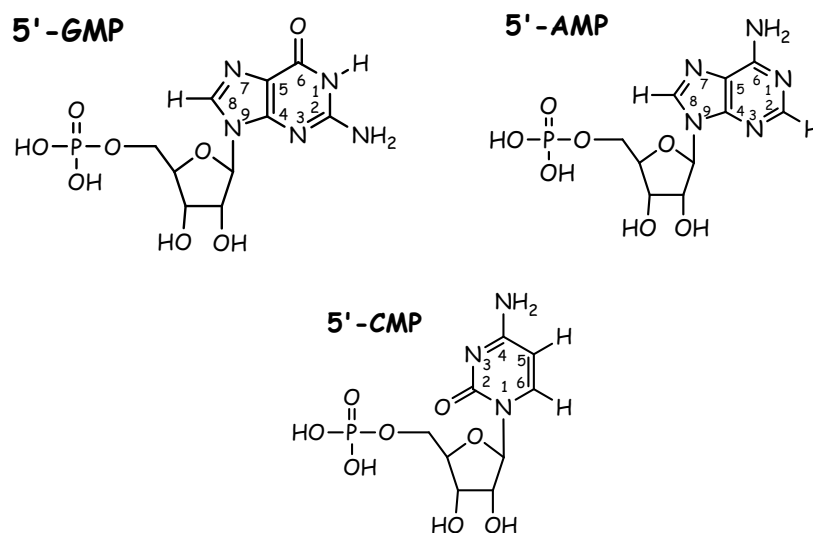


Figura 5.4 Estructuras de los nucleótidos 5'-GMP, 5'-AMP y 5'-CMP

Tabla 5.1 Numeración de aductos formados por el complejo 1 con las nucleobases 5'-GMP, 5'-AMP y 5'-CMP

monoaducto (m); [PtXL(ipa)(ma)] ⁿ⁺			bisaducto (b); [PtL ₂ (ipa)(ma)] ²⁺	
Complejo	Grupo saliente, X	Ligando nucleobase, L	Complejo	Ligando o nucleobase, L
m ₁	Cl	5'-GMP	b ₁	H ₂ O
m ₂	H ₂ O	5'-GMP	b ₂	5'-GMP
m ₃	Cl	5'-AMP	nd	H ₂ O
m ₄	H ₂ O	5'-AMP	nd	5'-AMP
m ₅	Cl	N7-9MetAde	nd	H ₂ O/N7-9MetAde
m ₆	H ₂ O	N7-9MetAde	nd	H ₂ O/N7-9MetAde
m ₇	Cl	N1-9MetAde	nd	H ₂ O/N1-9MetAde
m ₈	Cl	5'-CMP	nd	H ₂ O/5'-CMP

n.d.= no detectado

La reacción del complejo *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] (1) con las bases se realizó en la oscuridad (muestra no irradiada, **D**) y bajo irradiación (muestra irradiada, **I**) a 310 K.

Para su estudio, primero se realizó el seguimiento de las reacciones por RMN de ¹H con respecto del tiempo, hasta un total de 4 horas. Seguidamente se analizaron las concentraciones de las diferentes especies integrando las señales de RMN, y se representó la variación de dichas concentraciones[‡] y de las bases libres, respecto del tiempo (Figura 5.6). Nos referiremos a esta figura como de cinética de reacción, y nos será de gran utilidad en la discusión de especies formadas para cada una de las bases.

La señal más útil en RMN de ¹H ha sido la correspondiente al H8, tanto en la asignación de aductos como en la posición de platinación. El análisis de la variación de este protón con respecto de las bases libres permitió la asignación de aductos,¹¹¹ y su variación con respecto del pH permitió hallar la posición de coordinación del platino, ya que la platinación bloquea la protonación de los N de dichas nucleobases afectando al desplazamiento de H8.

Para confirmar la formación, asignación y análisis de los aductos de las reacciones con bases, se registraron los espectros de masas a diferentes períodos de tiempo (disolución inicial, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h). En las siguientes secciones se exponen los resultados de esta metodología.

5.3.2.1 Reacción del complejo *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] con 5'-GMP

Los espectros de RMN de ¹H registrados para la muestra no irradiada (**D**)[§] (Figura 5.5B), muestran una evolución según lo esperado para la formación de aductos con 5'-GMP.⁵⁴ En el espectro inicial, se observa un singlete a 8.84 ppm asignable al H8 de la especie mono-aducto [PtCl(5'-GMP)(ipa)(ma)]⁺ **m**₁, cuya intensidad aumenta con el tiempo. El bis-aducto [Pt(5'-GMP)₂(ipa)(ma)]²⁺ **b**₂ aparece transcurrida 1 hora de reacción, como un singlete a 8.97 ppm que también aumenta progresivamente con el tiempo.

[‡] La concentración de los bis-aductos fue calculada teniendo en cuenta la diferente relación estequiométrica

¹¹¹ Colin, G. B.; Cynthia, S. D.; Bierbach, U. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1160

[§] 100 mM NaClO₄ al 90% H₂O, pH 6-7, 310 K y relación molar 1:2 (Pt:nucleótido)

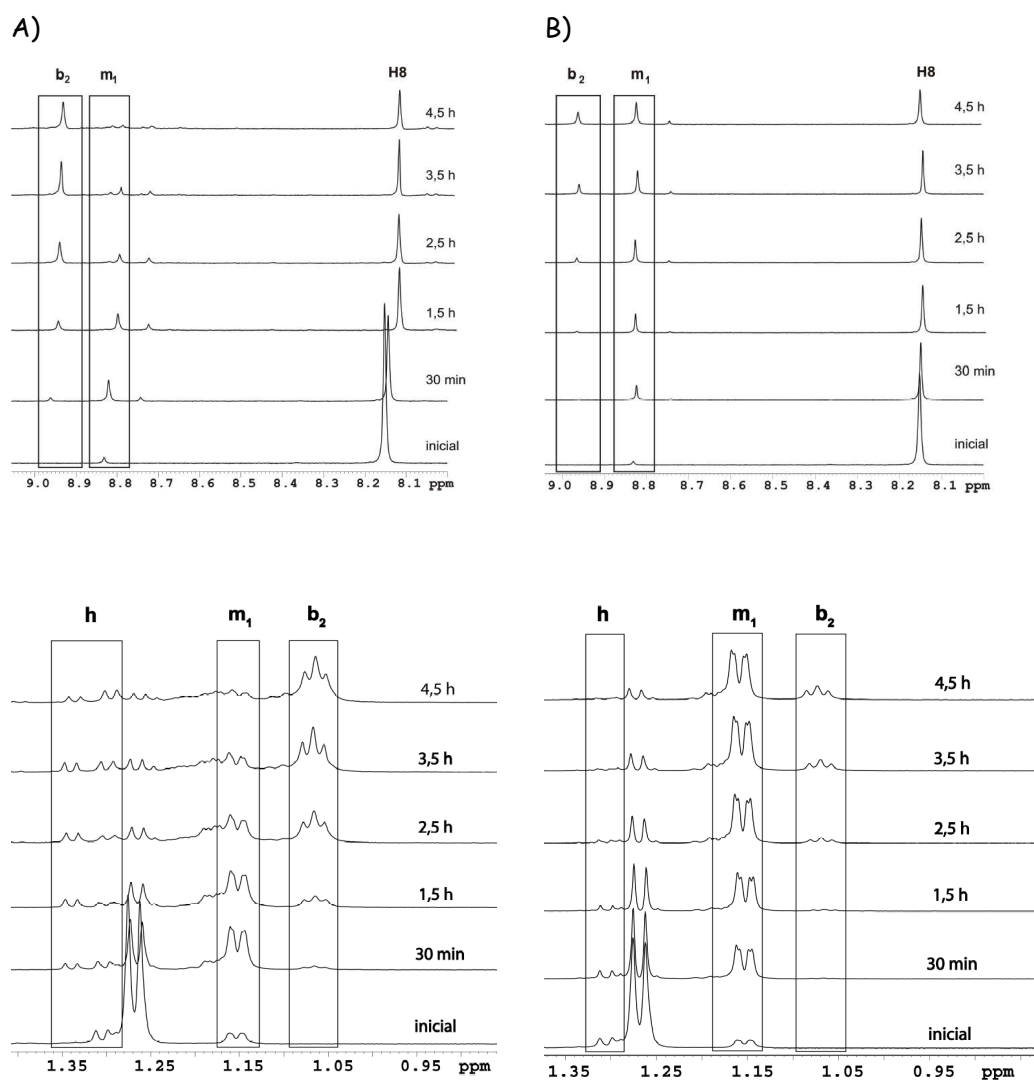


Figura 5.5 Evolución de los espectros de RMN de ^1H en la reacción del complejo **1** con la 5'-GMP^S. En la parte superior se muestra la región de las señales del H8 y en la parte inferior la de los grupos CH_3 -isopropilamina para las muestras: A) irradiada y B) en la oscuridad. Asignaciones: \mathbf{m}_1 , $[\text{PtCl}(5'\text{-GMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$; \mathbf{b}_2 , $[\text{Pt}(5'\text{-GMP})_2(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$; **H8**, 5'-GMP libre y **h**, productos de hidrólisis

La evolución de las señales m_1 y b_2 es muy diferente en la muestra irradiada (**I**) (Figura 5.5A). La intensidad de la señal m_1 ($[\text{PtCl}(5'\text{-GMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$) aumenta en la primera hora de reacción y luego comienza a decrecer. La señal b_2 ya se observa a los 30 min de irradiación, siendo su intensidad igual a la de m_1 tan sólo a las ~2 horas, y continúa aumentando con el transcurso del tiempo.

En los espectros de ambas muestras **I** y **D** se han observado otros singletes en la región del H8, pero su intensidad no llegó nunca a ser significativa. Se han detectado también señales adicionales a las de m_1 y b_2 en la región de los CH_3 de la isopropilamina (Figura 5.5) asignables por su forma y desplazamiento de ^1H , a acuospecies (**h**), siendo más abundantes en la muestra **I**. Este último hecho no es extraño teniendo en cuenta los resultados fotoquímicos obtenidos en el estudio de hidrólisis de este complejo **1** (sección 5.3.1 de este capítulo), que muestran un aumento del grado de hidrólisis bajo estas condiciones.

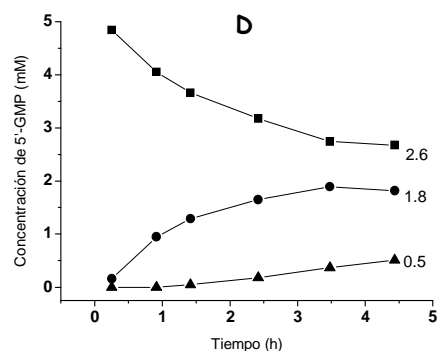
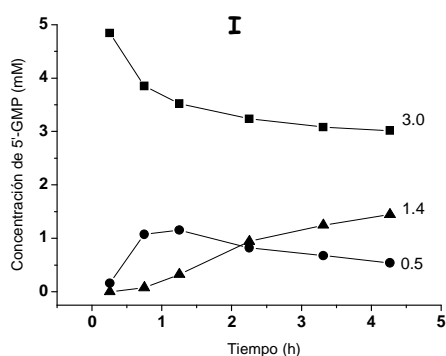
Del análisis de las gráficas de cinética de la reacción (Figura 5.6A) se puede concluir que la formación del bis-aducto se produce a mayor velocidad, y está más favorecida por efecto de la irradiación.

Como se indicó anteriormente, dependiendo de la posición de coordinación del platino a la nucleobase, la señal del H8 sufrirá una variación diferente en su desplazamiento con respecto del pH. Así, los resultados de las valoraciones fueron idénticos para ambas muestras **I** y **D**, y se recogen en la Figura 5.7. Estas curvas confirman la unión del complejo de platino al N7 de la 5'-GMP, debido a la ausencia de variación en el $\delta(\text{H8})$ a $\text{pH} < 4$ para los aductos m_1 y b_2 ; sin embargo, sí se observa esta variación en la 5'-GMP libre, la cual está asociada a la protonación que se produce en el N7.* Se observa protonación del grupo fosfato y del N1 en el rango de pH 4-11. Estos resultados están en concordancia con los datos de pK_a encontrados en la bibliografía.¹¹²

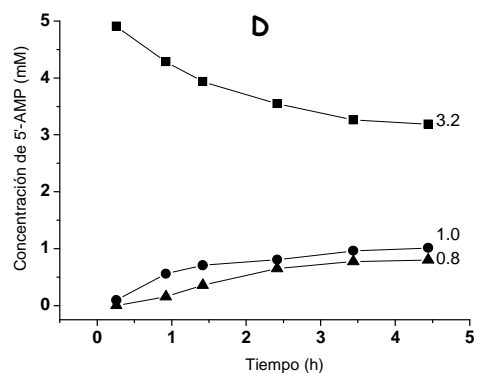
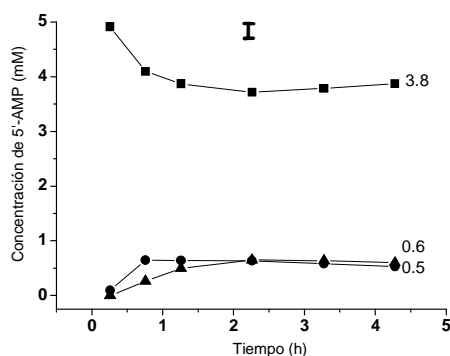
* La variación del $\delta(\text{H8})$ de la 5'-GMP libre en los espectros de la muestra irradiada **I** (Figura 5.5A) se justifica por el cambio de pH que se produce en la disolución. El pK_a del grupo fosfato del nucleótido es de 6.1 y puesto que el pH final de la disolución de la muestra **I** es 6.05, se puede asociar esta variación del $\delta(\text{H})$ del H8 con la protonación del grupo fosfato. El pH final, medido para la muestra **D**, fue de 6.3

¹¹² Dawson R. M. C. *Data for Biochemical Research*, Oxford, Clarendon Press. 1959

A) 5'-GMP



B) 5'-AMP



C) 5'-CMP

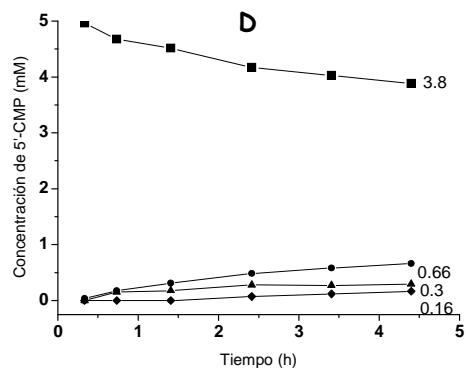
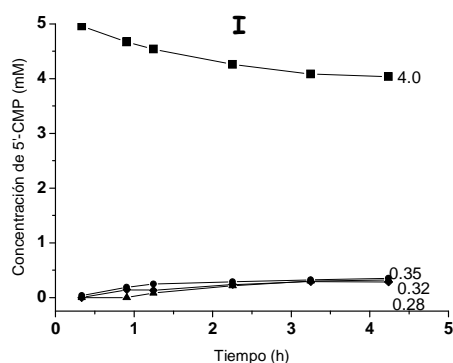


Figura 5.6. Cinética de la reacción del complejo 1 con A) 5'-GMP B) 5'-AMP y C) 5'-CMP para las muestras irradiada I y en la oscuridad D. Asignaciones: ■ 5'-GMP libre, ● aducto m_1 y ▲ aducto b_2 ; ■ 5'-AMP libre, ● aducto m_3 y ▲ aducto m_4 ; ■ 5'-CMP libre, ● aducto m_8 y ▲, ◆ otros aductos u^J

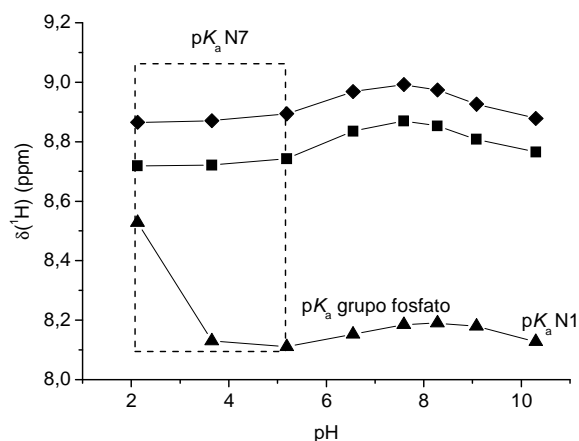


Figura 5.7 Variación del desplazamiento químico frente al pH de la señal del H8 observada en los aductos formados en la reacción del complejo **1** con 5'-GMP. Asignaciones: ▲, 5'-GMP libre (H8); ■, m_1 ($[PtCl(5'-GMP)(ipa)(ma)]^+$) y ◆, b_2 ($[Pt(5'-GMP)_2(ipa)(ma)]^{2+}$)

Los resultados obtenidos por espectrometría de masas confirman de forma inequívoca las especies detectadas y asignadas por RMN. Dichas especies son asignadas a los siguientes picos: 665.14 m/z [$M^{2+}-H^+$] que se corresponde con la masa molecular de la especie *trans*- $[Pt(H_2O)(5'-GMP)(ipa)(ma)]^{2+}$; 684.12 m/z [M^+] y 706.09 m/z [$M^+-H^++Na^+$] con la especie *trans*- $[PtCl(5'-GMP)(ipa)(ma)]^+$; 1002.14 m/z [$M^{2+}-H^+$] con la especie $\{(\mu-5'-GMP)[PtCl(ipa)(ma)]_2\}^{2+}$ y 1010.23 m/z [$M^{2+}-H^+$] y 1032.18 m/z [$M^{2+}-2H^++Na^+$] con la especie $[Pt(5'-GMP)_2(ipa)(ma)]^{2+}$ (Figura A5-4 apéndice).

De la comparación de estos espectros se observa que los picos de mayor intensidad corresponden a los de la especie mono-aducto m_1 en la muestra **D** (665.14, 684.12 y 706.10 m/z), mientras que aquellos asignados a la especie bis-aducto b_2 (1010.23 y 1032.18 m/z) son los de mayor intensidad en la muestra irradiada **I**.

Dada la buena correlación existente entre los resultados obtenidos con las técnicas utilizadas, se puede afirmar que la fotoquímica induce una mayor formación de bis-aductos en la reacción del complejo **1** con la 5'-GMP.

5.3.2.2 Reacción del complejo *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] con 5'-AMP

La reacción del complejo **1** con la 5'-AMP se realizó en las mismas condiciones que con la 5'-GMP y según la metodología ya descrita.

En los espectros de RMN ¹H (Figura 5.8) en la región de H8 se observan dos series de señales dobles^ξ a 9.26 ppm (**m**₃) y 9.15 ppm (**m**₄) en ambas muestras. Este mismo tipo de señales se detecta en la región del H2, y podrían indicar la presencia de dos especies distintas de aductos Pt:5'-AMP.^θ El espectro de RMN 2D [¹H,¹³C] HMQC (Figura 5.9) nos permite confirmar que las señales de estas dos series **m**₃ y **m**₄ corresponden a H8 y H2, ya que se observa su correlación con las señales de sus respectivos carbonos C8 y C2.

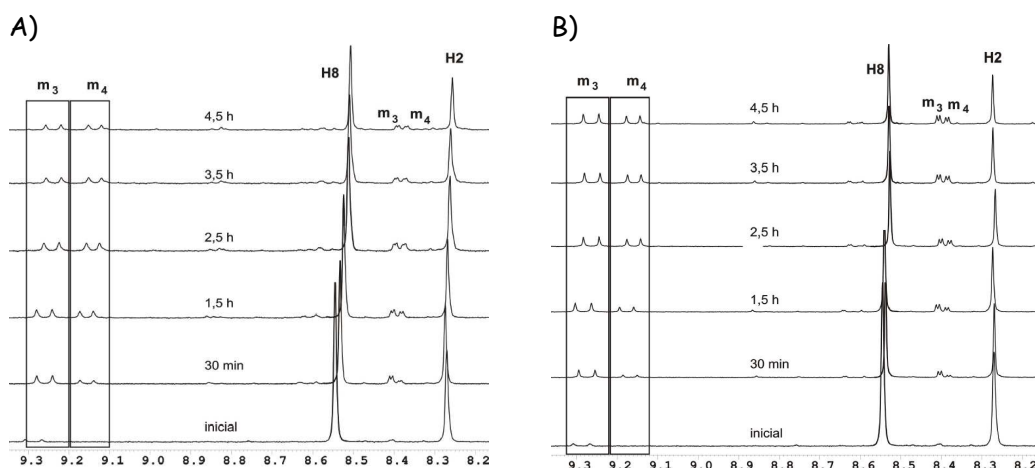


Figura 5.8 Evolución de los espectros de RMN de ¹H en la reacción del complejo **1** con la 5'-AMP. Se muestra la región de las señales del H8 y H2 para las muestras: A) irradiada **I** y B) en la oscuridad **D**. Asignaciones: **m**₃ [PtCl(5'-AMP)(ipa)(ma)]⁺ y **m**₄ [Pt(H₂O)(5'-AMP)(ipa)(ma)]²⁺ y **H8**, **H2** 5'-AMP libre^φ

^ξ δ(¹H) medidos en el centro de las señales

^θ Esta misma serie de señales se observa en los espectros registrados para la reacción de esta base con el complejo **2** (Figura A5-3 apéndice)

^φ como se mencionó para la 5'-GMP, la ligera variación en el δ(H8) de la 5'-AMP libre se asocia a la protonación del grupo fosfato (pK_a 6.1). El pH final en ambas muestras fue de ~6.1

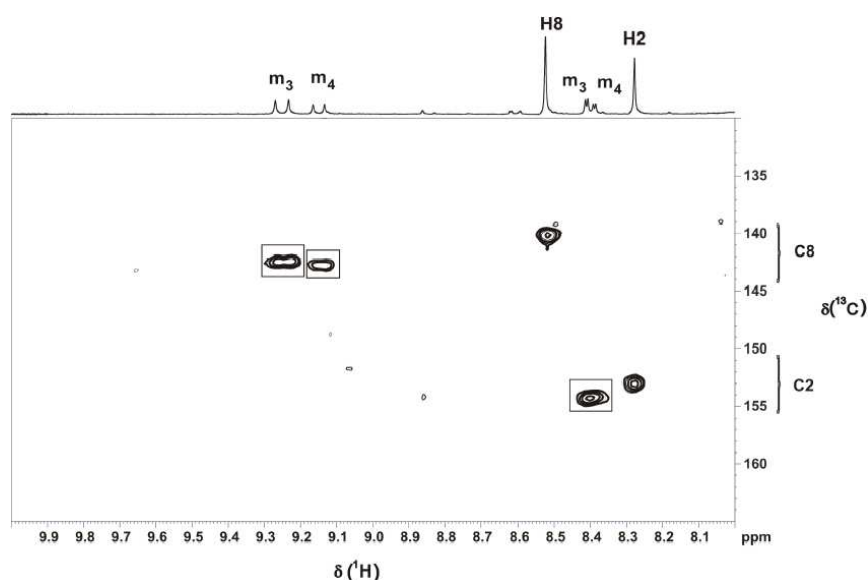


Figura. 5.9 Espectro de RMN 2D [^1H , ^{13}C] HMQC de la reacción del complejo **1** con la 5'-AMP tras 4 horas. Se muestran las regiones de las señales **H8/C8** y **H2/C2**. Asignaciones: **m₃**, **m₄** (N7-aductos) y **H8**, **H2** 5'-AMP libre

La intensidad de las señales correspondientes al H8 de los aductos, bien sean rotámeros o aductos distintos, es mayor en la muestra **D** (no irradiada) que en la **I** (irradiada) (Figura 5.6B). Así, en este caso y a diferencia de lo observado para la reacción con la 5'-GMP la irradiación no induce la formación de aductos con la 5'-AMP (Figura 5.6A y B).

La confirmación de las especies, una vez más, se realizó por MS. Los picos que se observaron fueron los siguientes: 649.16 m/z [$\text{M}^{2+}-\text{H}^+$] asignable a la especie $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(5'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$, 668.12 [M^+] y 690.10 m/z [$\text{M}^+-\text{H}^++\text{Na}^+$] a la especie $[\text{PtCl}(5'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$, 968.19 m/z [$\text{M}^{3+}-2\text{H}^+$] a la especie $\{(\mu\text{-}5'\text{-AMP})\{[\text{PtCl}(\text{ipa})(\text{ma})][\text{PtH}_2\text{O}(\text{ipa})(\text{ma})]\}\}^{3+}$ y 986.14 m/z [$\text{M}^{2+}-\text{H}^+$] a la especie $\{(\mu\text{-}5'\text{-AMP})[\text{PtCl}(\text{ipa})(\text{ma})]_2\}^{2+}$ (Figura A5-5 apéndice).

La especie bisaducto $[\text{Pt}(5'\text{-GMP})_2(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$, que se observa en la reacción de *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{ipa})(\text{ma})]$ con la 5'-GMP (**b₂**) como producto mayoritario, no fue detectada en la reacción con la 5'-AMP, y fueron los monoaductos $[\text{PtCl}(5'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$ y $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(5'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$, que no rotámeros,* los productos mayoritarios. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos por RMN en los que aparecían dos señales distintas **m₃** y **m₄**.

* Los espectros de RMN de ^1H de estas muestras no mostraron cambios significativos como coalescencia o ensanchamiento de señales con el aumento de la temperatura (323K)

La gráfica en la Figura 5.10 muestra la variación del $\delta(\text{H8})$ en los aductos frente al pH.^o Durante la valoración no se detectó la protonación de los nitrógenos N3 y N1^o; sin embargo, este hecho no nos sorprende si tenemos en cuenta que en algunos modelos de bases, la protonación en el N7 produce una acidificación en las otras posiciones (nitrógenos) de coordinación de la base.¹¹³

Es sorprendente como la irradiación facilita la formación de bisaducto con la 5'-GMP y en la 5'-AMP no se llega a detectar.

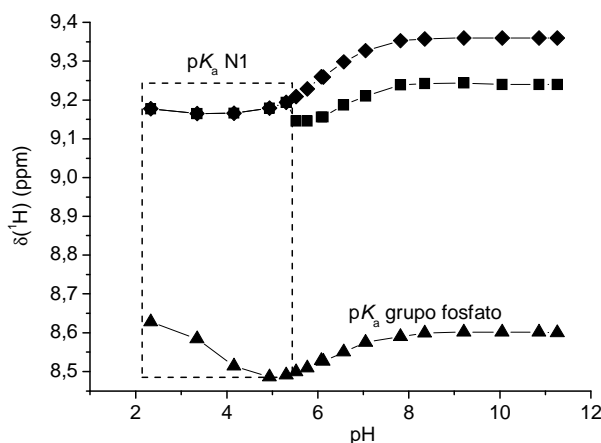


Figura 5.10 Variación del desplazamiento químico frente al pH de la señal del H8 de los aductos formados en la reacción del complejo **1** con 5'-AMP y la base libre. Asignaciones: ▲ 5'-AMP libre; ◆ aducto **m₃** y ■ aducto **m₄**

Un resultado realmente interesante de este experimento es la coalescencia de las señales de los monoadductos **m₃** ($[\text{PtCl}(\text{5}'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^{+}$) y **m₄** ($[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(\text{5}'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$) en el espectro de RMN al llevar las disoluciones a un pH < 5 (Figura A5-6 apéndice)^x. Estudios posteriores mostraron que esta evolución es irreversible.

^o Al igual que en la reacción de 5'-GMP, los resultados obtenidos en estas valoraciones fueron análogos para ambas muestras **I** y **D**, por lo que no se especifica la muestra en la que se realizaron los experimentos

^o La curva de valoración de la 5'-AMP libre muestra en el $\delta(\text{H8})$ las variaciones correspondientes a los pKas del grupo fosfato y N1

¹¹³ Kampf, G.; Luth, M. S.; Kapinos, L. E.; Muller, J.; Holy, A.; Lippert, B.; Sigel, H. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1899

^x a pH básico se observa el aumento de la intensidad de la señal del aducto **m₄** en relación al **m₃**

El estudio de LC-MS de esta reacción fue fundamental para comprender la evolución de las especies y para la caracterización de la señal del aducto observado en condiciones de pH ácido.[‡] El cromatograma obtenido muestra dos picos **a** (6.9 min) y **b** (15.4 min) (Figura A5-7 apéndice), cuyos espectros de masas indican que el pico **b** (348.06 m/z [M^+]) corresponde a la 5'-AMP libre y el pico **a** (668.09 m/z [M^+]) a la especie $[PtCl(5'-AMP)(ipa)(ma)]^+$, luego esta especie debe corresponder a la señal m_3 observada a pH ácido en RMN (Figura A5-7 apéndice).

Para tratar de clarificar la multiplicidad observada en las señales de los aductos Pt:5'-AMP en los espectros de RMN se llevaron a cabo estudios con la nucleobase modificada 9MetAde.

5.3.2.3 Reacción del complejo *trans*- $[PtCl_2(ipa)(ma)]$ con 9-MetAde

La elección de la 9MetAde (Figura 5.11) está justificada debido a sus características estructurales: ausencia del grupo fosfato y presencia, como en la 5'-AMP, del grupo NH_2 en el C6, ya que la explicación más razonable para la multiplicidad observada en la reacción con la 5'-AMP, debe basarse en algún tipo de interacción que afecte a la rotación en torno al enlace Pt-N. Se describen a continuación los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos.

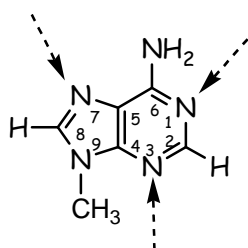


Figura 5.11 Estructura de la 9MetAde y su posibles posiciones de coordinación

Los espectros de RMN ¹H registrados a diferentes períodos de tiempo de la reacción del complejo **1** con la 9MetAde se muestran en la Figura 5.12. En las regiones de los protones H8 y H2 se observan nuevas señales correspondientes a la formación de aductos.

[‡] la utilización de un 1% de TFA como par iónico en esta técnica nos aseguró un pH ácido durante el experimento

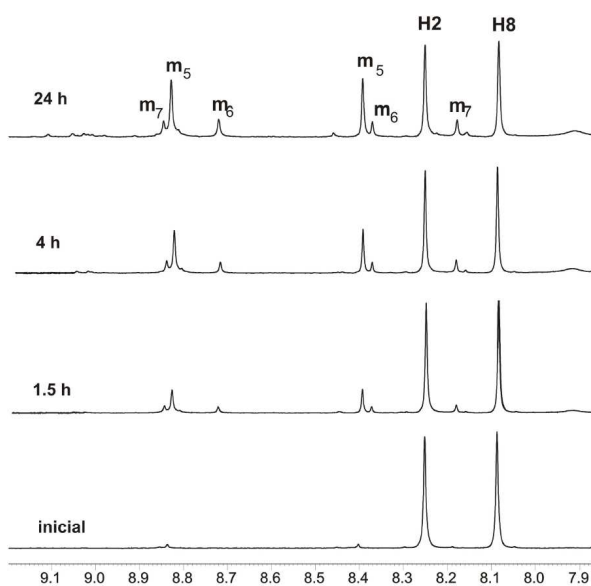


Figura 5.12 Evolución de las señales en los espectros de RMN ¹H para la reacción del complejo 1 con la 9MetAde. Asignaciones: aducto m₅ (Cl/N7-9MetAde); aducto m₆ (H₂O/N7-9MetAde); aducto m₇ (Cl/N1-9MetAde) y H₂, H₈ 9MetAde libre

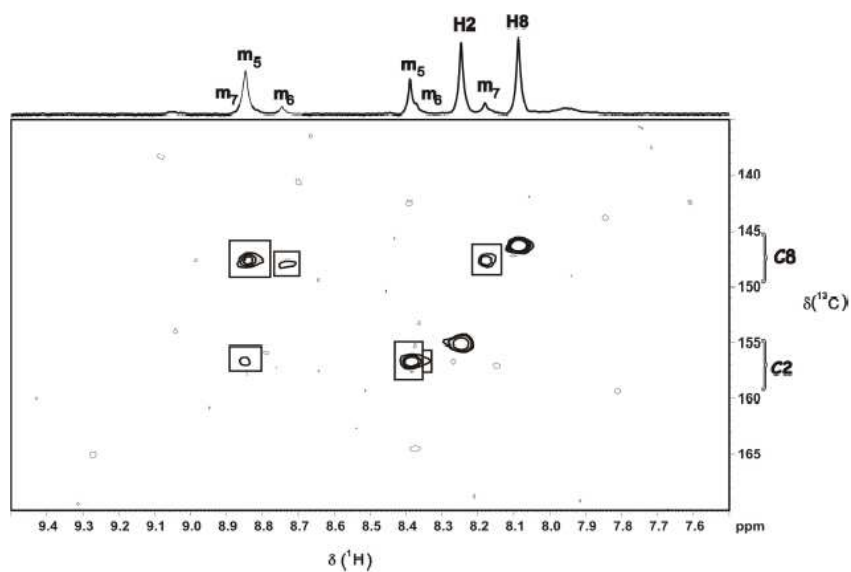


Figura 5.13 Espectro de RMN 2D [¹H,¹³C] HMQC tras 4 horas de reacción del complejo 1 con la 9MetAde. Asignaciones: aducto m₅ (Cl/N7-9MetAde); aducto m₆ (H₂O/N7-9MetAde); aducto m₇ (Cl/N1-9MetAde) y H₂, H₈ 9MetAde libre

El espectro 2D [^1H , ^{13}C] HMQC (Figura 5.13) nos permitió la asignación de los protones H8 y H2 de los aductos, que a diferencia de con la 5'-AMP no son dobles señales. El aducto mayoritario \mathbf{m}_5 presenta de la señal H8 a 8.83 ppm con una $\Delta\delta^{\Xi}$ de 0.7 ppm a campo más bajo, con respecto a la 9MetAde libre, y su señal H2 a 8.39 ppm con una $\Delta\delta$ de tan sólo 0.15 ppm. El cambio más pronunciado se produce en la señal del H8, indicativo de coordinación al N7 de la 9MetAde en el aducto \mathbf{m}_5 .

En el aducto \mathbf{m}_7 la señal del H8 sufre un $\Delta\delta$ de 0.09 ppm y la señal H2 de 0.6 ppm. En este caso, el mayor desplazamiento se produce en la señal del H2 y también a campos más bajos, luego se está produciendo una coordinación al N1 de la 9MetAde en el aducto \mathbf{m}_7 .

Finalmente, el aducto \mathbf{m}_6 presenta un $\Delta\delta(\text{H8})$ de 0.6 ppm y un $\Delta\delta(\text{H2})$ de 0.12 ppm. Las variaciones coinciden con las observadas para el aducto \mathbf{m}_5 , por lo que podemos proponer una coordinación al N7 con un ligando en posición *trans* diferente al del aducto \mathbf{m}_5 , lo que justificaría además las ligeras diferencias en los $\delta(^1\text{H})$ entre \mathbf{m}_5 y \mathbf{m}_6 .

Ninguna de las señales de los aductos formados en la reacción con la 9MetAde mostraron la doble señal en los espectros de RMN observada para la 5'-AMP. Las señales dobles de los H8 en los aductos de la 5'-AMP deben ser causadas por algún tipo de interacción que requiere la presencia del grupo fosfato, o al menos éste es un factor importante ya que los aductos con la 9MetAde no muestran esta característica.

Los espectros de masas registrados para esta reacción presentan un pico a 470.12 m/z [M^+], asignable a la especie $[\text{PtCl}(9\text{MetAde})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$ con dos posibilidades, coordinación a N7 o a N1, ya que ambos aductos poseen el mismo peso molecular (Figura A5-8A apéndice). Otro pico aunque de muy poca intensidad fue detectado a 451.15 m/z, asignable a la especie $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(9\text{MetAde})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$.

Dado que en los espectros de RMN ^1H de la reacción de la 5'-AMP se produjo la coalescencia de las señales de los aductos a pH ácido, y que en el espectro de masas se detectó únicamente el pico asignable al aducto monocloro, decidimos comprobar si este comportamiento se repetía en el caso de la 9MetAde. Esto además nos ayudaría a clarificar la posición de coordinación del aducto $[\text{PtCl}(9\text{MetAde})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$ mencionado con anterioridad.

En los espectros de RMN ^1H de la 9MetAde al llegar a pH ácido (Figura A5-9 apéndice) se produce la coalescencia de las señales de los aductos \mathbf{m}_5 y \mathbf{m}_6 , de

$\Xi \Delta\delta$ definido como $\delta(\text{aducto}) - \delta(\text{base})$ libre

igual modo a como ocurría en la evolución del aducto monoacuo (m_4) a monocloro (m_3) en la 5'-AMP.

La reacción con 9MetAde llevada a condiciones ácidas[†] muestra como en los espectros de masas el pico asignado al aducto acuo (451.15 m/z) desaparece y sólo la especie $[\text{PtCl}(9\text{MetAde})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$ (470.12 m/z) está presente en disolución (Figura A5-8A y B apéndice). Este hecho concuerda con lo observado en los espectros de masas de la reacción de la 5'-AMP.

Nuestra interpretación de lo que ocurre en dichas disoluciones a pH ácido sería la sustitución del ligando acuo por cloro en los aductos (m_6 y m_4). Esta transformación, en presencia de una mínima cantidad de Cl^- , nos parece muy interesante, ya que de los iones presentes en disolución Cl^- , TFA^- (presente en los estudios de LC-MS), ClO_4^- (presente en los estudios de RMN) y/o H_3O^+ , el más coordinante es el Cl^- .

Este hecho sólo ha sido observado en una ocasión en la bibliografía, también con complejos *trans* de platino¹¹⁴ aunque con diferentes concentraciones, lo que nos sirve de base para nuestra interpretación.

5.3.2.4 Reacción del complejo *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{ipa})(\text{ma})]$ con 5'-CMP

Los espectros de RMN de ^1H de la reacción del complejo **1**, *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{ipa})(\text{ma})]$, con la 5'-CMP (Figura 5.14; región del H6) muestran la formación de aductos cuyas señales aparecen como dobletes en la región de los H5 y H6, comunes en este tipo de aductos.¹¹⁵ Se observa la señal de un aducto mayoritario m_8 (8.16 ppm), y otras señales adicionales correspondientes a otros aductos minoritarios **u** (8.04 y 8.11 ppm) cuya asignación no ha podido realizarse.

En la Figura 5.6 que muestra la cinética de la formación de los aductos con el complejo **1**, se observa que la concentración del aducto mayoritario m_8 en la muestra **D** es superior con respecto a la muestra **I**. Estas diferencias, sin embargo, no son significativas si se comparan con las observadas para la 5'-GMP. Por tanto podemos concluir que la irradiación no induce la formación de aductos del complejo **1** con la 5'-CMP.

Las curvas de valoración de la reacción con 5'-CMP (Figura 5.15) muestran la ausencia de cambios en el $\delta(\text{H6})$ a $\text{pH} < 5$, lo que confirma la unión del complejo al N3. Nuevamente, como en los casos descritos para la 5'-AMP y 9MetAde, sólo un aducto es detectado en la disolución a pH ácido (Figura A5-10 apéndice). Los

¹¹⁴ Liu, Y.; Sivo, M. F.; Natile, G.; Sletten, E. *Metal Based Drugs*. **2000**, *7*, 169

¹¹⁵ Bierbach, U.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 3657

espectros de masas de ambas muestras confirman la presencia de la especie $[\text{PtCl}(5'\text{-CMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$ con picos a 644.10 $[\text{M}^+]$ y 666.07 $[\text{M}^+-\text{H}^++\text{Na}^+]$ m/z, (Figura A5.11 apéndice).

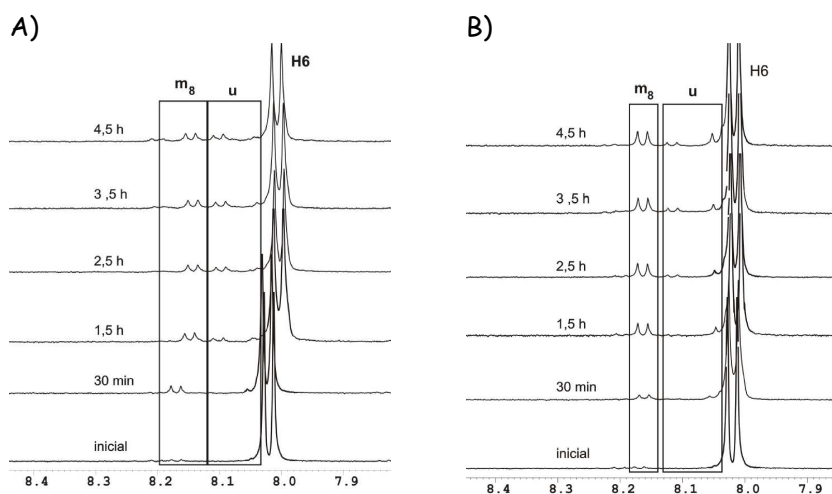


Figura 5.14 Evolución de los espectros de RMN de ^1H en la reacción del complejo **1** con la 5'-CMP. Se muestra la región de las señales del H6 para las muestras: A) irradiada **I** y B) en la oscuridad **D**. Asignaciones: m_8 $[\text{PtCl}(5'\text{-CMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$, **u** otros aductos y **H6** 5'-CMP libre

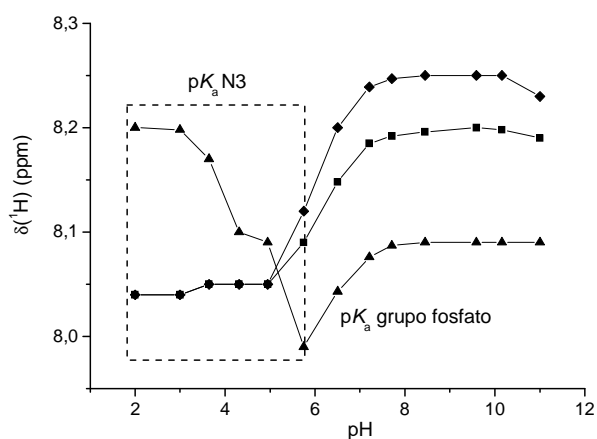


Figura 5.15 Variación del desplazamiento químico frente al pH de la señal del H6 de los aductos formados en la reacción del complejo **1** con 5'-CMP y la base libre. Asignaciones: \blacktriangle 5'-AMP libre; \blacklozenge aducto m_8 y \blacksquare aducto **u**

La fotorreacción del complejo **1** con 5'-CMP es similar a la observada con 5'-AMP, siendo definitivamente la reacción con 5'-GMP la más favorecida bajo irradiación.

Capítulo 6. Fotoquímica y electroquímica de
complejos dihidroxo *trans*-Pt^{IV}

6.1 Introducción

Fotoquímica

El grupo de investigación del Prof Sadler ha desarrollado recientemente compuestos fotosensibles de Pt^{IV} análogos al cisplatino.^{46,53} La citotoxicidad de dichos compuestos tras su fotoactivación es comparable con la del cisplatino. Por lo tanto, la síntesis, diseño y desarrollo de complejos de Pt^{IV} que pudieran ser fotoactivados directamente en el tumor mediante láser se presenta como un nuevo campo de investigación, que podría conducir al desarrollo de nuevos fármacos de mayor selectividad y menor toxicidad.

La fotoquímica se presenta como un mecanismo de reducción de gran aplicación experimental para complejos de Pt^{IV}. El papel de los ligandos en el complejo, podría en principio ser fundamental en su fotosensibilidad. Así, por ejemplo, con ligandos reductores los complejos podrían sufrir reacciones fotoquímicas, entre las que se incluye la reducción.

En este campo de investigación, uno de los aspectos por analizar es la necesidad de la presencia de ligandos reductores en la estructura del complejo para su fotoactivación y con este propósito se realizó el estudio de la fotorreducción del complejo *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)].

Electroquímica

Se ha demostrado que los potenciales de reducción de los complejos de Pt^{IV} están en relación con su facilidad de reducción o más concretamente con el tiempo que un complejo de Pt^{IV} permanece inalterado en el medio biológico antes de ser reducido a Pt^{II}.¹¹⁶ Dado que se sabe que las especies de Pt^{IV} son reducidas antes de su unión al ADN, la facilidad de reducción es un factor determinante para su actividad antitumoral. Una reducción demasiado rápida podría conducir a reacciones secundarias asociadas a especies de Pt^{II} más reactivas. Por el contrario una reducción muy lenta conduciría al paso del complejo a través del cuerpo sin que este ejerciera ninguna actividad.

Hay muchos factores que regulan los potenciales de reducción de complejos de Pt^{IV}, siendo los ligandos axiales los que generalmente ejercen una mayor

¹¹⁶ Choi, S.; Filotto, C.; Bisanzo, M.; Delaney, S.; Lagasee, D.; Whitworth, J. L.; Jusko, A.; Li, C.; Wood, N. A.; Willingham, J.; Schwenker, A.; Spaulding, K. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2500

influencia. Para una serie de complejos *trans*-Pt^{IV}(amina) se ha encontrado que la facilidad de reducción sigue el orden OH < OAc < Cl.^{117,118}

Los estudios realizados para los complejos de Pt^{IV} que se han ensayado en triadas clínicas (Figura 6.1: iproplatino, tetraplatino y JM216) han mostrado que existe una relación entre el potencial de reducción y su farmacología.⁵¹ Así pues, parece ser que el potencial de reducción es un factor importante en el diseño de nuevos fármacos de platino. Sin embargo, otros resultados obtenidos para complejos de Pt^{IV} con diversas estructuras muestran como su actividad depende más de la actividad mostrada por su análogo de Pt^{II}.⁵¹

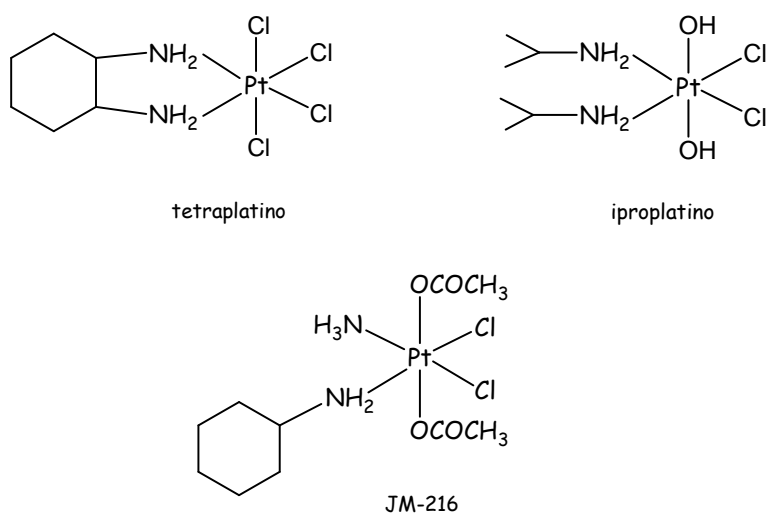


Figura 6.1 Estructura de los fármacos de platino ensayados en triadas clínicas

En este contexto nos planteamos estudiar el comportamiento electroquímico de los complejos de Pt^{IV} de esta Tesis para analizar la influencia e importancia del potencial de reducción de estos complejos en la actividad citotóxica observada (Capítulo 3).

¹¹⁷ Hambley, T. W.; Battle, A. R.; Deacon, G. B.; Lawrenz, E. T.; Fallon, G. D.; Gatehouse, B. M.; Webster, L. K.; Rainone, S. J. *Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 3

¹¹⁸ Ellis, L. T.; Er, H. M.; Hambley, T. W. *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 793

6.2 Experimental

6.2.1 Preparación de muestras

6.2.1.1 Fotoquímica

Las disoluciones utilizadas en los experimentos fueron preparadas partiendo de una inicial de platino de 2.5 mM.

Las medidas de pH se realizaron con un pHmetro Martini Mi150 (Progen Scientific Ltd) con un microelectrodo Thermo Fisher Scientific. Todas las mediciones fueron a 298 K y la calibración se realizó con disoluciones estándar de pH 4.0 y 7.0. El pH de las disoluciones en cada experimento fue ajustado manteniendo siempre en un rango de 6.7-6.3. Los ajustes de pH en las disoluciones se realizaron añadiendo cantidades en escala micromolar de disoluciones 0.1 M y 0.1 de HClO₄ o NaOH.

6.2.1.2 Electroquímica

Se prepararon disoluciones 100 mM de NaClO₄ (utilizado como soporte electrolítico) de concentración final de platino 5 mM. Previamente a realizar las medidas, las muestras fueron purgadas para la eliminación de oxígeno mediante el paso una corriente de argon durante 10 min.

Para las medidas de pH se utilizó un pHmetro HI991002 (Hanna instruments) calibrado utilizando tampones estándar de pH 6.9 y 4.0.

6.2.2 Técnicas de caracterización

Resonancia Magnética Nuclear

(ver sección 5.2.3, capítulo 5)

Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas

(ver sección 5.2.4, capítulo 5)

6.2.3 Irradiación

La fuente de irradiación se generó con un fotorreactor Luzchem LZC-ICH2 con lámparas Luzchem LZC-UVA (Hitachi) y LZ-VIS (Sylvania cool white) que

operaba a 365 nm y con un controlador de temperatura que se mantuvo a 310 K, con lo que la irradiación fue de 1.9 mW/cm².^{*} La potencia de irradiación fue monitorizada con un medidor OAI-306 UV (Optical Associates, Inc)

6.2.4 Voltametría cíclica

Las medidas electroquímicas fueron realizadas en un equipo BAS 100B/W, utilizando como electrodo de trabajo carbono vítreo (0.07 cm²), como electrodo de referencia el de Ag/AgCl (NaCl 3 M) y como electrodo auxiliar un alambre de platino. Este último fue pulido antes de su uso con una pasta de alúmina y lavado con agua.

^{*} Esta irradiación de UVA corresponde a ~5 Jcm⁻² (1.77 mWcm⁻²; λ 365nm) que equivale a la exposición solar de 30-60 días (Escocia).ref ⁵⁰

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Fotoquímica

Los estudios fotoquímicos del complejo *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ipa)] (**3-IV**) fueron realizados en disolución acuosa (pH ~ 6) utilizando las técnicas de RMN de ¹H y LC-MS.

Como en todos los estudios de fotoactivación, se realizaron los experimentos simultáneamente en dos muestras manteniendo una de ellas en la oscuridad (**D**) y sometiendo otra a irradiación (**I**).

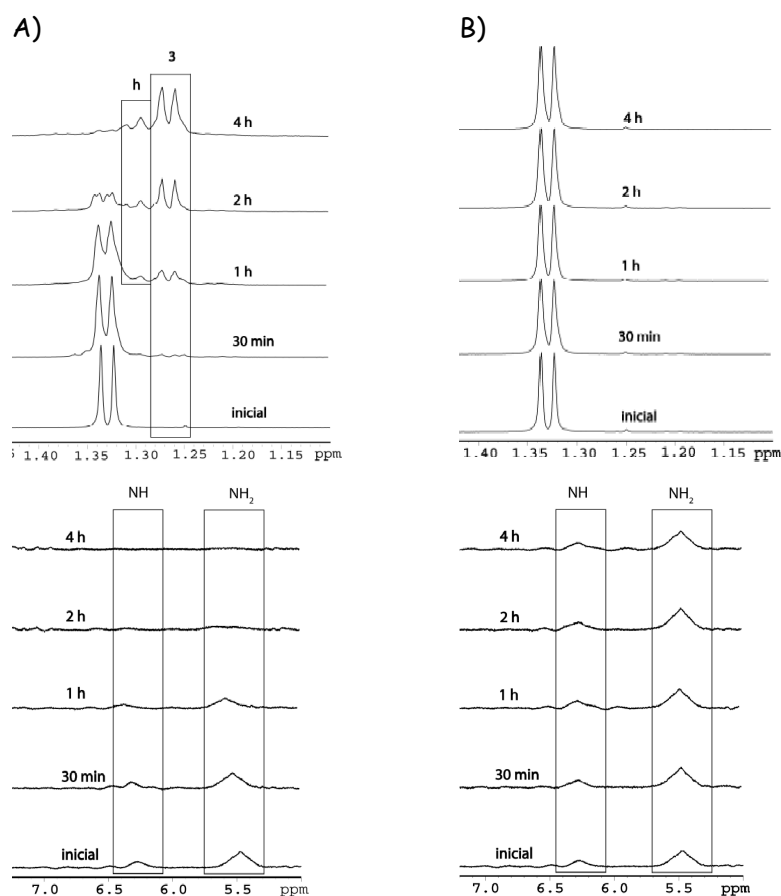


Figura 6.1 Espectros de RMN de ¹H de la disolución del complejo **3-IV** por RMN ¹H para las muestras: A) irradiada **I** y B) en la oscuridad **D**. En los espectros se muestra la región de los grupos CH₃ de la isopropilamina. Asignaciones: **3**, especies asignables a Pt^{II}, **h** productos de fotosustitución

En los espectros de RMN de ¹H de la muestra no irradiada (**D**) se observan sólo picos asignables al complejo *trans*-Pt^{IV} **3-IV** lo que pone de manifiesto su estabilidad en disolución (Figura 6.1B), sin embargo en la muestra irradiada **I** se aprecian cambios significativos en tan sólo 1 hora (Figura 6.1A). Aparecen nuevos picos en la región de los grupos CH₃ de la isopropilamina, que por su desplazamiento químico podrían corresponder a los del complejo análogo de Pt^{II} *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] **3**. Se observa también la desaparición de las señales en la región de los grupos Pt^{IV}-NH₂ y NH (señales anchas a 6.28 y 5.43 ppm) (Figura 6.1), mientras que otras señales nuevas son visibles en la región del grupo Pt^{II}-NH₂ (señal ancha a 4.04 ppm). Adicionalmente en los espectros de esta muestra **I** se observaron señales (**h**) posiblemente debidas a la formación de subproductos como consecuencia de la fotosustitución durante la fotoactivación del complejo **3-IV** (Figura 6.1A). Este hecho demuestra que se está produciendo la fotorreducción del complejo **3-IV** por efecto de la irradiación.

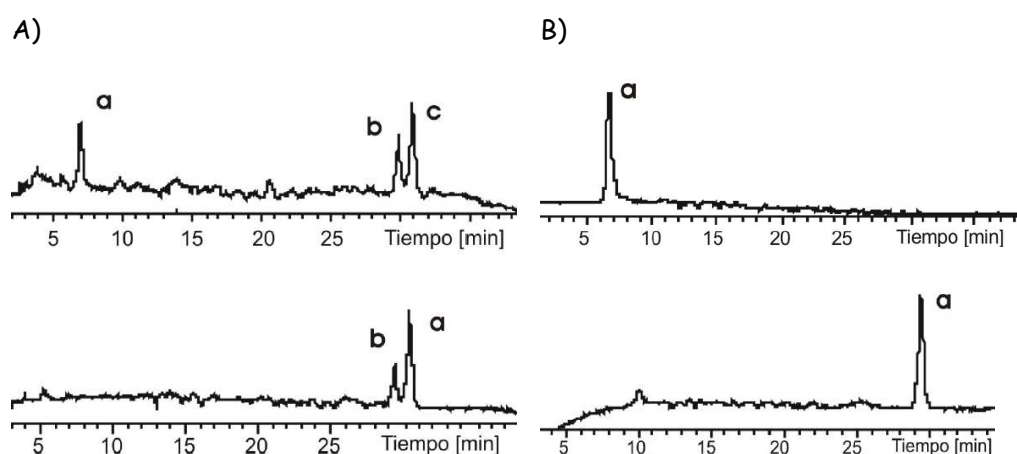


Figura 6.2 Cromatogramas de las disoluciones acuosas de los complejos **3-IV** (arriba) y **3** (abajo) tras 4 horas A) irradiación y B) en la oscuridad

La caracterización de estas muestras por LC-MS parece no sólo confirmar lo observado por RMN, sino que ayuda a la caracterización de los productos formados y de su comportamiento en disolución.

Como hemos venido haciendo metodológicamente en la caracterización de especies creímos necesario corroborar la existencia de Pt^{II}/Pt^{IV} por LC-MS.

En la Figura 6.2 (arriba) se muestran los cromatogramas de las muestras **D** e **I** obtenidos tras 4 horas de disolución del complejo **3-IV**. En el cromatograma de

la muestra **I** (Figura 6.2A arriba), se detectaron además del pico **a**,[‡] otros dos nuevos **b** y **c** con un tiempo de retención de 29.3 y 30.3 min, respectivamente, mientras que la muestra **D** no mostró cambio alguno. Los espectros de masas de los picos **b** y **c** son idénticos y muestran el ion molecular 376.05 m/z [$M^+ - H^+ + Na^+$] asignable a la especie $[PtCl(H_2O)(dma)(ipa)]^+$ y otro pico posiblemente de fragmentación de alguna especie del complejo a 297.02 m/z (Figura A6-2).

Estos resultados indican sin duda alguna la presencia de especies del complejo de Pt^{II} (**3**) en la muestra **I** corroborando lo observado en RMN.

También realizamos estudios de caracterización por LC-MS semejantes para el complejo análogo de Pt^{II} *trans*- $[PtCl_2(dma)(ipa)]$ (**3**) esperando que los cromatogramas y sus espectros coincidieran con las muestras irradiadas del complejo de Pt^{IV} **3-IV** (Figura 6.2 abajo). Los picos presentes en el espectro de masas corresponden a las especies $[PtCl(H_2O)(dma)(ipa)]^+$ y a productos de fragmentación de alguna acuo especie (Figura A6-3). Con esta información podemos finalmente confirmar que las especies observadas en el cromatograma obtenido del complejo **3-IV** pueden identificarse como especies de Pt^{II} del cromatograma del complejo **3**. Los resultados muestran una fotoactivación de la hidrólisis de este complejo **3**.^{*}

Adicionalmente, para el complejo **3-IV** se registró el espectro de RMN ^{195}Pt de la muestra **I** antes y después de su irradiación. En el espectro inicial se observa un único pico cuyo $\delta(^{195}Pt)$ corresponde al conocido del complejo **3-IV** (798 ppm). Tras la irradiación, sin embargo, se observa otra señal a -2188 ppm cuyo desplazamiento químico se corresponde con el del complejo análogo de Pt^{II} **3**.

Hemos demostrado que irradiando el complejo **3-IV** en disolución se provoca su reducción.

6.3.2 Electroquímica

Se han realizado estudios de voltametría cíclica (CV) de los complejos: *trans*- $[PtCl_2(OH)_2(ipa)(ma)]$ **1-IV**, *trans*- $[PtCl_2(OH)_2(dma)(ma)]$ **2-IV** y *trans*- $[PtCl_2(OH)_2(dma)(ipa)]$ **3-IV**. Se ha incluido también en dichos estudios el compuesto *cis*- $[PtCl_2(OH)_2(NH_3)_2]$ como control.

[‡] El espectro de masas del pico **a** (6,7 min) muestra fragmentos y asociaciones moleculares, pero se detecta un pico **a** 427.02 m/z [$M^+ - H^+ + Na^+$] correspondiente a la especie $[PtCl_2(OH)_2(dma)(ipa)]$ (Figura A6-1 apéndice). Se han observado también otros picos que probablemente provengan de la fragmentación y posterior asociación de especies en disolución

^{*} lo que concuerda con lo observado en los estudios fotoquímicos presentados en el Capítulo 5 de esta memoria realizados para el complejo *trans*- $[PtCl_2(ipa)(ma)]$ (**1**)

Todos los complejos mostraron un proceso de reducción irreversible en sus voltamogramas cíclicos. Como ejemplo se muestran en la Figura 6.3 los CV obtenidos para los complejos *cis*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)₂] y *trans*-[PtCl₂(OH)₂(ipa)(ma)] (**1-IV**). Los potenciales de reducción de todos los complejos se recogen en la Tabla 6.1. Los valores están en concordancia con los publicados para complejos con ligandos hidroxilo en posición axial.¹¹⁹

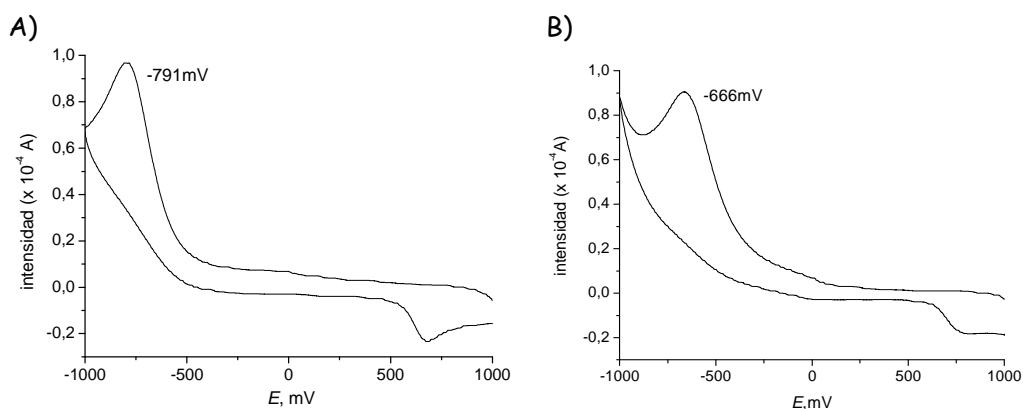


Figura 6.3 Voltamogramas de los complejos A) *cis*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)₂] y B) *trans*-[PtCl₂(OH)₂(isopropilamina)(metilamina)] con una velocidad de barrido de 100 mVs⁻¹

Dichos resultados muestran como el complejo **2-IV** presenta un E_p aproximadamente 100 mV más negativo que el de **1-IV** y **3-IV**, siendo muy similar al del *cis*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)₂].

Las diferencias que se observan en los valores de potencial catódico de los complejos estudiados pueden ser explicadas razonablemente basándonos en el efecto inductivo de los grupos sustituyentes del ligando amina. La comparación de este efecto se ha realizado, primero, en aquellos complejos que presentan un mismo ligando. Siguiendo estas premisas, podíamos proponer que:

Cuando el ligando común es metilamina, el potencial de reducción del complejo **2-IV** debería ser más negativo que **1-IV**, ya que el grupo isopropilo muestra un efecto inductivo menor que el dimetilo. Así, cuanto menor sea el efecto inductivo, más fácil es de reducir el complejo, y más positivo es el valor de potencial. Estas deducciones están de acuerdo con los valores experimentales obtenidos (Tabla 6.1).

¹¹⁹ Hall, M. D.; Amjadi, S.; Zhang, M.; Beale, P. J.; Hambley, T. W. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1614

Cuando el ligando en común es isopropilamina, el complejo **3-IV** muestra un potencial ligeramente más negativo que el del complejo **1-IV**, ya que el grupo dimetilo muestra un efecto inductivo mayor con respecto al metilo en el ligando amina (Tabla 6.1), pero cuando el ligando en común es la dimetilamina, el efecto inductivo no muestra la variación del potencial esperado.

Así, en segundo lugar, evaluamos todos los valores en conjunto. Salta a la vista que el complejo **2-IV** no sólo muestra el potencial más negativo de todo el grupo, sino que además es el único que no contiene el ligando isopropilamina. Como ya hemos mencionado a lo largo de esta memoria, los complejos **2** y **2-IV** son los más citotóxicos y el complejo **2** (el homólogo activo de Pt^{II}) es el que muestra mayor velocidad de hidrólisis. Estas diferencias parecen indicar, que el comportamiento y actividad de estos complejos están influenciados de alguna manera, por diferentes factores estero-electrónicos que, en algunos aspectos, pueden variar su reactividad.

Tabla 6.1 Potenciales de reducción

Complejo	Ep (mV)
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (NH ₃) ₂] ^a	-791
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (ipa)(ma)] (1-IV)	-666
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (dma)(ma)] (2-IV)	-770
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (dma)(ipa)] (3-IV)	-680

^a Valor comparable con el recientemente publicado ref 70

Los experimentos de voltametría cíclica nos han proporcionado valores de los potenciales de reducción que pueden permitir avanzar en el conocimiento del mecanismo de estos complejos de Pt^{IV}.

Conclusions

Conclusions

» The cytotoxic studies of the platinum complexes *trans*-[PtCl₂(amine)(amine')] and *trans*-[PtCl₂(OH)₂(amine)(amine')] (where amine and amine' are: methylamine, dimethylamine and isopropylamine) in the cancer cell lines SF268, MCF-7 and NCI-H460 show that the complexes *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] and *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)] which containing the less bulky carrier ligands are the most active complexes.

» The aquation studies of *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-ipa)(¹⁵N-ma)], *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-dma)(¹⁵N-ma)] and *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-dma)(¹⁵N-ipa)] performed by 2D [¹H,¹⁵N] HSQC NMR show that although the results are similar to some of the reported *trans* platinum complexes, there are some important differences:

- i) the equilibrium is reached more quickly.
- ii) a greater proportion of the dichlorido species is present at equilibrium.
- iii) the pK_a of the monoqua species is higher, so more reactive monoqua Pt-OH₂ species will be presented.

» A comparison between the aquation of the three complexes shows that steric effects are evident, because the aquation is slower for the two complexes *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] and *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] which containing a slightly bulkier ligand (isopropylamine). On the other hand whereas aquation occurs more rapidly for *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)], it is the least aquated of the three complexes at equilibrium.

» *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] has more potent cytotoxic activity than *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] and *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)]. Our observations demonstrate an important role for ligand design in finely modulating the cytotoxicity of *trans*-platinum complexes by influencing aquation chemistry.

» When hydrolyzation is photoinduced, complexes *trans*-[PtCl₂(amine)(amine')] hydrolysis goes more rapidly to the aquaspecies than at dark. The photoactivation in the reaction of these complexes with nucleobases is selective because the formation of the adducts is not always promoted.

Conclusiones

Conclusiones

» La determinación de la actividad citotóxica de compuestos *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')] y *trans*-[PtCl₂(OH)₂(amina)(amina')], donde amina y amina' son: metilamina, dimetilamina e isopropilamina, en las líneas celulares tumorales SF268, MCF-7 y NCI-H460 pone de manifiesto que los complejos más activos son aquellos con ligandos que crean menor impedimento estérico *trans*-[PtCl₂(dma)(ma)] y *trans*-[PtCl₂(OH)₂(dma)(ma)]

» El estudio de la hidrólisis por RMN 2D [¹H,¹⁵N] HSQC de los complejos *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-ipa)(¹⁵N-ma)], *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-dma)(¹⁵N-ma)] y *trans*-[PtCl₂(¹⁵N-dma)(¹⁵N-ipa)] pone de manifiesto diferencias con respecto a otros complejos *trans* estudiados, siendo las más destacables:

- i) el establecimiento muy rápido del equilibrio.
- ii) el gran porcentaje de especie dicloro al alcanzarse el equilibrio.
- iii) valores de pK_a más altos para las monoacu especies, lo que supone una mayor proporción de la forma más activa: Pt-H₂O.

» La comparación de la hidrólisis de los tres complejos estudiados muestra evidencias de la influencia de factores estéricos en la velocidad de acuación. Los complejos que contienen isopropilamina, ligando más voluminoso, presentan una menor velocidad de acuación. Destaca que aunque la acuación más rápida es la del complejo *trans*-[PtCl₂(dimetilamina)(metilamina)] su grado de hidrólisis es menor.

» El hecho de que el complejo *trans*-[PtCl₂(dimetilamina)(metilamina)] haya sido el que ha mostrado la mayor actividad en las líneas celulares tumorales ensayadas, indica que la elección de los ligandos en el diseño de los complejos podría modular la actividad por su influencia en la hidrólisis.

» Los compuestos *trans*-Pt^{II} estudiados en este trabajo son fotosensibles, ya que se ha observado que la irradiación induce la hidrólisis de los complejos. Las fotorreacciones de complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')] con nucleobases muestran que son selectivas, ya que la irradiación no siempre promociona la formación de aductos.

Appendix/ Apéndice

Table A1 Cytotoxic previous studies of Pt^{II} and Pt^{IV} complexes*

Tabla A3-1 Datos de citotoxicidad de complejos de Pt^{II} y Pt^{IV} de estudios previos

Complex/complejo	IC ₅₀ (24 hours/horas)												ref
	A2780	A2780cisR	Pam212	Pam212-ras	41M	41McisR	CH1	CH1cisR	HL-60	Jurkat	HeLa	Vero	
cisplatin/cisplatino	4.0	58.0	114	156	56.0	128.0	13	50.0	25	7	38	50	34,54,55
transplatin/transplatino	>200	>200	123	164	>200	>200	>200	>200	50	22	89	148	34,55
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (ipa) ₂]			112	158					30	9	65	93	34
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)]			>100	>100			>100	>100					54
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ppa)]	24	>100	50	32	13	23	43	39	20	5	43	52	34,62
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (but)(ipa)]	27	10	71	21	39	10	16	>100	18	7	35	46	34,62
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (ipa)(ma)]	14	30	39	17	21	15	53	16			95	17	62
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (dma)(ipa)]	3.7	22	56	6	13.0	54.0	19.0	15.0	17	5	32	47	34,62
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (dma)(ipa)]	5.7	8.4	>100	>100	23.5	1.3	7.0	5.7			>100	100	55,62
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (ipa)(ma)]	45	53	>100	>100	35	50	54	48			>100	98	62
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(mbut)]	1.7	9.3					4.2	15.1					120
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (NH ₃)(sbut)]	2.1	15.5					5.5	18.0					120

* References numbers correspond to the references cited in the Spanish version

¹²⁰ Prokop, R.; Kasparkova, J.; Novakova, O.; Marini, V.; Pizarro, A. M.; Navarro-Ranninger, C.; Brabec, V. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1097

Appendix/Appendice

M1: Scientist Model:

Aquation of **1** (2.73 mM pH 4.4) and **2** (2.24 mM pH 4.2) in 100 mM NaClO₄, 298K

//MicroMath Scientist Model File

//Complex **1** hydrolysis second order reverse - equilibrium both aquation steps

IndVars: T

DepVars: A, B, C, Cl

Params: KAB, KBA, KBC, KCB

$A' = -KAB \cdot A + KBA \cdot B \cdot Cl$

$B' = KAB \cdot A - KBA \cdot B \cdot Cl - B \cdot KBC + C \cdot KCB \cdot Cl$

$C' = B \cdot KBC - C \cdot KCB \cdot Cl$

$Cl' = KAB \cdot A - KBA \cdot B \cdot Cl + B \cdot KBC - C \cdot KCB \cdot Cl$

//A= 1 or 2, B=aqua/Cl, C=diaqua, Cl=chloride

//Initial Conditions

T=1591

A=0.00249

B=0.00023987

C=0.0

Cl=0.00023987

M2: Scientist Model:

Aquation of **3** (2.02 mM pH 4.2) in 100 mM NaClO₄, 298K

//MicroMath Scientist Model File

//Complex **3** hydrolysis pseudo first order reverse - first equilibrium step

IndVars: T

DepVars: A, B, Cl

Params: KAB, KBA

$A' = -KAB \cdot A + KBA \cdot B \cdot Cl$

$B' = KAB \cdot A - KBA \cdot B \cdot Cl$

$Cl' = KAB \cdot A - KBA \cdot B \cdot Cl$

// A=3, B=aqua/Cl, Cl=chloride

// Initial Conditions

T=1818

A=0.0018364

B=0.00017861

Cl=0.00017861

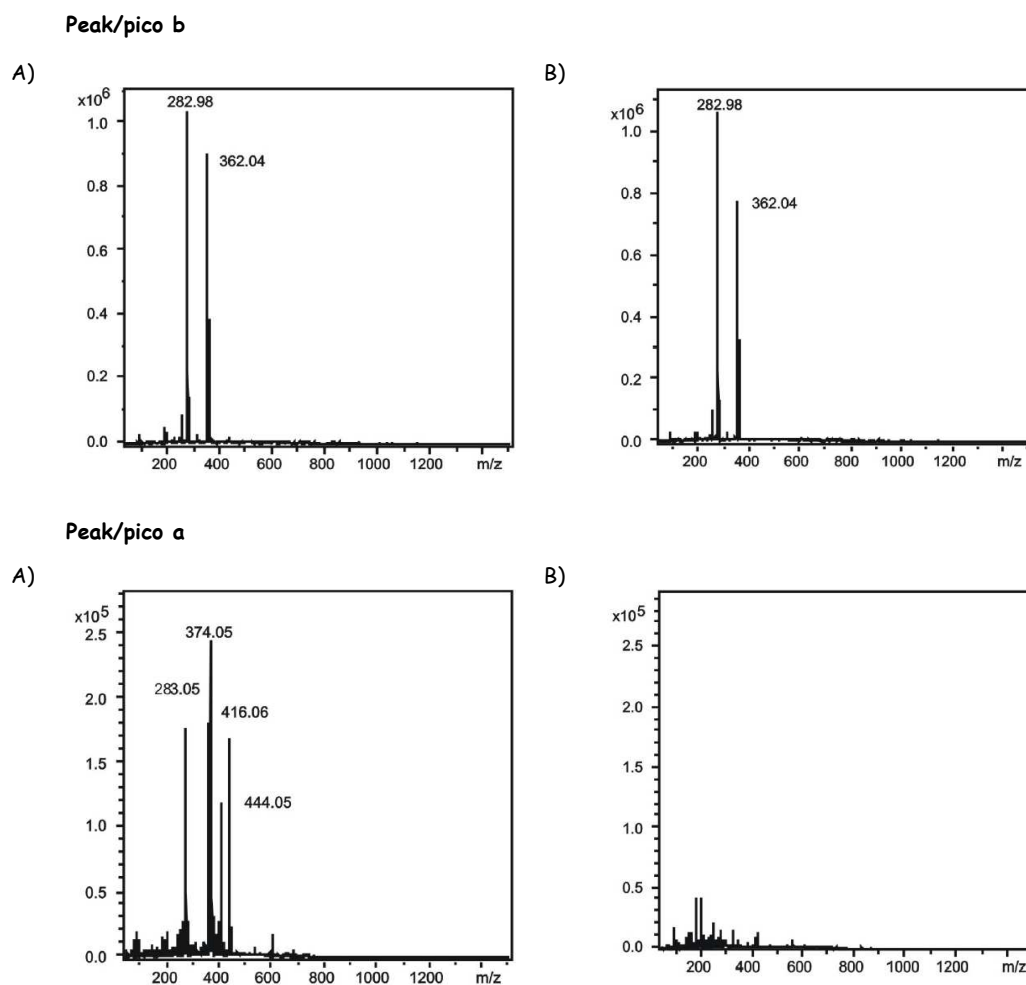


Figure A1-1 ESI-MS spectra for the peaks in the chromatograms (Figure 1.19) from complex 1 aqueous solution after 4 hours: A) irradiated **I** and B) in the dark **D**
Figura A5-1 Espectros de MS de los picos **a** y **b** (Figura 5.3) separados en los cromatogramas registrados para el complejo 1 tras 4 horas en disolución para las muestras A) irradiada **I** y B) en la oscuridad **D**

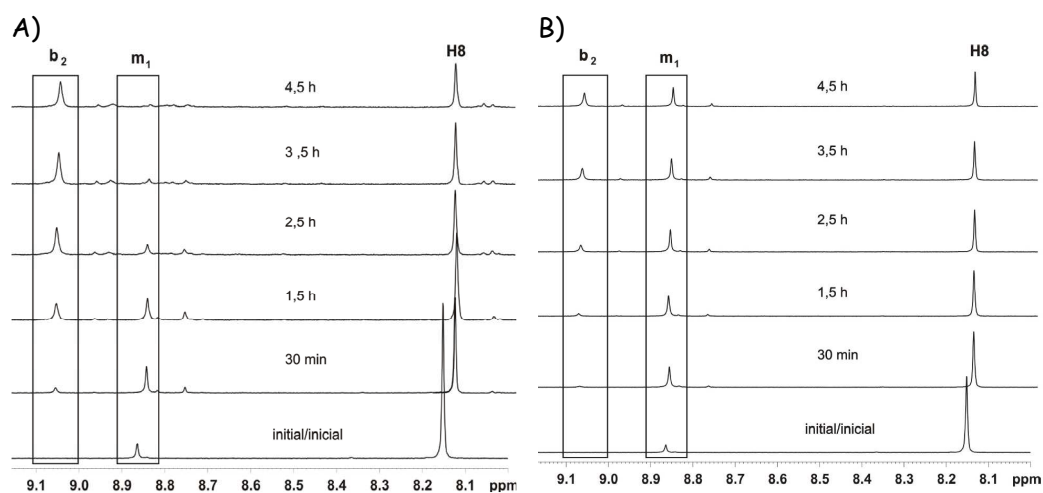


Figure A1-2a Progress of the reaction between complex **2** with 5'-GMP as monitored by ^1H NMR spectroscopy, showing changes in the H8 region: A) irradiated **I** and B) in the dark **D**. Labels: m_1 $[\text{PtCl}(5'\text{-GMP})(\text{dma})(\text{ma})]^+$; b_2 $[\text{Pt}(5'\text{-GMP})_2(\text{dma})(\text{ma})]^{2+}$ and **H8** 5'-GMP free

Figura A5-2 Evolución de los espectros de RMN de ^1H para la reacción del complejo **2** con 5'-GMP. Se muestra la región de las señales del H8 para las muestras: A) irradiada **I** y B) en la oscuridad **D**. Asignaciones: m_1 , $[\text{PtCl}(5'\text{-GMP})(\text{dma})(\text{ma})]^+$; b_2 , $[\text{Pt}(5'\text{-GMP})_2(\text{dma})(\text{ma})]^{2+}$ y **H8**, 5'-GMP libre

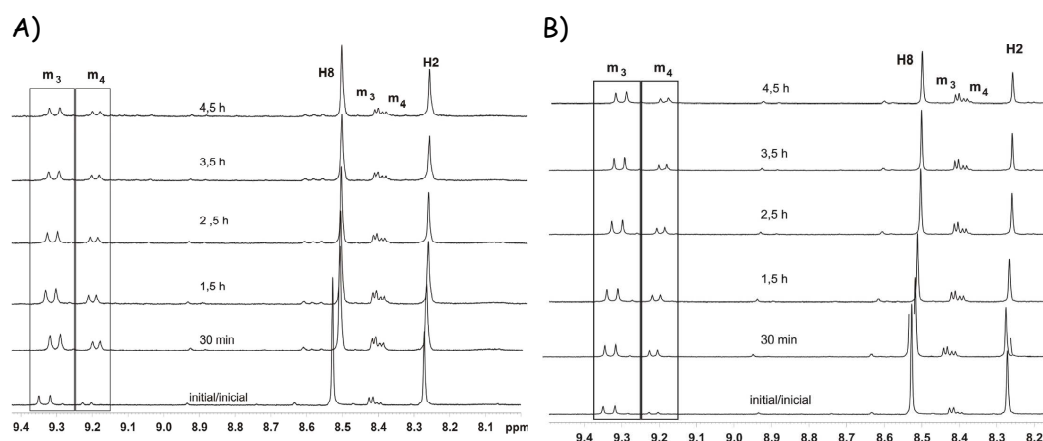
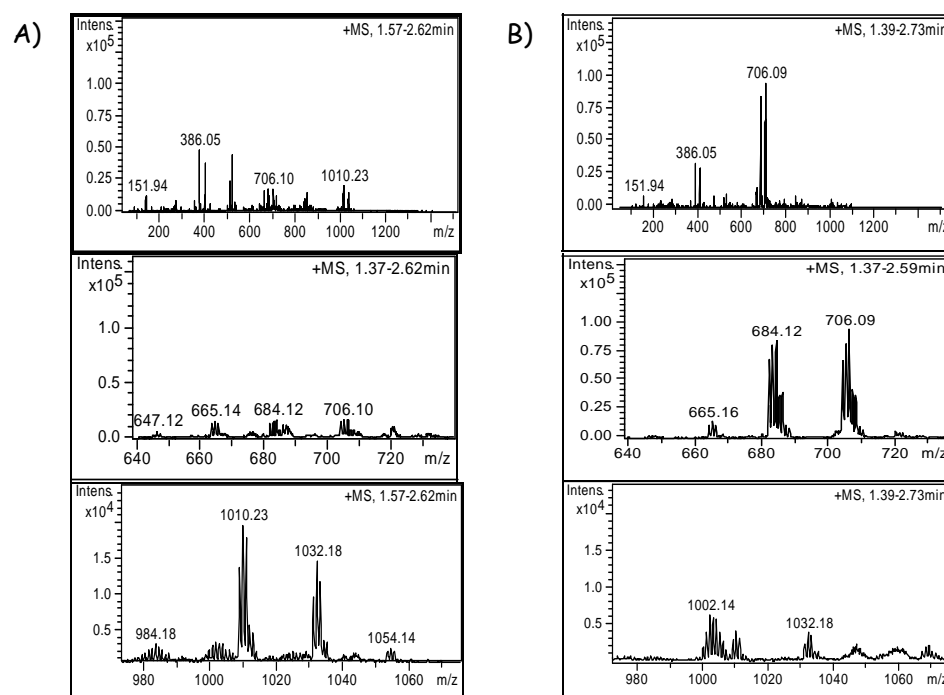


Figure A1-2b Progress of the reaction between complex **2** with 5'-AMP as monitored by ^1H NMR spectroscopy, showing changes in the H8 region: A) irradiated **I** and B) in the dark **D**. Labels: m_3 $[\text{PtCl}(5'\text{-AMP})(\text{dma})(\text{ma})]^+$; m_4 $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(5'\text{-AMP})(\text{dma})(\text{ma})]^{2+}$ adducts and **H8** 5'-AMP free

Figura A5-3 Evolución de los espectros de RMN de ^1H para la reacción del complejo **2** con 5'-AMP. Se muestra la región de las señales del H8 y H2 para las muestras: A) irradiada **I** y B) en la oscuridad **D**. Asignaciones: m_3 $[\text{PtCl}(5'\text{-AMP})(\text{dma})(\text{ma})]^+$ y m_4 $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(5'\text{-AMP})(\text{dma})(\text{ma})]^{2+}$ y **H8**, **H2** 5'-AMP libre



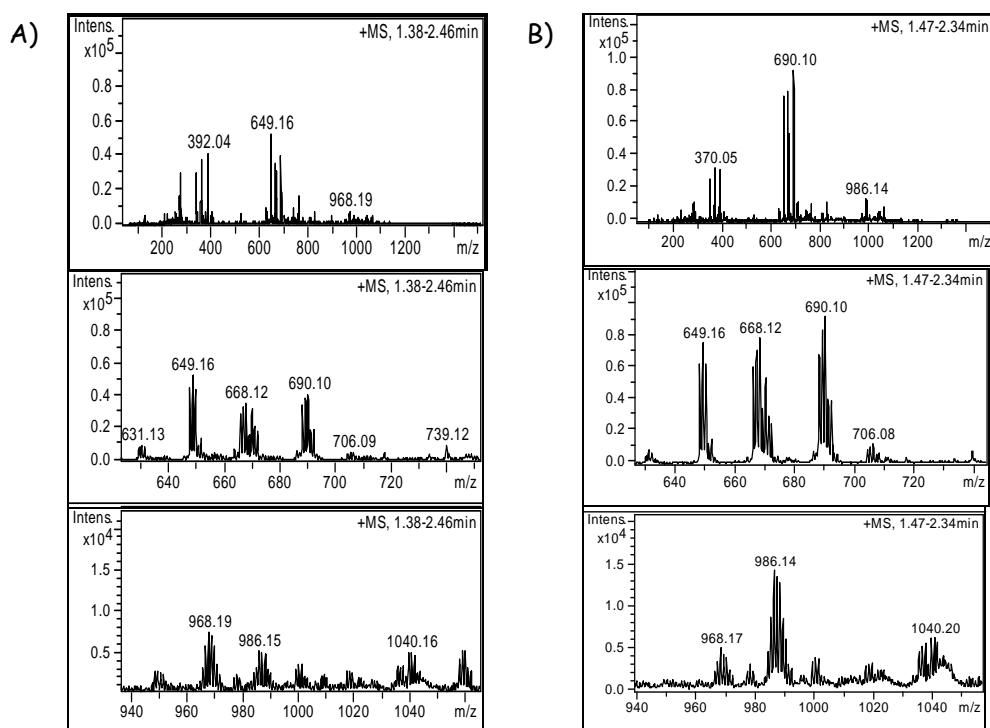


Figure A1-4 MS spectra for the reaction of complex 1 with 5'-AMP recorded after 4 h A) irradiated and B) in the dark

Figura A5-5 Espectros de masas de la reacción del complejo 1 con 5'-AMP tras 4 horas para las muestras A) irradiada I y B) en la oscuridad D

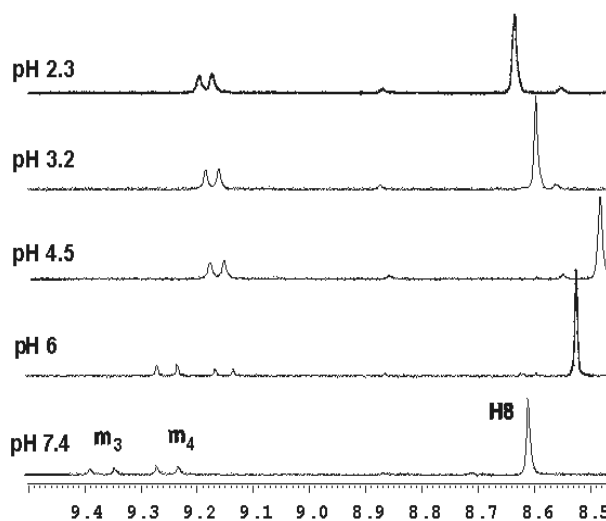
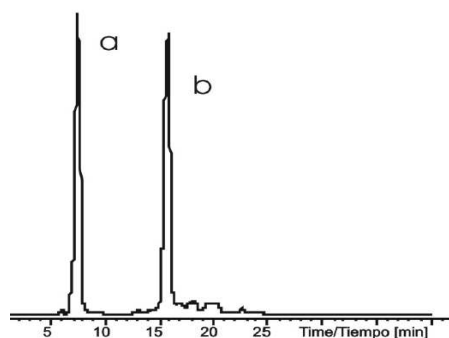
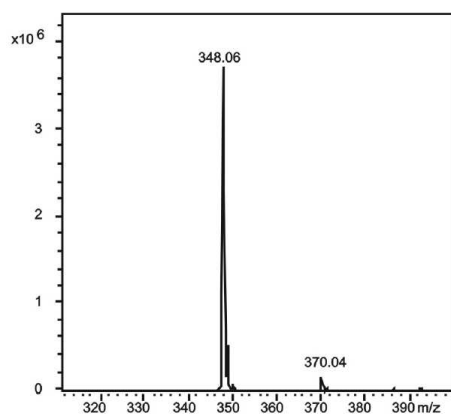


Figure A1-5 The pH dependence of ^1H NMR spectra of complex 1 with 5'-AMP. Note that both adducts have the same intensity at neutral pH and only one adduct had significant intensity at acid pH. Labels: \mathbf{m}_3 $[\text{PtCl}(5'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$; \mathbf{m}_4 $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(5'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$ adducts and **H8** 5'-AMP free

Figura A5-6 Espectros de RMN de ^1H registrados durante la valoración de la reacción del complejo 1 con 5'-AMP. Asignaciones: aducto \mathbf{m}_3 $[\text{PtCl}(5'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$, aducto \mathbf{m}_4 $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(5'\text{-AMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^{2+}$ y H8 5'-AMP libre. Nótese que ambos aductos tienen la misma intensidad a pH neutro y sólo uno de ellos se observa a pH ácido



Peak/pico a



Peak/pico b

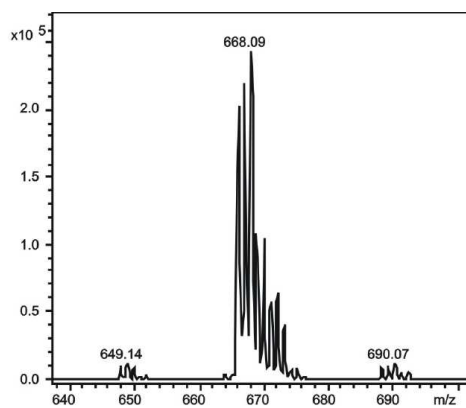


Figure A1-6 Chromatogram for the reaction of complex **1** with 5'-AMP after 4 h and at acid pH. Positive ion MS spectra for HPLC peaks **a** and **b** separated from the reaction. Note that in the ^1H NMR spectra only one adduct was observed at acid pH (Figure A1-5)

Figura A5-7 Cromatograma de la reacción del complejo **1** con 5'-AMP tras 4 horas y después de acidificar la muestra. Espectros de masas obtenidos para los picos **a** y **b** del cromatograma. Nótese que sólo un pico fue observado en los espectros de RMN a pH ácido (Figura A5-6)

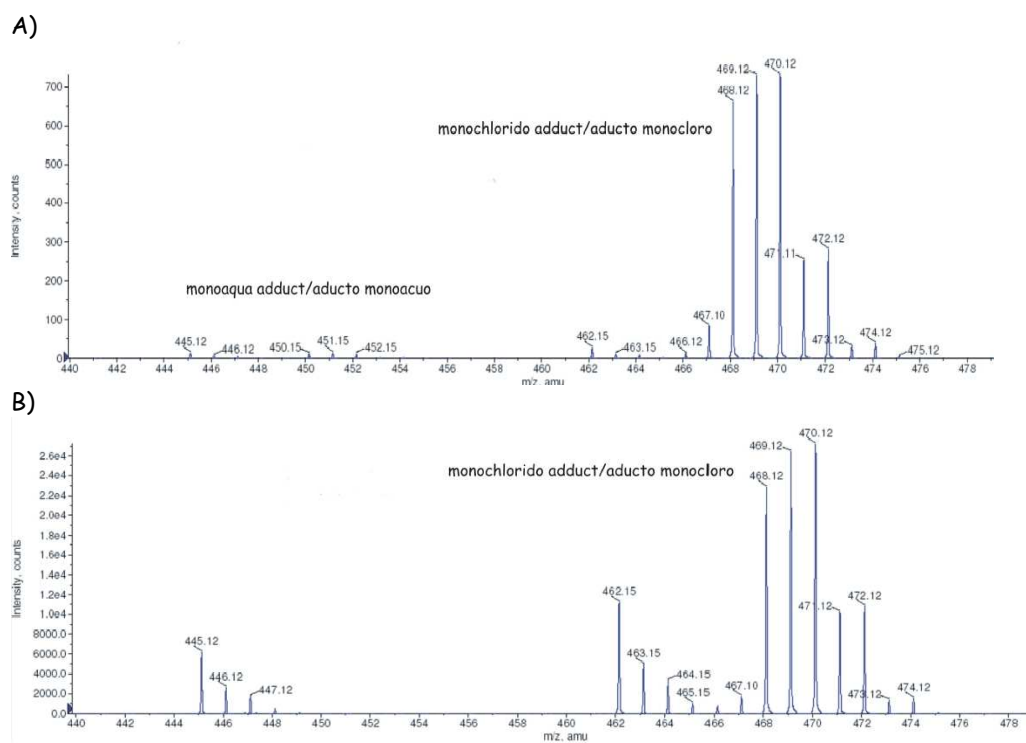


Figure A1-7 Positive ion MS spectra for the reaction of complex 1 with 9MetAde recorded after 4 h at A) neutral and B) acidic conditions

Figura A5-8 Espectro de masas registrado para la reacción del complejo 1 con la 9MetAde tras 4 horas a A) pH neutro y B) pH ácido

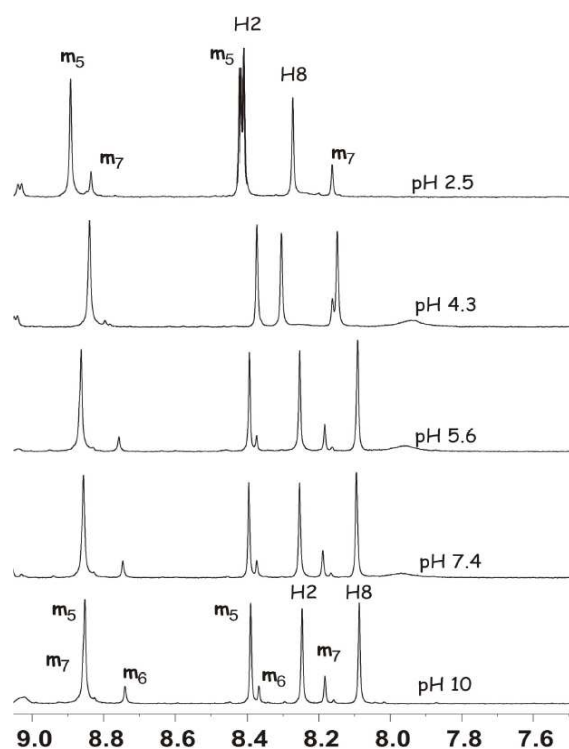


Figure A1-8 pH dependence of ^1H NMR spectra of complex **1** with 9-MetAde. Note that only two adducts (\mathbf{m}_5 and \mathbf{m}_7) from the three detected have significant intensity at acid pH. Labels: \mathbf{m}_5 adduct (Cl/N7-9MetAde); \mathbf{m}_6 adduct ($\text{H}_2\text{O}/\text{N7-9MetAde}$); \mathbf{m}_7 adduct (Cl/N1-9MetAde) and **H2**, **H8** 9-MetAde free

Figura A5-9 Espectros de RMN de ^1H registrados durante la valoración de la reacción del complejo **1** con 9-MetAde. Asignaciones: \mathbf{m}_5 aducto (Cl/N7-9MetAde); \mathbf{m}_6 aducto ($\text{H}_2\text{O}/\text{N7-9MetAde}$); \mathbf{m}_7 aducto (Cl/N1-9MetAde) y **H2**, **H8** 9-MetAde libre. Nótese que tan sólo dos de los tres aductos detectados a pH neutro se observan a pH ácido

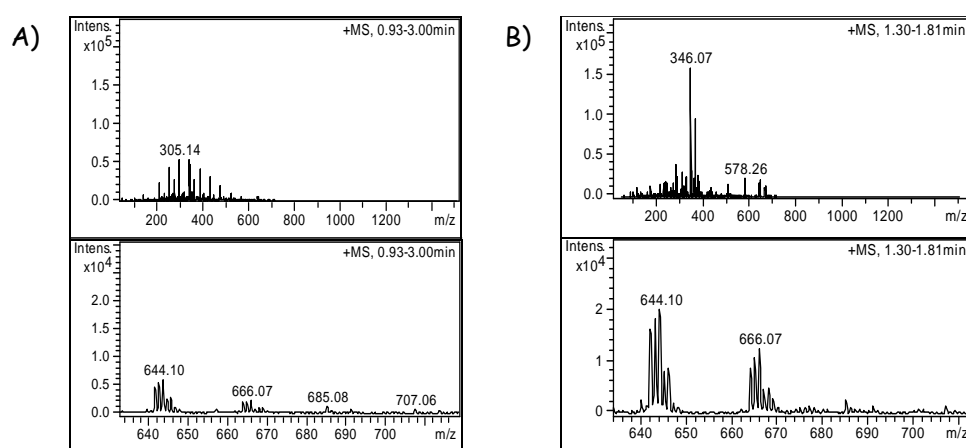


Figure A1-9 MS spectra for the reaction of complex **1** with 5'-CMP recorded after 4 h A) irradiated and B) in the dark

Figura A5-11 Espectros de masas de la reacción del complejo **1** con 5'-CMP tras 4 horas para las muestras A) irradiada **I** y B) en la oscuridad **D**

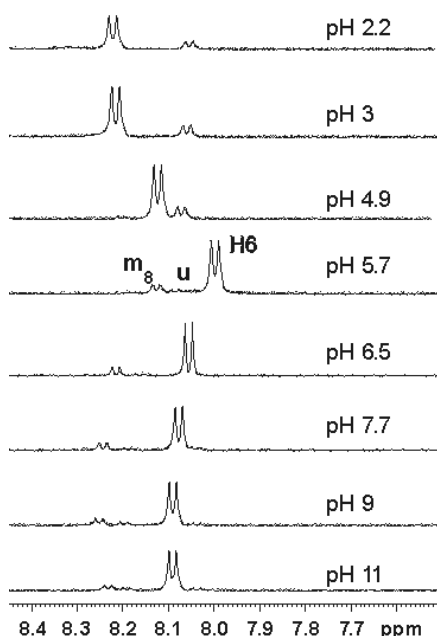


Figure A1-10 The pH dependence of ^1H NMR spectra of complex **1** with 5'-CMP. Note that only one adduct has significant intensity at acid pH. Labels: \mathbf{m}_8 $[\text{PtCl}(5'\text{-CMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$; **u** unknown adducts and **H6** 5'-CMP free

Figura A5-10 Espectros de RMN de ^1H registrados durante la valoración de la reacción del complejo **1** con 5'-CMP. Asignaciones: \mathbf{m}_8 $[\text{PtCl}(5'\text{-CMP})(\text{ipa})(\text{ma})]^+$, otros aductos **u** y **H6** 5'-CMP libre. Nótese que sólo un aducto es detectado a pH ácido

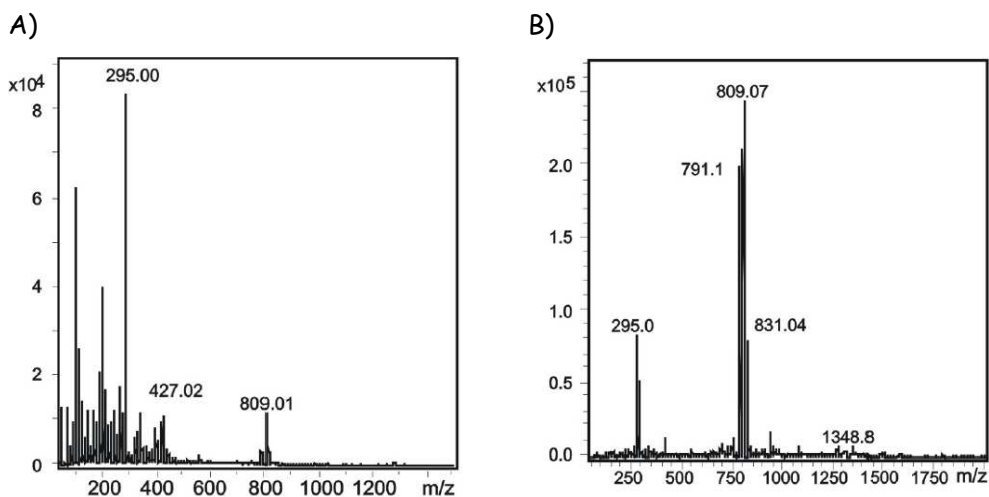


Figure A1-11 Positive ion ESI-MS spectra obtained from HPLC peaks **a** (Figure 1.36) product from the aqueous solution of complex **3-IV** after 4 hours A) irradiated and B) in the dark

Figura A6-1 Espectro de masas obtenido para los picos **a** (Figura 6.2) separados en los cromatogramas del complejo **3-IV** tras 4 horas A) irradiación y B) en la oscuridad

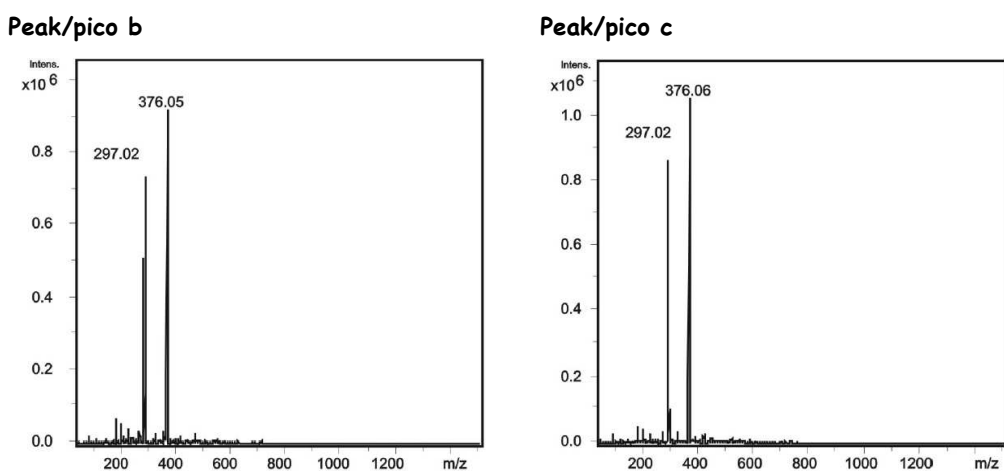


Figure A1-12 Positive ion ESI-MS spectra obtained from HPLC peaks **b** and **c** product from the aqueous solution of complex **3-IV** (Figure 1.36 above) after 4 hours under irradiation

Figura A6-2 Espectro de masas obtenido para los picos **b** y **c** separados en el cromatograma del complejo **3-IV** (Figura 6.2 arriba) tras 4 horas de irradiación

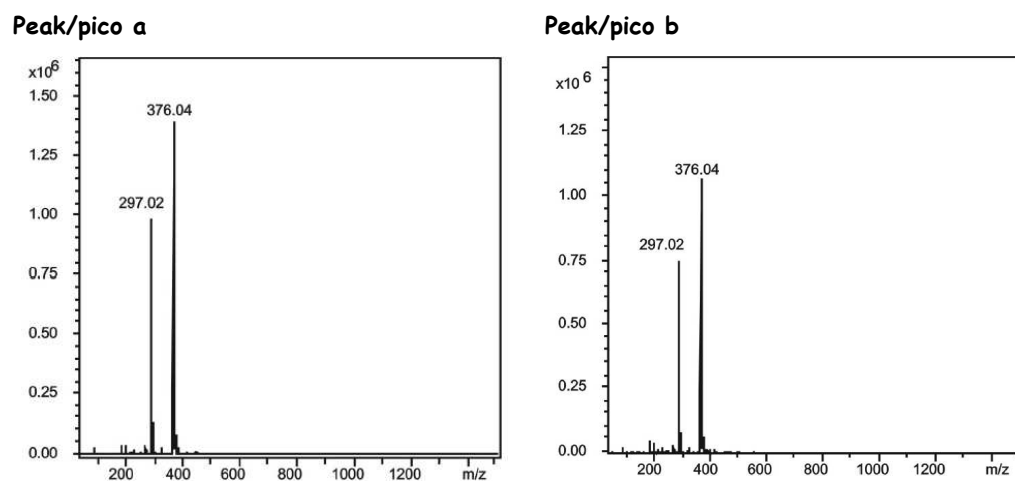


Figure A1-13 Positive ion ESI-MS spectra obtained from HPLC peaks **a** and **b** product from the aqueous solution of complex **3** (Figure 1.36 below) after 4 hours under irradiation
Figura A6-3 Espectro de masas obtenido para los picos **a** y **b** separados en el cromatograma del complejo **3** (Figura 6.2 abajo) tras 4 horas de irradiación

Agradecimientos

Que complicado resulta expresar y mencionar a aquellas personas sin las que no hubiera podido realizar esta Tesis.

Comenzaré por la persona que hace cuatro años confió en mí, a pesar de mi pasado castrense, y me dio la oportunidad de regresar al mundo de la Química, gracias Carmen por haberme apoyado en todo y por dirigirme en muchos sentidos.

Entrar en este grupo de investigación me ofreció la posibilidad de ser codirigida por Dori a quien quiero agradecerle el haberme enseñado tanto, por su voluntad y generosidad para hacerlo y su paciencia estando conmigo en todo este largo camino. Nunca lo olvidaré.

Trabajar en un grupo supone compartir muchos momentos, espacios, horas...gracias Ana, Amparo, Mariu, Paco por haberlo hecho conmigo.

Me gustaría también mencionar a aquellos supervisores que me dieron la oportunidad de pertenecer a sus grupos de investigación por algún tiempo, lo que me ha aportado experiencias inolvidables, Prof. Sue Berners, Prof. Trevor Hambley, Prof. Peter Sadler y Dr. Jesús Jiménez Barbero. Haber visitado estos grupos me permitió conocer personas, que siempre estarán ya en mis recuerdos. Por ayudarme y hacerme más agradable mi estancia, en especial gracias Don, June, Jenny, Nat, Ana, Abraha, Julie Ann, Sarah, Pieter, Rasha, Joe...

Entre lo personal y lo profesional como no daros las gracias a vosotros los de la primera, después de algún tiempo conseguí hacerme un hueco en esa mesa que tanto me ha ayudado a seguir en el día a día, Vicente, Lorena, Pablo, Alex, Rodrigo, Gonzalo...

A las más recientes incorporaciones, que me han conocido en los peores y más duros momentos y que por ello sé nos esperan mejores tiempos que lo compensaran, gracias por entenderme y aguantarme Jose y Virginia.

En lo personal, a mis amigos, saber que estáis ahí significa mucho, después de lo poco que os he dado en estos últimos años dedicados a la ciencia, no siempre tan fiel como vosotros. Os he echado de menos muchas veces Laura, Yoli, Mari, Javi, Alex, Bego, Toño, Quique, Monse, Pili, Raquel, Josemari, Carlos...y a M.Angeles

A mi equipo, que lo mejor es haber formado parte de él y seguir haciéndolo Gemitas, Chus, Rosa, Merce, Bego, Mari, Gema...

Por acompañarme en parte de este viaje gracias Gonzalo. También a los que fuisteis tan importantes y no me habéis abandonado por llevar bata, Guti, Pedreira, Cándido y a mi Brigada, soy ahora parte de lo que aprendí y viví entonces.

Appendix/Apéndice

Carlos, gracias por tus ánimos, consejos y por tu esfuerzo en mantener esa conexión que fue tan breve pero intensa que nos ha permitido mantenerla, y hablando de conexiones también a Michael.

Por último mi familia, la incondicional a pesar de mi carácter, mi forma de ver y hacer las cosas,...a pesar de todo, gracias a mis hermanas Mari, Gemma y también Cari y mi medio hermano Goico.

Por las ilusiones que nos han dado y las que esperamos de ellos Samuel, Sara y Miguel.

A mis padres esta dedicada esta Tesis, es la única forma que tengo para expresarles lo que les debo, todo lo que soy es por vosotros y nunca podré compensaros.

Por todo y a todos gracias

Leticia

Curriculum Vitae

Leticia Cubo was born in Segovia (Spain), on 27th, 1975. She graduated from Universidad Autónoma de Madrid in September 2000 with a Master's degree in Chemistry. In September 2000, she joined the Spanish Army and became an officer for 3 years (officer of the Spanish military rank as a second lieutenant). She executed military missions and tasks in instruction, training and evaluation of professional soldiers. In June 2004, she started her PhD in the Department of Inorganic Chemistry (Universidad Autónoma de Madrid) under the supervision of Prof. Carmen Navarro Ranninger and Dr. Adoración Gómez Quiroga granted by a FPI fellowship (Ministerio de Ciencia y Tecnología). In September 2006 she obtained the Diploma for Proficiency in Research in Chemistry in the Inorganic Chemistry Department of Universidad Autónoma de Madrid. In October 2006, she obtained a position as a Graduate Teaching Assistant in the Inorganic Chemistry Department of Universidad Autónoma de Madrid. Within this framework, she stayed at the laboratory of: Prof. Sue Berners-Price (The University of Western Australia, in February-June 2006); Prof. Trevor Hambley (University of Sydney, in July-August 2006) and Prof. Peter Sadler (University of Warwick, in June-December 2007)

Parts of the research described in this Thesis were presented at "Reunión Científica Bioinorgánica" Santiago de Compostela, Spain, 2007.

During her PhD training she worked in several fields that afforded the following publications:

Adoración G. Quiroga, Leticia Cubo, Elena de Blas, Patricio Aller y Carmen Navarro-Ranninger. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007, 101, 104.

Adoración G. Quiroga, Leticia Cubo, Pablo J. Sanz Miguel, Victoria Moneo, Amancio Carnero, Carmen Navarro-Ranninger. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2008, 8, 1171. This article was highlighted as front cover.

Leticia Cubo, Donald S. Thomas, Junyong Zhang, Adoración G. Quiroga, Carmen Navarro-Ranninger and Susan J. Berners-Price. *Inorganica Chimica Acta*, (doi: 10.1016/j.ica.2008.03.117).

Leticia Cubo, Adoración G. Quiroga, Junyong Zhang, Donald S. Thomas, Amancio Carnero, Carmen Navarro-Ranninger and Susan J. Berners-Price. *Dalton Transactions* (submitted on 30th October, 2008).

