



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Inorgánica

**TESIS DOCTORAL**

**Estudio y diseño de complejos antitumorales de  
Pt(II) y Pt(IV), usando nuevas estrategias para  
conseguir una mayor actividad y especificidad**

María de los Ángeles Medrano Chacón

Madrid 2015





Facultad de Ciencias  
Departamento de Química Inorgánica

**ADORACIÓN GÓMEZ QUIROGA Y AMPARO ÁLVAREZ-VALDÉS,**  
Profesoras titulares del Departamento de Química Inorgánica de la  
universidad Autónoma de Madrid,

HACEN CONSTAR:

Que la presente tesis doctoral titulada “**Estudio y diseño de complejos antitumorales de Pt(II) y Pt(IV), usando nuevas estrategias para conseguir una mayor actividad y especificidad**” ha sido realizada en el departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid bajo nuestra dirección, y reúne las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor (Mención Doctorado Internacional).

Y para que así conste, firmamos el presente en Madrid a 8 de abril de 2015.

Adoración Gómez Quiroga

Amparo Álvarez-Valdés



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid bajo la dirección de la Dra. Adoración Gómez Quiroga y de la Dra. Amparo Álvarez-Valdés, Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2010-035903, SAF2009-09431) mediante una beca FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación (Octubre 2010 - Septiembre 2014).



Durante esta tesis doctoral se han publicado los siguientes artículos:

- A. Medrano, S. M. Dennis, A. Álvarez-Valdés, J. Perles, T. McGregor Mason, A. G. Quiroga, *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 3557.
- M. A. Medrano, A. Álvarez-Valdés, J. Perles, J. Lloret-Fillol, S. Muñoz-Galván, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, A. G. Quiroga, *Chem. Comm.*, **2013**, 49, 4806.
- T. Parro, M. A. Medrano, L. Cubo, S. Muñoz-Galván, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, A. G. Quiroga, *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, 127, 182.



*“Vive como si fueras a morir mañana,  
aprende como si fueras a vivir para siempre”*

Mahatma Gandhi.



## Índice

<b>Capítulo 1. Introducción general</b>	1
1.1. Introducción.	3
1.1.1. Complejos inorgánicos en tratamientos quimioterapéuticos.	3
1.1.2. El cisplatino y su mecanismo de acción.	6
1.1.3. Complejos de platino en clínica.	10
1.1.4. Complejos de platino con geometría <i>trans</i> .	11
1.1.5. Variaciones en los ligandos de los complejos de platino con geometría <i>trans</i> .	13
1.2. Objetivos y estructura de la memoria.	21
1.3. Bibliografía.	23
<b>Capítulo 2. Complejos <i>trans</i>-[PtI<sub>2</sub>(amina)(L)]</b>	27
2.1. Antecedentes.	29
2.1.1. Complejo <i>cis</i> -[PtI <sub>2</sub> (isopropilamina) <sub>2</sub> ].	30
2.1.2. Complejos <i>cis</i> y <i>trans</i> de platino(II) con ligandos yoduro y aminas.	31
2.2. Discusión de resultados.	35
2.2.1. Complejos <i>trans</i> -[PtI <sub>2</sub> (amina)(amina')].	35
2.2.2. Complejos <i>trans</i> -[PtI <sub>2</sub> (amina)(PPh <sub>3</sub> )].	41
2.3 Parte experimental.	53
2.3.1. Disolventes, reactivos y equipos empleados.	53
2.3.2. Complejos <i>trans</i> -[PtI <sub>2</sub> (amina)(amina')].	55
2.3.3. Complejos <i>trans</i> -[PtI <sub>2</sub> (amina)(PPh <sub>3</sub> )].	58
2.4. Bibliografía.	66
<b>Capítulo 3. Complejos <i>trans</i>-[PtI<sub>2</sub>(amina)(L)]</b>	69
3.1. Introducción y antecedentes.	71
3.1.1. El carboplatino, mecanismo de acción y su estabilidad en disolución.	72
3.1.2. Complejos <i>cis</i> -Pt(II) con grupos carboxilato como ligando saliente.	73
3.1.3. Complejos <i>trans</i> -Pt(II) con grupos carboxilato como ligando saliente.	75
3.2. Discusión de resultados.	77
3.2.1. Síntesis de los complejos <i>trans</i> -[PtCl(OCOCH <sub>3</sub> )(amina)PPh <sub>3</sub> ].	77

3.2.2. Estudio de la actividad citotóxica de los complejos <i>trans</i> -[PtCl(OCOCH <sub>3</sub> )(amina)PPh <sub>3</sub> ].	80
3.2.3. Electroforesis en gel de agarosa.	81
3.3. Parte experimental.	83
3.3.1. Disolventes, reactivos y equipos empleados.	83
3.3.2. Síntesis de los complejos de partida.	83
3.3.3. Síntesis de complejos <i>trans</i> de platino(II) monoacetato.	84
3.3.4. Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos <i>trans</i> -[PtCl(OAc)(amina)(PPh <sub>3</sub> )].	87
3.3.5. Electroforesis en gel de agarosa de los complejos <i>trans</i> -[PtCl(OAc)(amina)(PPh <sub>3</sub> )].	88
3.4. Bibliografía.	89
<b>Capítulo 4. Complejos de Pt(IV)</b>	91
4.1. Introducción.	93
4.1.1. Complejos de platino(IV) en clínica	94
4.1.2. Antecedentes en la síntesis de complejos de platino(IV).	96
4.1.3. Mecanismo de acción de los complejos de platino(IV).	97
4.1.4. Estudios de la etapa de reducción de los complejos de platino(IV).	99
4.1.5. Propuestas más recientes en el estudio del mecanismo de reducción de platino(IV).	104
4.2. Discusión de resultados.	106
4.2.1. Síntesis de los complejos <i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (amina)PPh <sub>3</sub> ].	106
4.2.2. Estudio de la actividad citotóxica de los complejos <i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (amina)(PPh <sub>3</sub> )]	109
4.2.3. Estudio del potencial de reducción de los complejos <i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (amina)(PPh <sub>3</sub> )].	111
4.2.4. Estudio de la reducción de los complejos <i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (amina)(PPh <sub>3</sub> )] con algunos agentes reductores biológicos.	113
4.3. Parte experimental.	118
4.3.1. Disolventes, reactivos y equipos empleados.	118
4.3.2. Síntesis de los complejos de partida.	118
4.3.3. Síntesis de los complejos <i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (amina)(PPh <sub>3</sub> )].	118
4.3.4. Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos <i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (amina)(PPh <sub>3</sub> )].	122
4.3.5. Estudio del potencial de reducción de los complejos <i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (amina)(PPh <sub>3</sub> )].	123

4.3.6. Electroforesis en gel de agarosa de los complejos <i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (amina)(PPh <sub>3</sub> )] en presencia de agentes reductores.	124
4.4. Bibliografía.	125
<b>Capítulo 5. Complejos de platino con péptidos</b>	129
5.1. Introducción y antecedentes.	131
5.1.1. Las integrinas.	131
5.1.2. Síntesis de péptidos.	135
5.1.3. Complejos de platino funcionalizados con péptidos.	137
5.2. Discusión de resultados.	140
5.2.1. Síntesis de los compuestos de partida.	140
5.2.2. Síntesis y caracterización de complejos <i>trans</i> de Pt-cRGD.	142
5.2.3. Estudio de la actividad citotóxica de los complejos <i>trans</i> de platino con cRGD.	145
5.3. Parte experimental.	148
5.3.1. Disolventes, reactivos y equipos empleados.	148
5.3.2. Síntesis de los compuestos de partida.	149
5.3.3. Síntesis de complejos <i>trans</i> -(Pt-cRGD)	154
5.3.4. Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos <i>trans</i> -Pt(II)-cRGD y <i>trans</i> -Pt(IV)-cRGD	156
5.4. Bibliografía.	157
<b>Capítulo 6. Complejos heterobimetálicos</b>	159
6.1. Introducción.	161
6.1.1. Re y <sup>99m</sup> Tc en radiofarmacia.	163
6.1.2. Síntesis de precursores Re y <sup>99m</sup> Tc.	164
6.1.3. Complejos de Re y Tc con ligandos pirazolilo.	165
6.2. Discusión de resultados.	167
6.2.1. Síntesis de los compuestos de partida.	167
6.2.2. Síntesis de los complejos heterobimetálicos	176
5.3. Parte experimental.	178
5.3.1. Disolventes, reactivos y equipos empleados.	178
5.3.2. Síntesis de los compuestos de partida.	179
6.3.3. Síntesis del complejo heterobimetálico Pt-Re	184
5.4. Bibliografía.	186

<b>Capítulo 7. Summary and conclusions</b>	187
7.1. Chapter 2. <i>trans</i> -[PtI <sub>2</sub> (amine)L <sub>2</sub> ] complexes	189
7.1.1. Background.	189
7.1.2. Results.	190
7.2. Chapter 3. Platinum(II) complexes with an acetate ligand	195
7.2.1. Background.	195
7.2.2. Results.	196
7.3. Chapter 4. Platinum(IV) complexes	198
7.3.1. Background.	198
7.3.2. Results.	199
7.4. Chapter 5. Platinum complexes with peptides	202
7.4.1. Background.	202
7.4.2. Results.	203
7.5. Chapter 6. Heterobimetallic complexes	205
7.5.1. Background.	205
7.5.2. Results.	206
7.6. Conclusions	209
7.7. Bibliography	211

## Abreviaturas y acrónimos

5'GMP	5'-Guanosina monofosfato.
9-EtG	9-Etil-guanina.
A2780	Células de carcinoma de ovario.
A2780cisR	Células de carcinoma de ovario resistentes a cisplatino.
A375	Células de melanoma humano maligno.
A549	Células de carcinoma de pulmón.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
BGC-823	Células de cáncer gástrico humano.
CBDCA	Ciclobutano-1,1 dicarboxilato.
CDDP	Cisplatino (cis- diaminodicloroplatino(II)).
CH1	Células de carcinoma de ovario sensible a cisplatino.
CH1cisR	Células de carcinoma de ovario resistentes cisplatino.
CTR-1	Proteína de transporte de cobre (Copper Transport 1).
Cys	Cisteína.
Cyt c	Citocromo c.
DACH	Diamino ciclohexano.
DMEM	Medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's mediu.
EJ	Células de carcinoma de vejiga humano.
GSH	Glutación.
HBL-100	Células epiteliales.
HCC	Carcinoma Hepatocelular.
HCT116+/+	Células de carcinoma de colon humano (HCT116wt).
HCT116-/-	Células de carcinoma de colon humano con supresión de p53 (HCT116ko).
HCT-8	Adenocarcinoma ileocecal humano.
HELA	Células derivadas de cáncer cervico-uterino.
HepG2	Carcinoma de hígado humano.
His15	Histidina 15.
HL-60	Células de leucemia promielocítica Europea.
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (RMN).
HMG1	Grupo de alta movilidad 1 (Hight mobility group 1).
IC <sub>50</sub>	Concentración de inhibición del 50% del cultivo celular.
IG <sub>50</sub>	Concentración de inhibición de crecimiento del 50% del cultivo celular.
JM149	<i>Cis, cis, cis</i> amino(ciclohexilamino)dicloro platino(IV) .
JM.216	Satraplatino, <i>trans,cis,cis</i> -bisacetatoamino ciclohexilaminodicloro platino(IV)).
JM-335	<i>Trans,trans,trans</i> -amino(ciclohexilamino)diclorodihidroxo platino(IV).
JM-576	<i>Trans,trans,trans</i> - diacetatoamino(ciclohexilamino)dicloro platino(IV).
L1210/0	Células de leucemia murina
L-Met	L-Metionina.

LXFL	Células de carcinoma de pulmón
MDAMB231	Células de cáncer de mama hormono-independientes+B8.
MCF-7	Células de cáncer de mama.
MPT	Miriplatino ( <i>cis</i> - [(1R,2R)-N,N'-1,2-diaminociclohexano]-bis-(tetradecanoato-O)platino).
MS-ESI	Espectrometría de masa de ionización por electrospray.
MTT	Bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio).
N-ActMet	N-Acetilmetionina
NCI-H460	Células no pequeñas de cáncer de pulmón.
NCI	National Cancer Institute.
OVXF	Células de adenocarcinoma de ovario.
Pam-212	Línea celular de queratinocitos murinos.
Pam-212ras	Línea celular de queratinocitos tumorales murinos que contiene el oncogén H-ras.
Panc1	Células de carcinoma pancreático humano.
PBS	Buffer fosfato salino.
PM2	Anillos de doble cadena cerrada
Pt45	Carcinoma de páncreas.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute.
SAOS-2	Células de osteosarcoma humano.
SF268	Células de cáncer epitelial del sistema nervioso central.
SKVO3	Células de carcinoma de ovario que muestra resistencia intrínseca a cisplatino.
SR2910	Células de sarcoma de Ewing.
SW1573	Células de carcinoma alveolar.
T-47D	Células cancerígenas de cáncer de mama.
TGI	Total inhibición del crecimiento (total growth inhibition).
xg	Unidad de fuerza centrífuga que indica que un valor es n veces mayor a fuerza gravitacional.

## Glosario

*Anaplásia:* Término utilizado cuando las células tumorales están poco diferenciadas o indiferenciadas, lo que por lo general es indicativo de comportamiento maligno.

*Angiogénesis:* Proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes.

*Antagonista:* Tipo de fármaco que al unirse a un receptor celular no provoca una respuesta biológica, pero bloquea o detiene respuestas mediadas por agonistas.

*Apoptosis:* Proceso ordenado por el que la célula muere ante estímulos extra o intracelulares, también llamado muerte celular programada.

*Citocromo c:* Pequeña proteína monomérica que funciona como transportador de electrónico mitocondrial.

*Electrones Auger:* Electrones emitidos por energías menores a 100eV, por lo que sólo pueden provenir de las primeras capas superficiales.

*Emetogenicidad:* Efectos secundarios producidos por la quimioterapia que consisten en náuseas y vómitos.

*Esteroides androgénicos:* Grupo de lípidos, esteroides que cumplen funciones como hormonas.

*Leucemia promielocítica humana:* Subtipo de leucemia mieloide aguda en la cual predominan los promielocitos anormales.

*Nefrotoxicidad:* Efecto tóxico sobre la actividad renal.

*Neurotoxicidad:* Efecto tóxico que altera las funciones del sistema nervioso central.

*Ototoxicidad:* Perturbaciones transitorias o definitivas de las funciones auditivas.

*Paclitaxel*: Fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer de pulmón, ovari, mama y formas avanzadas de sarcoma Kaposi. Nombre comercial: Taxol.

*Plasmocitoma*: También llamado mieloma, es un tumor maligno, que aparece a partir de ciertos glóbulos blancos (células del sistema inmunitario que producen anticuerpos) denominados plasmocitos.

*Queratinocitos*: Son las células predominantes (90%) de la epidermis, la capa más superficial de la piel. Contienen una proteína muy dura que se llama queratina, la cual estimula el crecimiento de células epiteliales en la piel y de las que revisten la superficie de la boca, el estómago y los intestinos.

*Quimioembolización transarterial*: Terapia mínimamente invasiva consiste en la inserción de agentes embolizantes (esferas pequeñas) en el tumor, con el fin de bloquear el suministro de sangre e inhibir el crecimiento del tumor, y administrar la quimioterapia contra el cáncer.

*Radionucleotido*: Elemento químico de configuración inestable que experimentan una desintegración radioactiva, que se manifiesta con la emisión de radiación en forma de partículas  $\beta$  y rayos X o gama.

*Sintón*: Unidades estructurales que expresan las características principales de un estructura cristalina y que encapsulan la esencia de los cristales en términos de reconocimiento molecular. Consisten en fragmentos moleculares y asociaciones supramoleculares entre ellos, tales como enlaces de hidrógeno y otras interacciones direccionales.

*Teranóstico*: Es un área dentro del diagnóstico del cáncer que resulta de la convergencia entre los fármacos que sirven para el diagnóstico y que a su vez tienen fines terapéuticos.

**Capítulo 1.**  
**Introducción general**



## **1.1 Introducción**

El cáncer afecta a muchas personas, de todas las edades, razas o clases sociales y todos conocemos por lo menos, a una persona que lo padece o que ha superado algún tipo de cáncer. Según la Organización Mundial de la Salud, sólo en el año 2012 hubo más de 8,2 millones de muertes a causa de esta enfermedad, lo que la posiciona como la principal causa de muerte a nivel mundial.<sup>1</sup>

El aumento de la incidencia del cáncer se asocia a factores relacionados, con la exposición ambiental a compuestos químicos, a radiaciones ionizantes y al frenético ritmo de vida actual. Pero también, existen pruebas que demuestran la presencia de tumores cancerosos, en huesos fosilizados de dinosaurios, o cáncer de próstata con metástasis óseas en un esqueleto humano de 2.700 años de antigüedad.<sup>2</sup>

Más allá del tipo de cáncer y las causas que lo originan, la comunidad científica invierte muchos recursos, tiempo y esfuerzo en salvar al mayor número de pacientes que padecen esta enfermedad y sobre todo buscan darles una mejor calidad de vida, para que la palabra cáncer deje de ser sinónimo de muerte.

Si bien, los compuestos orgánicos han liderado el mercado de los fármacos para el tratamiento del cáncer, los compuestos inorgánicos no son ajenos al concepto de quimioterapia.

### **1.1.1 Complejos inorgánicos en tratamientos quimioterapéuticos**

La química inorgánica, para lograr abrirse paso en el área de la quimioterapia y la búsqueda de agentes de diagnóstico, cuenta con una gran cantidad de herramientas, pues casi todos los elementos de la tabla periódica, son de potencial utilidad. Basta con pensar en los metales de transición y la infinidad de complejos que se pueden obtener a partir de ellos, debido a los muchos estados de oxidación que pueden adoptar, sus variados números de coordinación, sus diversas geometrías y la casi ilimitada cantidad de ligandos con los que se pueden coordinar.<sup>3</sup>

El caso más clásico de la quimioterapia con metales de transición en el tratamiento del cáncer, son los complejos de platino, principalmente el cisplatino.<sup>4</sup> Sin embargo, aún se siguen buscando compuestos que sean más efectivos y con menos efectos colaterales. Con tal fin, se han hecho estudios prácticamente de todos los grupos de metales de la tabla periódica,<sup>5</sup> siendo los complejos de rutenio,<sup>6</sup> de titanio<sup>7</sup> y de oro,<sup>8</sup> los que mejores resultados han arrojado, después de los complejos de platino, que aún siguen siendo de gran interés, ya que son los más utilizados actualmente en clínica.

Complejos de rutenio, como KP1019 (indazolio- bis-indazol-tetracloro-rutenato), RAPTA-T ( $\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{Me})(\text{PTA})\text{Cl}_2$ ) y NAMI-A (*trans*-imidazol-dimetilsulfóxido-tetracloro rutenato), entre otros (Figura 1.1), han mostrado tener propiedades únicas, en cuanto a selectividad y actividad antitumoral. Incluso algunos de estos compuestos han tenido éxito en evaluaciones clínicas de fase I y fase II, lo que ha creado grandes expectativas de futuro.<sup>9</sup>

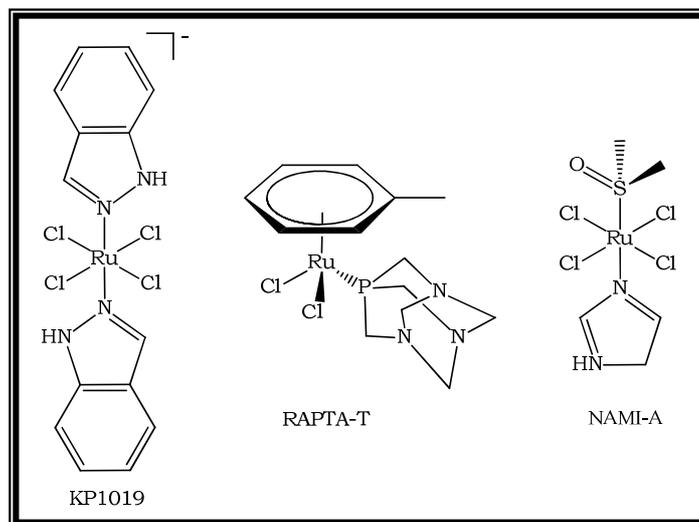


Figura 1.1. Complejos de rutenio que han mostrado actividad antitumoral.

La bioquímica de complejos titanoceno se ha estudiado con mucho detalle.<sup>10</sup> Desde los trabajos pioneros de Köpf y Köpf-Maier, quienes descubrieron las posibilidades como agentes antitumorales de compuestos organometálicos, como los complejos metaloceno dicloruro,<sup>11-12</sup> y también los ensayos clínicos de fase I llevados a cabo para el  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$  a partir de 1993 ( $\text{Cp} = \eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$ ).<sup>13</sup>

Watson y colaboradores,<sup>14</sup> han estudiado complejos derivados de titanoceno con algunas modificaciones, (como por ejemplo, bis-[(*p*-metoxibencil) ciclopentadienil] dicloruro de titanio) (Figura 1.2), que son más efectivos para inducir apoptosis que el cisplatino, en células de cáncer de próstata y en células que sobreexpresan Bcl-2.

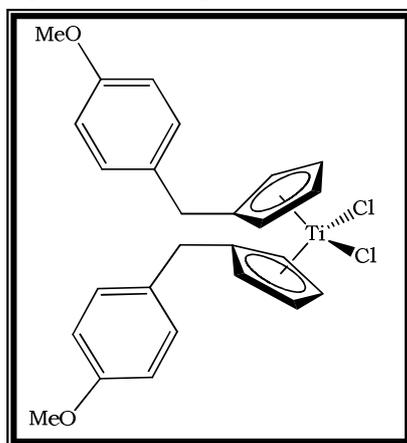


Figura 1.2. Complejo bis-[(*p*-metoxibencil)ciclopentadienil] dicloruro de titanio.

Los complejos de oro son también de gran importancia. Uno de los ejemplos más destacados es el auranofin (2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-0-D-glucopiranosato-S-trietilfosfina oro (I)) (Figura 1.3).

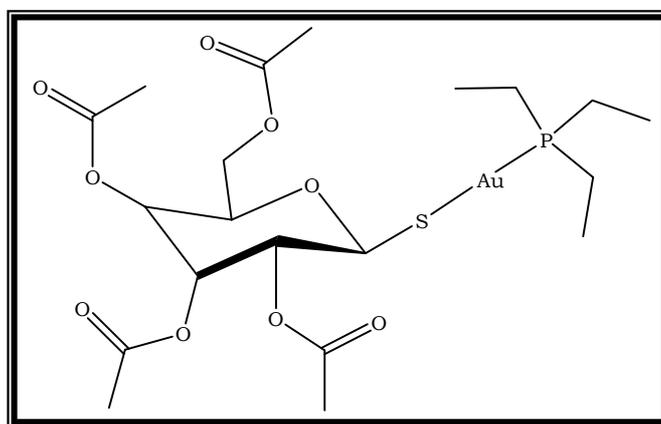


Figura 1.3. Estructura del auranofin.

Sus efectos antitumorales son significativos, en especial en ensayos realizados en ratones con leucemia linfocítica e inoculados con la P388, aunque poco se sabe sobre su mecanismo de acción.<sup>15</sup> Para profundizar en las propiedades antitumorales de este compuesto y conocer mejor su posible mecanismo de acción, Mirabell y colaboradores,<sup>8</sup> sintetizaron una serie complejos de oro con diferentes fosfinas y evaluaron su actividad

antitumoral *in vivo* e *in vitro*. Uno de sus hallazgos más importantes fue que el aumento de la actividad citotóxica *in vitro* no siempre se correlaciona con la actividad *in vivo*.<sup>16</sup>

### 1.1.2 El cisplatino y su mecanismo de acción

El cisplatino marcó un hito en el tratamiento contra el cáncer y en el uso de complejos inorgánicos en medicina. El hallazgo de la capacidad del cisplatino para inhibir la división celular, ocurrió cuando Barnett Rosenberg, biofísico de la Universidad Estatal de Michigan, realizó estudios sobre el crecimiento de células de *Escherichia coli* (*E.coli*), en una disolución amortiguadora de cloruro de amonio, a través de la cual se aplicaba una corriente eléctrica, producida por unos electrodos de platino inmersos en la disolución. Con el paso de la corriente, Rosenberg observó que la densidad de las células disminuía y que después de un tiempo sin corriente la densidad volvía a la normalidad. Finalmente, se estableció que este efecto no era producto de la acción directa del campo eléctrico en la célula bacteriana, sino que más bien se debía a los productos de la electrólisis del platino.<sup>17</sup> Este pequeño indicio, llevo al descubrimiento de la actividad antitumoral del cisplatino.

A partir de este descubrimiento y de su aprobación por la FDA (Food and Drug Administration) en 1978, otros siete compuestos Pt(II) fueron introducidos en triadas clínicas en todo el mundo: carboplatino y oxaliplatino, y sólo en determinados países: nedaplatino, lobaplatino, heptaplatino, miriplatino (Figura 1.4).<sup>18-19</sup>

El cisplatino o *cis*-diaminodicloroplatino(II) (*cis*-DDP o CDDP), es un complejo inorgánico de geometría plano cuadrada que fue sintetizado por primera vez por Michel Peyrone<sup>20</sup> en 1845. Las diferencias estructurales y moleculares de los isómeros *cis* y *trans*, llevaron a que 50 años después, se sentaran las bases de la teoría de coordinación química, establecida por Alfred Werner, que le hizo merecedor del premio Nobel de química en el año 1913.<sup>21</sup>

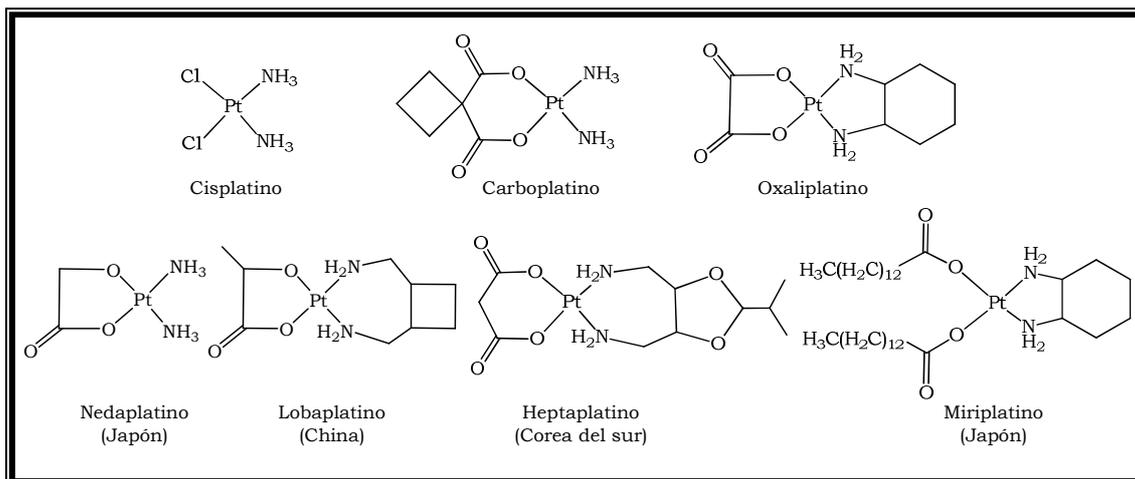


Figura 1.4. Complejos de Pt(II) aprobados a nivel mundial y en algunos países.

El procedimiento para la síntesis de cisplatino ha experimentado varias mejoras a lo largo del tiempo. Los primeros métodos eran poco fiables, y con tendencia a dar productos impuros. Así, posteriores modificaciones destinadas a mejorar tanto la pureza, como el rendimiento total de las reacciones y el tiempo de reacción, han dado paso a métodos más efectivos. Dkhara y colaboradores<sup>22</sup> publicaron en 1970, “Un método rápido para la síntesis de *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]”, este método ha sentado la bases de otras posteriores.

La utilización del cisplatino como agente quimioterapéutico, mejoró significativamente las perspectivas de supervivencia para muchos pacientes con cáncer, la tasa de curación para el cáncer testicular subió del 10% al 90%, gracias a la quimioterapia con platino.<sup>23</sup>

El cisplatino es administrado por vía intravenosa y la alta concentración de iones cloruro presentes en el torrente sanguíneo (alrededor de 100 mM) impide en un principio la hidrólisis de los ligandos cloruro. Posteriormente, el cisplatino entra en el interior celular, por osmosis y además se ha demostrado que puede estar asistido por el principal transportador de membrana (Copper Transporter-1, (CTR-1)).<sup>24</sup> Una vez dentro de la célula, hay bastantes evidencias de que, en respuesta a la baja concentración de iones cloruro encontrada en el citoplasma (entre 3-20 mM),<sup>25</sup> el cisplatino se activa intracelularmente, por la sustitución de

uno de los dos ligandos cloruro por una molécula de agua, para dar lugar al complejo monoacu  $cis-[Pt(NH_3)_2Cl(H_2O)]^+$  (Figura 1.5).<sup>26-27</sup>

El complejo monoacu, es capaz de unirse a la posición **N7** de las bases púricas, (particularmente guanina) formando aductos ADN-cisplatino, estos aductos forman uniones 1,2 y 1,3 intracatenarias y en menor proporción enlaces intercatenarios (Figura 1.5). Los aductos formados causan una distorsión en la doble hélice del ADN, evitando así la replicación de las células y, en definitiva, la propagación del cáncer. Esta modificación a nivel molecular en la estructura del ADN, es reconocida por una serie de proteínas celulares, que activan la maquinaria apoptótica y llevan a la célula a una muerte por apoptosis.<sup>28</sup>

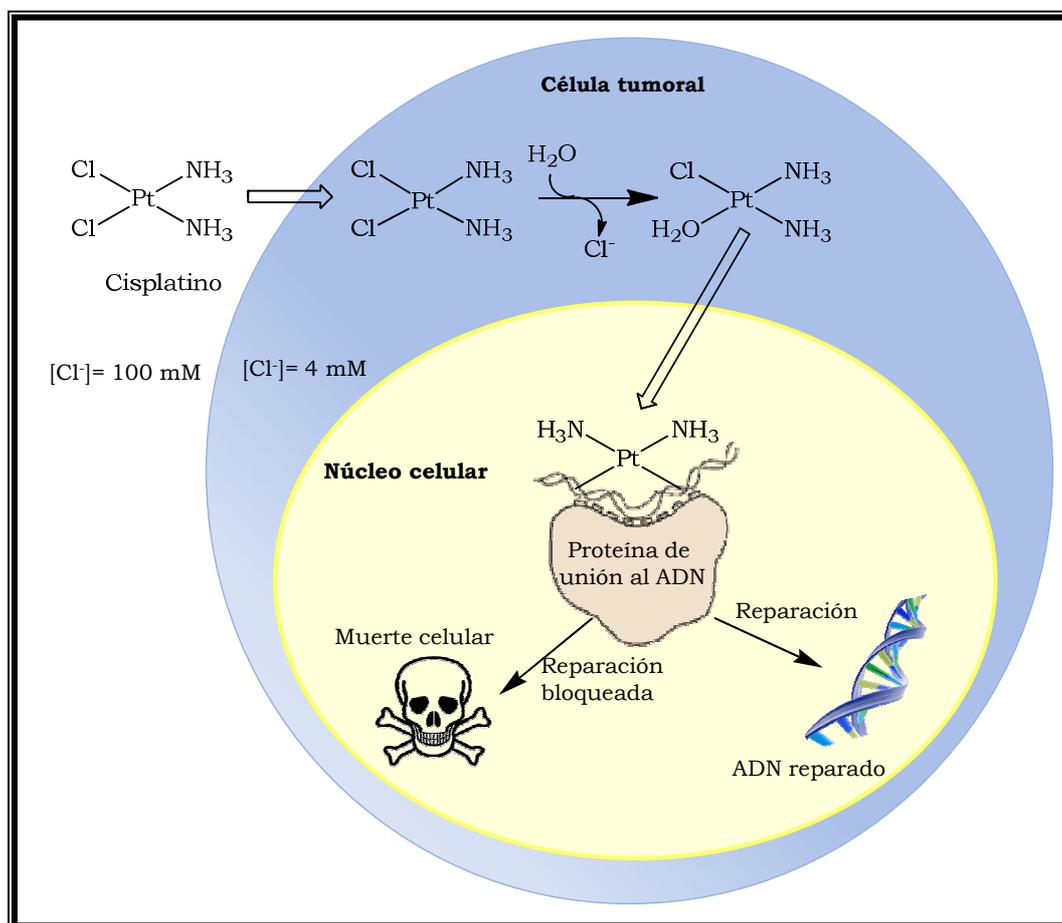


Figura 1.5. Esquema ilustrativo de las vías de acción del cisplatino.

La hidrólisis de la especie monoacu, puede continuar para dar el derivado diacu, que aunque no es el mayor responsable de la actividad del cisplatino, puede estar implicado en la formación de otros aductos, que

también pueden afectar la replicación del ADN.<sup>29</sup> Las variaciones del pH provocan que a pH alto, las moléculas de agua coordinadas al Pt se desprotonen, para dar complejos hidroxilo, donde el enlace Pt-OH es bastante inerte y se pueden empezar a formar especies diméricas inactivas con puentes hidroxilo.<sup>30</sup>

La formación de estos aductos ADN-cisplatino se confirmó, gracias a la realización de biopsias de tumores, en pacientes enfermos tratados con cisplatino, encontrándose altas concentraciones de este metal en el ADN del núcleo celular (ADN-platinado).<sup>31-32</sup> Además, esta evidencia se confirmó con estudios llevados a cabo empleando difracción de rayos X, que mostraron la formación de estos complejos ADN-cisplatino (Figura 1.6).<sup>33</sup>

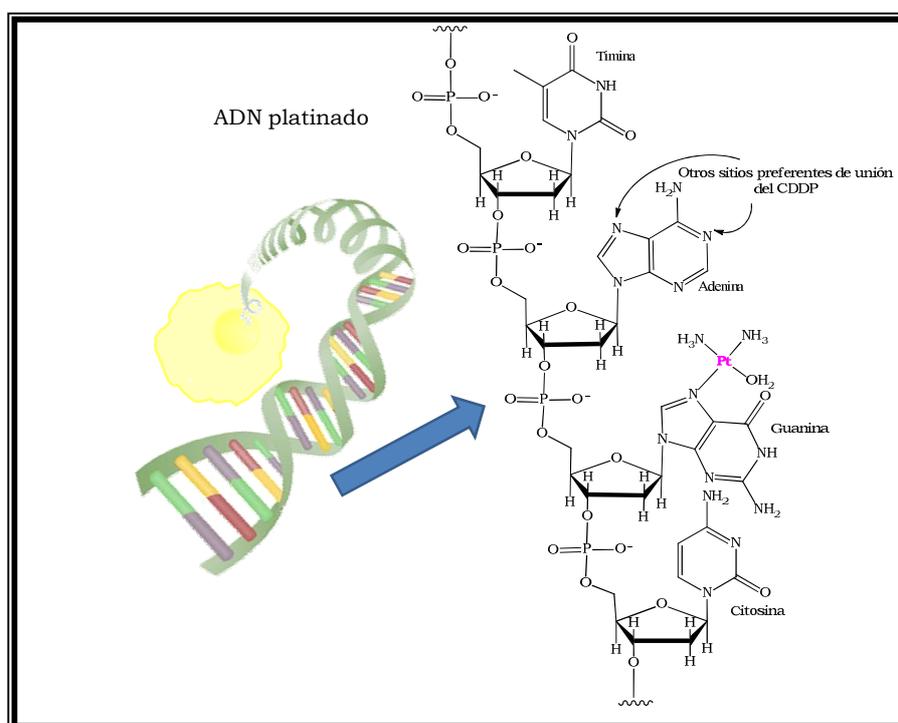


Figura 1.6. Platinación del ADN.

A pesar de su éxito, el cisplatino, tiene varias desventajas, que implican graves efectos tóxicos como: nefrotoxicidad, neurotoxicidad y emetogenicidad. Estos efectos secundarios, limitan su uso en clínica. Para ayudar a aliviar los efectos nefrotóxicos, se emplea la hidratación intravenosa y la diuresis. Así como el uso de antagonistas de los receptores de serotonina, que han ayudado a reducir las náuseas y vómitos en algunos pacientes.<sup>34</sup> La aparición de efectos colaterales, conlleva a que la

dosis letal que llega a las células cancerígenas sea menor, por lo que las células a lo largo del tiempo son capaces de desarrollar resistencia. Existen principalmente tres mecanismos de resistencia:<sup>35</sup>

- ★ La reducción de la capacidad de absorción de medicamento.
- ★ La degradación y desactivación por tiores intracelulares. En particular esto se puede deber a los niveles de glutatión dentro de las células.
- ★ La aparición de tolerancia o capacidad de reparación de las células cancerígenas a los aductos cisplatino-ADN

La combinación del cisplatino con otros fármacos, ha ayudado a reducir algunos de sus efectos colaterales, pero otros efectos tóxicos como la ototoxicidad y las neuropatías periféricas siguen siendo muy graves. Esto ha llevado a realizar variaciones sistemáticas en la estructura del mismo.

### 1.1.3 Complejos de platino en clínica

Con los estudios iniciales del cisplatino, se pudieron establecer unas reglas estructura-actividad, que cumplían también una gran variedad de compuestos análogos. Dichas relaciones fueron establecidas por Cleare y Hoeschele<sup>36</sup> y se citan a continuación:<sup>37</sup>

- Los compuestos deben tener geometría *cis*, ser neutros y contener dos grupos amino.
- Los compuestos con un menor número de sustituyentes alquilo sobre la amina, suelen tener mayor actividad y cada ligando amina debe poseer al menos un hidrógeno unido al nitrógeno.
- Es necesario, aunque no suficiente, que los compuestos contengan dos grupos salientes en posición *cis*. Los grupos salientes, serán aquellos que se pierdan con mayor facilidad.
- La facilidad con que los grupos salientes sean capaces de liberarse, afecta a la actividad y a la toxicidad del compuesto.

Durante mucho tiempo, estas pautas iniciales marcaron la tendencia para desarrollo de nuevos fármacos basados en platino, siendo el cisplatino el modelo a seguir.

Para superar las limitaciones del uso del cisplatino, se sintetizaron nuevos complejos de Pt, pero sólo unos pocos lograron superar las fases iniciales de su uso en clínica. En la figura 1.7, se muestra un orden cronológico del desarrollo clínico de algunos complejos de platino, que se han abierto paso como agentes quimioterapéuticos.<sup>26</sup>

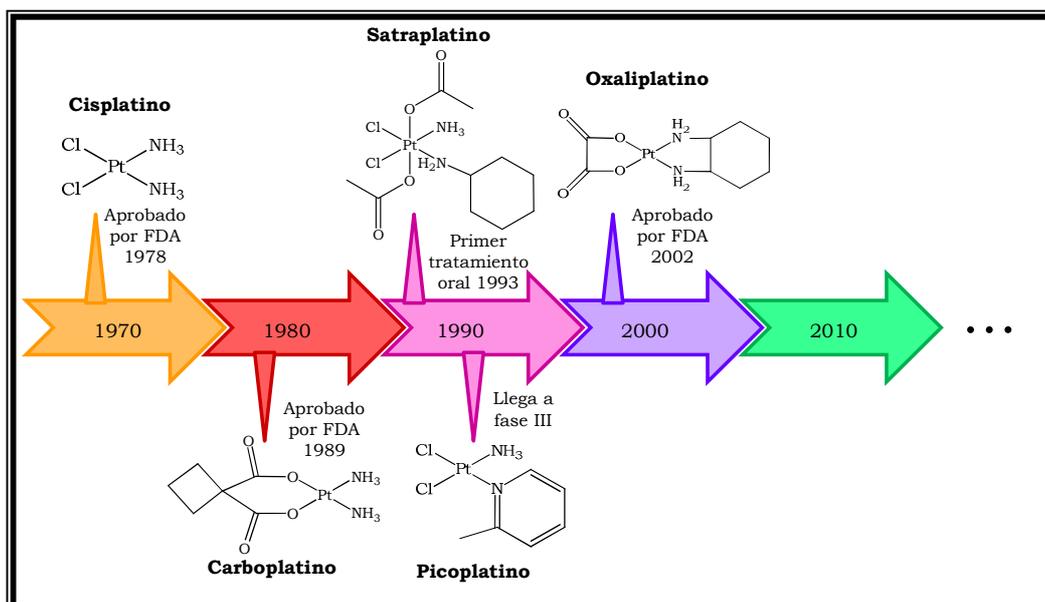


Figura 1.7. Evolución histórica de algunos de los complejos de platino más relevantes.

#### 1.1.4 Complejos de platino con geometría trans

El transplatino fue sintetizado por primera vez por Reiset en 1844,<sup>38</sup> pero durante décadas los complejos de platino de geometría *trans*, se mantuvieron marginados del área de investigación, porque el transplatino (*trans*-DDP) resultó inactivo en células cancerígenas, en comparación al cisplatino.

Esta inefectividad mostrada por el transplatino se atribuyó a: 1) la débil inhibición en replicación del ADN que producían los aductos formados; 2) la rápida reparación de aductos, coherente con la incapacidad de la proteína HMG1 (high-mobility group protein 1) para reconocer los aductos ADN-transplatino y 3) la imposibilidad del transplatino para

producir entrecruzamientos 1,2-intracatenario, que son los aductos más frecuentes formados por el cisplatino.<sup>39</sup>

El transplatino induce monoadductos, que pueden originar otros reordenamientos como enlaces cruzados ADN-ADN y enlaces ADN-proteína. También forma una gran cantidad de enlaces intercatenarios, entre la citosina y la guanina del ADN, pero se comprobó que estos no cambian significativamente la estabilidad y la estructura de ADN.<sup>40-43</sup>

A pesar de que los resultados iniciales con transplatino fueron poco prometedores, las investigaciones para intentar superar las limitaciones del cisplatino, hicieron que en la década de 1990 terminara la indiferencia hacia los complejos *trans* de platino, ya que algunos de ellos mostraron una significativa actividad antitumoral *in vitro* contra diferentes células tumorales, incluyendo algunas resistentes a CDDP.<sup>44</sup> Entre los primeros complejos análogos al transplatino, se encuentra aquellos con ligandos aminas planas (por ejemplo, piridina, quinolina, triazol, imidazol),<sup>45</sup> iminoéteres,<sup>43,46</sup> y aminas alifáticas (como: dimetilamina, isopropilamina, N-butilamina).<sup>47</sup> Estos últimos ejemplos fueron sintetizados por Navarro-Ranninger y colaboradores, (Figura 1.8) y mostraron tener una citotoxicidad parecida y/o incluso superior a la del cisplatino en células sensibles (Jurkat, HeLa, Vero) y resistentes (HL-60, Pam 212-ras).<sup>47</sup>

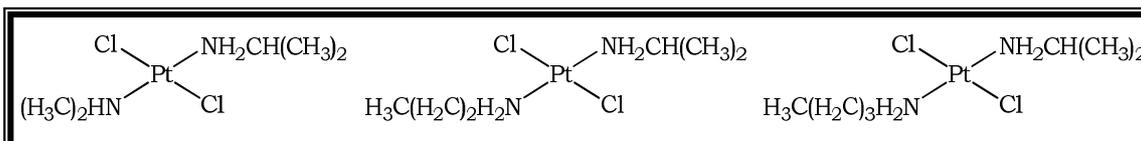


Figura 1.8. Complejos *trans* de Pt(II) preparados por Navarro-Ranninger.

Los llamativos resultados mostrados por los complejos *trans*, transformaron las bases del diseño de nuevos complejos antitumorales de platino. A partir de este punto, se han investigado innumerables variaciones sistemáticas para incrementar la efectividad de los complejos *trans*. Estas variaciones permiten modular características como: la solubilidad, la lipofilicidad, la actividad antitumoral, la toxicidad, la focalización y el transporte del fármaco, entre otras.<sup>48-49</sup> Algunos de estos complejos de platino han dado respuesta positiva en ensayos *in vivo*.<sup>50-51</sup>

### 1.1.5 Variaciones en los ligandos de complejos con geometría *trans*

Las variaciones estructurales sistemáticas en los complejos de platino, permiten obtener una amplia familia de compuestos con características especiales, que pueden modularse para aumentar su actividad antitumoral. Algunas de las variaciones posibles se muestran en la figura 1.9, que se discuten a continuación.

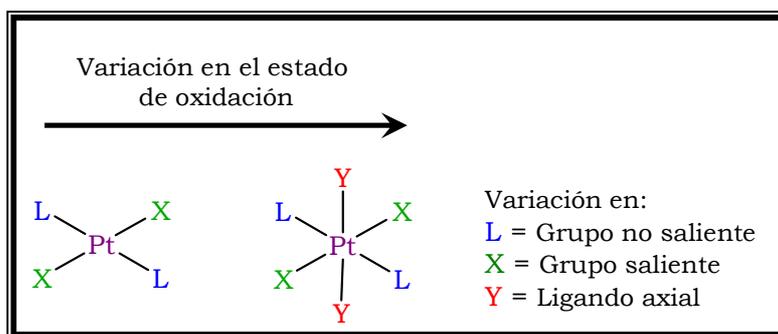


Figura 1.9. Variaciones posibles en los complejos *trans* de platino.

#### 1.1.5.1 Variaciones en los ligandos no salientes.

Los ligandos L (Figura 1.8) se conocen como grupo no saliente, debido a que forman enlaces termodinámicamente estables con el platino y que no se rompen durante la formación de aductos con el ADN. Suelen ser ligandos nitrógeno dadores y las modificaciones de estos ligandos afectan directamente a la naturaleza de los aductos resultantes con el ADN.<sup>52-53</sup> Se han sintetizado y estudiado muchos complejos de platino, con una gran variedad de ligandos no salientes, en los siguientes apartados se comentarán los más importantes.

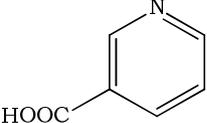
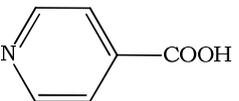
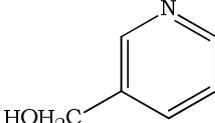
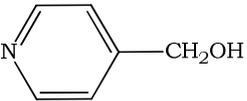
- **Complejos de Pt(II) con ligandos amina**

Los complejos de platino con aminas alifáticas, aromáticas, etc. han surgido como parte de las nuevas alternativas, para intentar obtener complejos más efectivos contra el cáncer. Un ejemplo de la influencia del grupo no saliente, se aprecia al comparar los complejos *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(dma)(ma)] y *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(dma)(ipa)], donde el complejo con dimetilamina (dma) y metilamina (ma), mostró una importante actividad *in vitro*, en comparación a su análogo con dma e ipa (isopropilamina). El estudio del comportamiento en disolución de estos complejos mostró, que

el complejo dma/ma se hidroliza en menor proporción en el equilibrio, lo que puede explicar que alcance el ADN en mayor proporción una vez está en el medio biológico.<sup>54</sup>

Se estudiaron otros complejos *trans*-Pt(II) con aminas alifáticas y aromáticas (como ácido 3-picolínico, ácido 4-picolínico e (hidroximetil)piridina), para determinar su influencia y la de sus sustituyentes sobre la actividad citotóxica. En este caso los complejos con (hidroximetil)piridina, mostraron tener buena actividad antitumoral, mientras que los complejos con ácido picolínico, no resultaron activos frente al panel de células evaluado MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria), NCI-H460 (cáncer de pulmón) y SF268 (cáncer epitelial del sistema nervioso central) (Tabla 1.A ).<sup>55</sup>

Tabla 1.A. Actividad antitumoral de los complejos *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(L)(L')].

Amina aromática (L)	Amina alifática (L')	IC <sub>50</sub> (μM)		
		MCF-7	NCIH460	SF268
	NH <sub>3</sub>	NR	NR	NR
	NH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NR	NR	NR
	NH <sub>3</sub>	NR	NR	NR
	NH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NR	NR	NR
	NH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	7,5	9,8	3,8
	NH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10,0	10,9	4,0

NR= No reactivo

Los complejos con ácido picolínico, no mostraron citotoxicidad, probablemente debido a que no llegan, por alguna razón, al interior de la célula. Sin embargo, sus derivados de Pt(IV) de fórmula general *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(ac. picolínico)], si mostraron actividad antitumoral.<sup>56</sup>

A pesar de que los complejos de Pt(II) con ácido picolínico no mostraron actividad, tanto la presencia del grupo carboxilato como su posibilidad de oxidación a Pt(IV), deja abierta la oportunidad de funcionalización a través del acoplamiento con otras moléculas, que a la larga puedan dar a estos complejos propiedades antitumorales o de focalización del fármaco.

De hecho, en nuestro grupo de investigación se demostró que uniendo fragmentos de esteroides androgénicos a compuestos de Pt(II) con grupos piridinas(py), se pueden obtener complejos como los de la figura 1.10. Estos mostraron especial actividad en células de cáncer de mama que sobreexpresaban receptores de estrógeno. Lo que demostró que los complejos funcionalizados son capaces de cruzar la membrana celular, mientras que los complejos Pt(II)-py quedaban retenidos.<sup>57</sup>

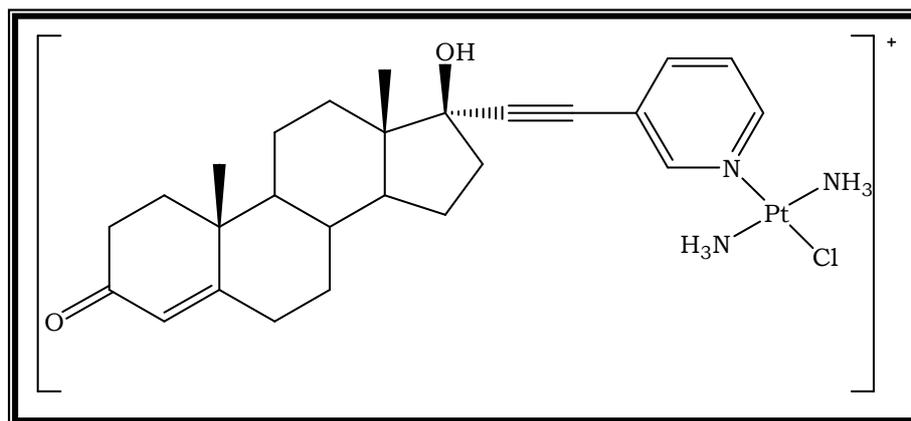


Figura 1.10. Complejo *trans* de Pt(II) funcionalizado con esteroide.

- **Complejos de Pt(II) con ligandos fosfina**

Las fosfinas, son ligandos ampliamente usados en química organometálica y en complejos de coordinación, debido a que al enlazarse a metales, su capacidad de donación vía  $\sigma$  y de retrodonación vía  $\pi$ , da mucha estabilidad al centro metálico, por lo que son parte importante en estudios de química de coordinación, catálisis y en otras aplicaciones que utilizan complejos metálicos. Además, su flexibilidad, sus propiedades estéricas y electrónicas, así como su solubilidad y quiralidad, se pueden regular de manera precisa y controlada.<sup>58</sup>

Son pocos los complejos de platino con ligandos fosfina, que se han estudiado con fines terapéuticos. Sadler y colaboradores,<sup>59</sup> prepararon complejos con aminofosfinas (Figura 1.11). Estos complejos fueron evaluados en diferentes líneas celulares como LXFL (carcinoma de pulmón), OVXF (adenocarcinoma de ovario), A2780cisR, y en esta última resultaron ser muy activos. Estos resultados, llevaron a continuar con estudios sobre su mecanismo de acción. Así, Brabec y colaboradores,<sup>60</sup> encontraron que estos complejos forman aductos con el ADN más rápidamente que el cisplatino, y sugieren que el perfil de actividad de los complejos de platino(II) aminofosfina, es diferente al del cisplatino y análogos relacionados.

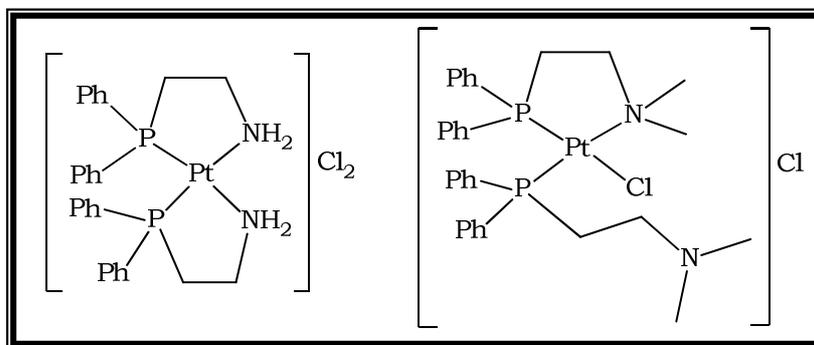


Figura 1.11. Complejos de platino(II) aminofosfina.

Esto ha hecho que surjan nuevos complejos con este tipo de ligandos, sin embargo, las dificultades adicionales que conlleva su síntesis como: métodos de obtención muy largos, difícil purificación y bajos rendimientos, han limitado su estudio.

Los primeros ejemplos de complejos antitumorales de Pt(II) con fosfinas monodentadas son, los complejos *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PR<sub>3</sub>)], sintetizados por nuestro grupo de investigación en el año 2003.<sup>61-62</sup> Estos complejos mostraron actividad citotóxica, no sólo en células sensibles al cisplatino sino también, en células resistentes (Figura 1.12).<sup>61</sup>

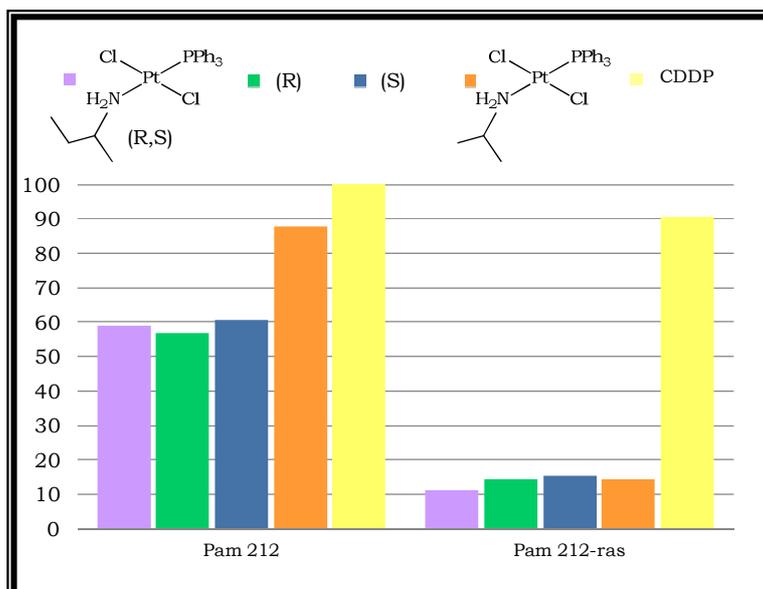


Figura 1.12. Actividad citotóxica en valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los complejos *trans*.[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)].

Esta especial actividad antitumoral llevó a pensar que es el carácter hidrofóbico de la fosfina PPh<sub>3</sub>, lo que hace a estos complejos más efectivos, frente a células resistentes a CDDP, y que en consecuencia podrían tener un mecanismo de acción diferente.

Nuestro grupo de investigación decidió ampliar la familia de complejos *trans*.[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PR<sub>3</sub>)], estudiando el efecto de otra fosfina (PMe<sub>2</sub>Ph) frente a aminas (NR<sub>3</sub>), con distintos sustituyentes, para ver el impacto de estas modificaciones sobre el ciclo celular y la actividad antitumoral.<sup>62</sup>

El estudio del ciclo celular, permite determinar en qué fase tiene mayor efecto el fármaco. En el caso del cisplatino, se conoce que la detención del ciclo celular se produce en las fases G1 y G2/M (primera fase de crecimiento (G1) y tercera fase de crecimiento y mitosis).<sup>63</sup> Los complejos *trans*.[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] no mostraron acumulación ni en G1 ni en G2/M, por lo que en este caso, la apoptosis debe desencadenarse por un mecanismo diferente al del cisplatino. El efecto de las fosfinas PPh<sub>3</sub> y PMe<sub>2</sub>PH en la actividad citotóxica de estos complejos *trans* se muestra en la figura 1.13.<sup>62</sup>

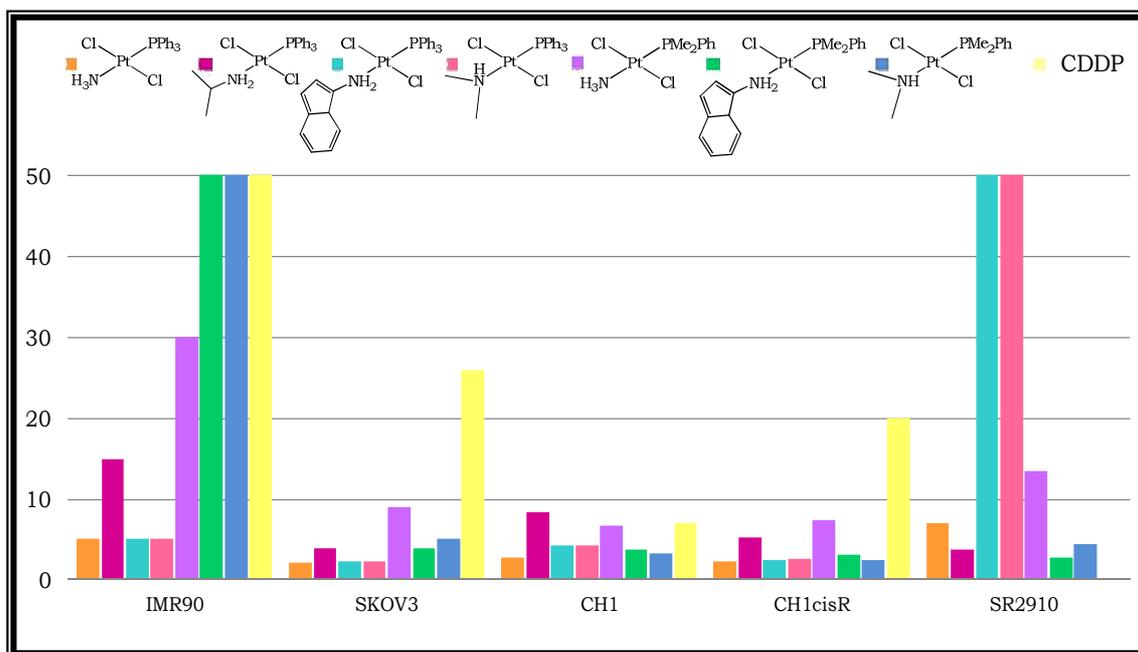


Figura 1.13. Actividad citotóxica en valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los complejos *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PR<sub>3</sub>)].

Los resultados muestran que los complejos con PPh<sub>3</sub> son más citotóxicos, en la mayoría de las células estudiadas, por lo que parece que el ligando trifenilfosfina, puede contribuir a aumentar la actividad antitumoral de los complejos.

### 1.1.5.2 Variaciones en los ligandos salientes

Se ha demostrado que los cloruros son los ligandos más reactivos en el CDDP y que el enlace Pt-N es el más estable e inerte frente a ataques nucleofílicos. Por lo tanto, los ligandos cloruros son los ligandos salientes. Las variaciones en estos ligandos han dado lugar a una gran variedad de nuevos complejos de platino.

El carboplatino (*cis*-diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato) platino(II)), es parte de una segunda generación de complejos, donde los grupos cloruro se han sustituido por grupos carboxilatos de un ligando quelato bidentado. Se utiliza en especial para el tratamiento de cáncer de ovario, cuello uterino y carcinoma de pulmón.<sup>64</sup> Aunque, tanto el cisplatino como el carboplatino, poseen el mismo ligando no saliente (NH<sub>3</sub>), los efectos secundarios del cisplatino son más severos que los del carboplatino, lo que se atribuye a la diferencia en el ligando saliente. Por lo tanto, estos parecen tener mucha importancia en las propiedades

farmacológicas de los agentes antitumorales de platino. Por ejemplo, tanto su lipofilia como su hidrofilia, están influenciadas por el tipo de ligando saliente, y estas características son cruciales para su biodisponibilidad y biodistribución en el cuerpo humano.<sup>65</sup>

Estas pequeñas, pero importantes diferencias, acerca del efecto que tiene el ligando saliente sobre el potencial antitumoral de los complejos de platino, pueden ser claves para el diseño de nuevos complejos, más efectivos y menos tóxicos. Sin embargo, hasta la fecha sólo se han estudiado un número muy reducido de ligandos salientes diferentes a cloruro.

Uno de los ligandos salientes con más relevancia en los últimos años, ha sido el ligando yoduro, que hemos desarrollado con especial interés en nuestro grupo de investigación, obteniendo resultados excelentes, que se recogen y analizan en el capítulo 2 de esta tesis.

#### **1.1.5.3 Variaciones en el estado de oxidación**

Los fármacos de platino utilizados en clínica actualmente, deben administrarse por infusión intravenosa, lo cual es incómodo para los pacientes. La necesidad de un medicamento que pueda ser administrado por vía oral y que a su vez genere menos efectos secundarios, ha suscitado el interés por el diseño y la síntesis de complejos de platino(IV).<sup>66</sup>

Los complejos de Pt(IV), se obtienen por oxidación de sus análogos de Pt(II). Esta variación en el estado de oxidación, introduce dos sitios de coordinación adicionales, y los nuevos ligandos axiales proporcionan la oportunidad de modificar propiedades tales, como potencial de reducción, lipofilia y la especificidad de los complejos.<sup>67</sup>

Los complejos de Pt(IV) son termodinámicamente estables y cinéticamente inertes, pero en presencia de agentes reductores, pueden dar paso a la formación de la especie activa de Pt(II), que finalmente será la responsable de la actividad antitumoral. Se considera entonces, que los complejos de Pt(IV) actúan como profármacos, ya que su mecanismo de acción involucra una activación *in vivo*, extra o intra celularmente, por

reducción del complejo a la especie activa de platino(II), mediante la eliminación de los ligandos axiales<sup>68</sup> (Figura 1.14). En el capítulo 4 de esta tesis se explica con más detalle los aspectos relacionados con los complejos de Pt(IV).

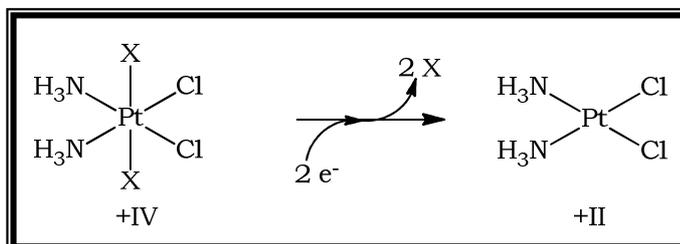


Figura 1.14. Mecanismo general de activación de los complejos de Pt(IV).

## **1.2 Objetivos y estructura de la memoria**

Los objetivos de esta tesis doctoral se han desarrollado en cinco capítulos que explicamos a continuación y las conclusiones se recogen en el último capítulo.

En el capítulo **2** nos planteamos estudiar complejos *trans* de Pt(II) con yoduro y con aminas alifáticas diferentes, basándonos en los buenos resultados alcanzados con los complejos de *trans*-Pt(II) con ligandos yoduros como grupo saliente. En esta línea, nos propusimos también la síntesis de nuevos complejos usando la combinación de una amina alifática con un grupo trifenilfosfina, para determinar el efecto de estos ligandos no salientes y su repercusión en la actividad antitumoral.

En el capítulo **3**, nos propusimos continuar los estudios de complejos de platino con ligandos fosfina, ya que estos con anterioridad habían dado excelentes resultados en complejos de fórmula general *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)PPh<sub>3</sub>]. Así, se estudió el efecto del grupo fosfina (PPh<sub>3</sub>) en complejos de Pt(II) que contienen dos ligandos salientes diferentes: cloruro y acetato. En este caso, la finalidad es conseguir complejos más selectivos y menos tóxicos, combinando el efecto del grupo cloruro (Cl<sup>-</sup>) (de acuación rápida) con el grupo acetato (de acuación lenta), ya que además la presencia de grupos carboxilato ha demostrado provocar menos efectos tóxicos en fármacos tales como el carboplatino.

En el capítulo **4**, nos propusimos intentar potenciar la actividad de los complejos con fosfina y ligandos cloruros, oxidándolos a Pt(IV). Además de estudiar la actividad antitumoral de los nuevos complejos, también creímos necesario investigar los factores más relacionados con su mecanismo de reducción en el medio biológico, para conocer en mayor medida sus ventajas.

En los capítulos **5** y **6**, nuestro objetivo fue el desarrollo de nuevos complejos *trans* de platino con moléculas que sirvan de transportadores y/o focalicen la molécula hacia dianas específicas (molecular targeting). Para lograr este objetivo nos planteamos dos vías: la funcionalización de

complejos platino con el péptido cíclico RGD (capítulo **5**) y el acoplamiento de complejos de Pt(II) con renio o tecnecio, a través de un ligando pirazolilo (capítulo **6**).

El Capítulo **7**, recoge un resumen en inglés del trabajo realizado en esta tesis doctoral, además de las conclusiones.

Cada capítulo de esta memoria cuenta con una introducción, que pone de manifiesto los antecedentes y trabajos previos que impulsaron el desarrollo de cada familia de complejos. Luego se describe y discute la síntesis, caracterización y los diferentes estudios realizados para determinar las propiedades antitumorales de estos complejos. El trabajo experimental se describe en detalle al final de cada capítulo junto a las referencias bibliográficas.

### **1.3 Bibliografía**

- <sup>1</sup> E. G. Talman, W. Bruening, J. Reedijk, A. L. Spek, N. Veldman, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 854.
- <sup>2</sup> G. B. Faguet, *Int. J. Cancer*, **2015**, 1;136(9), 2022
- <sup>3</sup> P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.*, **1991**, 36, 1.
- <sup>4</sup> J. Reedijk, *Chem. Commun.*, **1996**, 801.
- <sup>5</sup> I. Haiduc, C. Silvestru, *Coord. Chem. Rev.*, **1990**, 99, 253.
- <sup>6</sup> A. Levina, A. Mitra, P. A. Lay, *Metallomics*, **2009**, 1, 458.
- <sup>7</sup> E. Melendez, *Crit Rev Oncol Hematol*, **2002**, 42, 309.
- <sup>8</sup> C. K. Mirabell, R. K. Johnson, D. T. Hill, L. F. Faucette, G. R. Girard, G. Y. Kuo, C. M. Sung, S. T. Crooke, *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, 218.
- <sup>9</sup> A. Bergamo, C. Gaiddon, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, G. Sava, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 106, 90.
- <sup>10</sup> K. Strohsfeldt, M. Tacke, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 1174.
- <sup>11</sup> H. Kopf, P. Kopf-Maier, *Angew Chem Int Ed Engl*, **1979**, 18, 477.
- <sup>12</sup> P. Koepf-Maier, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, 47, 1.
- <sup>13</sup> B. Desoize, *Anticancer Res.*, **2004**, 24, 1529.
- <sup>14</sup> K. O'Connor, C. Gill, M. Tacke, F. J. K. Rehmman, K. Strohsfeldt, N. Sweeney, J. M. Fitzpatrick, R. W. G. Watson, *Apoptosis*, **2006**, 11, 1205.
- <sup>15</sup> C. K. Mirabelli, R. K. Johnson, C. M. Sung, L. Faucette, K. Muirhead, S. T. Crooke, *Cancer Res.*, **1985**, 45, 32.
- <sup>16</sup> G. Lupidi, L. Avenali, M. Bramucci, L. Quassinti, R. Pettinari, H. K. Khalife, H. Gali-Muhtasib, F. Marchetti, C. Pettinari, *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, 124, 78.
- <sup>17</sup> B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature*, **1969**, 222, 385.
- <sup>18</sup> N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 8113.
- <sup>19</sup> K. Tanaka, T. Kunimatsu, J. Shimakura, M. Hanada, *Sumitomo Kagaku (Osaka, Jpn.)*, **2011**, 39.
- <sup>20</sup> M. Peyrone, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1844**, 51, 1.
- <sup>21</sup> A. Werner, *Zeit. anorg. Chem.*, **1893**, 3, 267.
- <sup>22</sup> S. C. Dkhara, *Indian J. Chem.*, **1970**, 8, 193.
- <sup>23</sup> G. J. Bosl, R. J. Motzer, *N. Engl. J. Med.*, **1997**, 337, 242.
- <sup>24</sup> F. Arnesano, S. Scintilla, G. Natile, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2007**, 46, 9062.
- <sup>25</sup> R. A. Alderden, M. D. Hall, T. W. Hambley, *J. Chem. Educ.*, **2006**, 83, 728.
- <sup>26</sup> L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer*, **2007**, 7, 573.
- <sup>27</sup> S. J. Berners-Price, T. A. Frenkiel, U. Frey, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 789.
- <sup>28</sup> D. Wang, S. J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2005**, 4, 307.

- <sup>29</sup> V. Monjardet-Bas, M.-A. Elizondo-Riojas, J.-C. Chottard, J. Kozelka, *Angew Chem Int Ed Engl*, **2002**, *41*, 2998.
- <sup>30</sup> S. J. Berners-Price, T. G. Appleton in *The chemistry of cisplatin in aqueous solution, Vol. /Cap. 1* Humana Press Inc., **2000**, pp. 3.
- <sup>31</sup> A. V. Klein, T. W. Hambley, *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 4911.
- <sup>32</sup> P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 12309.
- <sup>33</sup> U.-M. Ohndorf, M. A. Rould, Q. He, C. O. Pabo, S. J. Lippard, *Nature*, **1999**, *399*, 708.
- <sup>34</sup> M. Links, C. Lewis, *Drugs*, **1999**, *57*, 293.
- <sup>35</sup> M. J. Piccart, H. Lamb, J. B. Vermorken, *Ann Oncol*, **2001**, *12*, 1195.
- <sup>36</sup> M. J. Cleare, J. D. Hoeschele, *Bioinorg. Chem.*, **1973**, *2*, 187.
- <sup>37</sup> T. W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, *166*, 181.
- <sup>38</sup> G. Natile, M. Coluccia, *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, *216-217*, 383.
- <sup>39</sup> C. Hofr, V. Brabec, *Biopolymers*, **2005**, *77*, 222.
- <sup>40</sup> V. Brabec, M. Leng, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1993**, *90*, 5345.
- <sup>41</sup> T. Peleg-Shulman, Y. Najajreh, D. Gibson, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *91*, 306.
- <sup>42</sup> V. Marchan, E. Pedroso, A. Grandas, *Chem. - Eur. J.*, **2004**, *10*, 5369.
- <sup>43</sup> M. Coluccia, A. Nassi, F. Loseto, A. Boccarelli, M. A. Mariggio, D. Giordano, F. P. Intini, P. Caputo, G. Natile, *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 510.
- <sup>44</sup> N. Farrell, L. R. Kelland, J. D. Roberts, M. Van Beusichem, *Cancer Res.*, **1992**, *52*, 5065.
- <sup>45</sup> U. Bierbach, Y. Qu, T. W. Hambley, J. Peroutka, H. L. Nguyen, M. Doedee, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 3535.
- <sup>46</sup> M. Coluccia, A. Nassi, A. Boccarelli, D. Giordano, N. Cardellicchio, F. P. Intini, G. Natile, A. Barletta, A. Paradiso, *Int. J. Oncol.*, **1999**, *15*, 1039.
- <sup>47</sup> E. I. Montero, S. Diaz, A. M. Gonzalez-Vadillo, J. M. Perez, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4264.
- <sup>48</sup> S. M. Aris, N. P. Farrell, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, *2009*, 1293.
- <sup>49</sup> A. G. Quiroga, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, *114*, 106.
- <sup>50</sup> M. Coluccia, A. Nassi, A. Boccarelli, D. Giordano, N. Cardellicchio, D. Locker, M. Leng, M. Sivo, F. P. Intini, G. Natile, *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, *77*, 31.
- <sup>51</sup> J. M. Perez, L. R. Kelland, E. I. Montero, F. E. Boxall, M. A. Fuertes, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, *Mol. Pharmacol.*, **2003**, *63*, 933.
- <sup>52</sup> A. P. Silverman, W. Bu, S. M. Cohen, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 49743.
- <sup>53</sup> K. S. Lovejoy, R. C. Todd, S. Zhang, M. S. McCormick, J. A. D'Aquino, J. T. Reardon, A. Sancar, K. M. Giacomini, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*, 8902.
- <sup>54</sup> L. Cubo, A. Casini, C. Gabbiani, G. Mastrobuoni, L. Messori, J. Jimenez-Barbero, C. Navarro-Ranninger, A. G. Quiroga, *Chem. - Eur. J.*, **2009**, *15*, 9139.

- <sup>55</sup> R. M. Medina, J. Rodriguez, A. G. Quiroga, F. J. Ramos-Lima, V. Moneo, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, M. J. Macazaga, *Chem. Biodiversity*, **2008**, 5, 2090.
- <sup>56</sup> M. J. Macazaga, J. Rodriguez, A. G. Quiroga, S. Peregina, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, R. M. Medina, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 4762.
- <sup>57</sup> M. Huxley, C. Sanchez-Cano, M. J. Browning, C. Navarro-Ranninger, A. G. Quiroga, A. Rodger, M. J. Hannon, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 11353.
- <sup>58</sup> M. B. Smith, *Platinum Met. Rev.*, **2008**, 52, 215.
- <sup>59</sup> A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, **1996**, 1785.
- <sup>60</sup> K. Nepelchova, J. Kasparkova, O. Vrana, O. Novakova, A. Habtemariam, B. Watchman, P. J. Sadler, V. Brabec, *Mol. Pharmacol.*, **1999**, 56, 20.
- <sup>61</sup> F. J. Ramos-Lima, A. G. Quiroga, J. M. Perez, M. Font-Bardia, X. Solans, C. Navarro-Ranninger, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2003**, 1591.
- <sup>62</sup> F. J. Ramos-Lima, A. G. Quiroga, B. Garcia-Serrelde, F. Blanco, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 2194.
- <sup>63</sup> Z. H. Siddik, *Oncogene*, **2003**, 22, 7265.
- <sup>64</sup> L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer*, **2007**, 7, 573.
- <sup>65</sup> M. Galanski, B. K. Keppler, *Anticancer Agents Med Chem*, **2007**, 7, 55.
- <sup>66</sup> M. D. Hall, R. D. Dolman, T. W. Hambley (2004) *Metal complexes in tumor diagnosis and as anticancer agents. Metal ions and biological systems*. Dekker, New York. 298.
- <sup>67</sup> M. D. Hall, H. R. Mellor, R. Callaghan, T. W. Hambley, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 3403.
- <sup>68</sup> M. D. Hall, T. W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 232, 49.



**Capítulo 2.**  
**Complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(L)]**



En este capítulo se describe la síntesis y caracterización de nuevos complejos de platino (II) con ligandos yoduro, de fórmula general *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(L)], donde L puede ser amina alifática o fosfina (PPh<sub>3</sub>) (Figura 2.1), los cuales se han evaluado frente a distintas células tumorales. También se ha estudiado su comportamiento en las diferentes fases del ciclo celular y analizado su interacción con ADN.

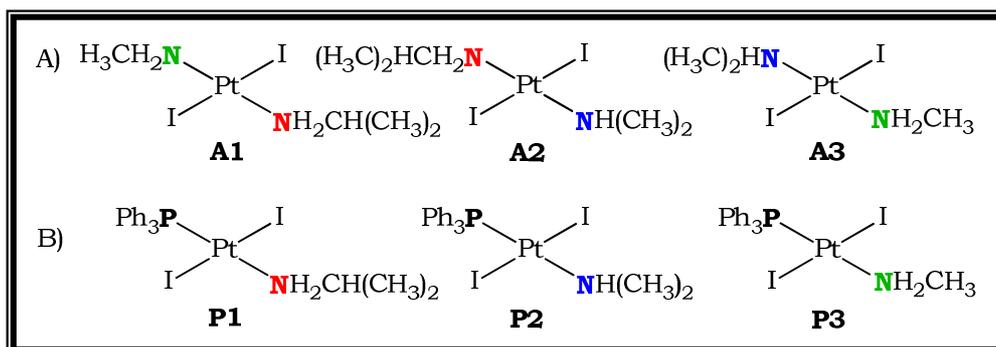


Figura 2.1. A) Complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')]. B) Complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)].

## 2.1 Antecedentes

El cisplatino y algunos de sus análogos, han sido ampliamente investigados y en los estudios realizados se muestra la importancia que tienen los ligandos, tanto salientes como no salientes, para modular las propiedades anticancerígenas de los complejos. También han revelado que el enlace Pt-N es muy estable e inerte frente a ataques nucleofílicos y que los enlaces Pt-Cl son los más reactivos, por lo que se han considerado siempre como ligandos salientes.

En un principio, los complejos análogos al cisplatino con yoduro como ligando saliente, no fueron objeto de estudios farmacológicos, debido a que el *cis*-[PtI<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] no mostró actividad anticancerígena.<sup>1</sup> Esto se atribuyó, entre otros motivos, a la mayor estabilidad del enlace Pt-I,<sup>2</sup> poco reactivo frente a reacciones de hidrólisis. Sin embargo, posteriormente se publicaron trabajos, que demostraron que complejos de Pt(II) y Pt(IV) con ligandos yoduro, poseían una reactividad considerable y un comportamiento especial frente a importantes dianas biológicas<sup>3</sup> (como por ejemplo, albúmina de suero humano, <sup>4</sup> glutatión, etc.).<sup>5</sup>

### 2.1.1 Complejo *cis*-[PtI<sub>2</sub>(isopropilamina)<sub>2</sub>]

En la bibliografía hemos encontrado pocos ejemplos de complejos de Pt(II) con ligandos yoduro, con fines terapéuticos. En la mayoría de ellos, los yoduros sólo se utilizan como complejos de partida o como intermedios para obtener diferentes complejos de platino.<sup>6-7</sup>

Nuestro grupo de investigación realizó uno de los primeros estudios sobre la actividad antitumoral y la reactividad frente a biomoléculas del complejo *cis*-[PtI<sub>2</sub>(isopropilamina)<sub>2</sub>].<sup>8</sup> En el primer estudio se sintetizó, caracterizó y evaluó su actividad antitumoral. Este complejo, tal y como se observa en la figura 2.2, mostró ser más activo que el propio cisplatino en células cancerígenas de ovario (A2780), mama (HBL-100 y T-47D), cuello uterino (HeLa), células no pequeñas de pulmón (SW1573) y células de cáncer de colon (WiDr), estos datos están en valores de GI<sub>50</sub> (que es la concentración de droga que inhibe el 50% del crecimiento celular).

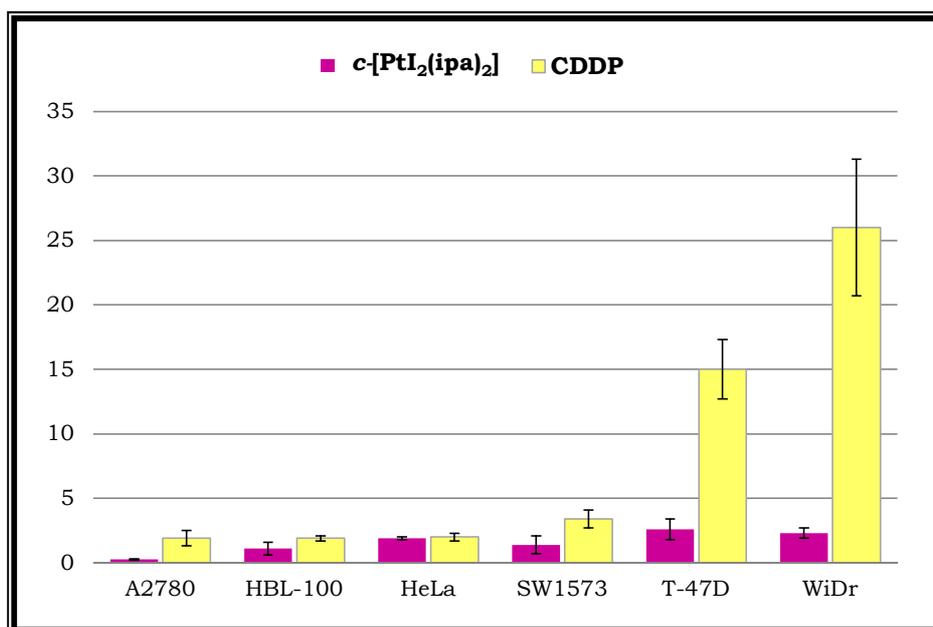


Figura 2.2. Actividad antiproliferativa en valores de GI<sub>50</sub> (μM) del complejo *cis*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)<sub>2</sub>] comparado con cisplatino en diferentes líneas celulares.

Estos resultados llevaron a pensar, que los complejos de platino con yoduro como ligando saliente, podrían estar regidos por un mecanismo de acción, diferente al del cisplatino. Por lo tanto, se estudió la interacción de *cis*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)<sub>2</sub>] con modelos biológicos. Se comenzó utilizando el citocromo *c* (cyt *c*) y la N-acetilmetionina (N-ActMet). Las técnicas más útiles en este

tipo de estudios fueron, la espectrometría de masas con ionización por electroespray (ESI-MS) y <sup>195</sup>Pt-RMN, que pusieron de manifiesto la formación de varios aductos de fórmula molecular PtI<sub>2</sub>-cyt c. En este tipo de aductos sólo se observa la presencia de ligandos yoduro y la pérdida de isopropilamina, ya que en ningún momento se detectaron aductos Pt(ipa)-cyt c, que es el aducto típico para los complejos *trans* con ligandos cloruro. La interacción del complejo de Pt con N-ActMet permitió una total caracterización de este tipo de aductos, confirmando los resultados ya observados con el cyt c.<sup>9-10</sup>

Un estudio más reciente, realizado también por nuestro grupo de investigación,<sup>11</sup> demostró con una estructura de rayos X (Figura 2.3) que el complejo *cis*-[PtI<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] reacciona con la proteína lisozima (de la clara de huevo de gallina) dando lugar a un aducto, en el que el platino se ha coordinado selectivamente al imidazol de la His15 (Histidina 15), desplazando uno de los ligandos amoniaco y manteniendo ambos ligandos yoduro unidos al platino.

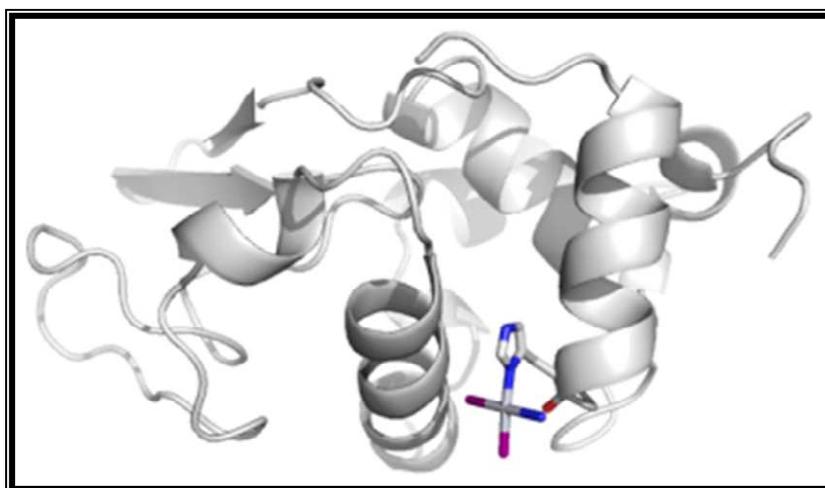


Figura 2.3. Estructura del aducto formado entre el complejo *cis*-[PtI<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] y la proteína lisozima (de la clara de huevo de gallina).

### 2.1.2 Complejos *cis* y *trans* de platino(II) con ligandos yoduro y aminas

Como ya hemos mencionado, el uso del cisplatino en clínica abrió un intenso campo de investigación, donde se establecieron algunas pautas para el diseño de nuevos fármacos basados en el platino, como por

ejemplo, el hecho de que la estructura *cis* era indispensable para que los complejos tuviesen actividad antitumoral.<sup>12</sup> Sin embargo, los complejos *trans* de platino(II), dieron un giro en el diseño de las metalodrogas, surgiendo como una alternativa para superar las limitaciones del cisplatino y sus análogos.<sup>13-14</sup> Además, nosotros hemos demostrado que los ligandos cloruros, tampoco son indispensables para tener actividad antitumoral.<sup>8,11</sup>

Así, nuestro grupo de investigación decidió completar esta familia de compuestos con yoduros y aminas alifáticas iguales. Una estrategia muy común para preparar este tipo de complejos, es el uso de intermediarios diméricos con yoduros puente como se muestra en la Figura 2.4.<sup>15</sup> donde L y L' pueden ser aminas alifáticas,<sup>16-17</sup> aromáticas<sup>18</sup> y ligandos N-heterocíclicos<sup>19</sup> (Figura 2.4).

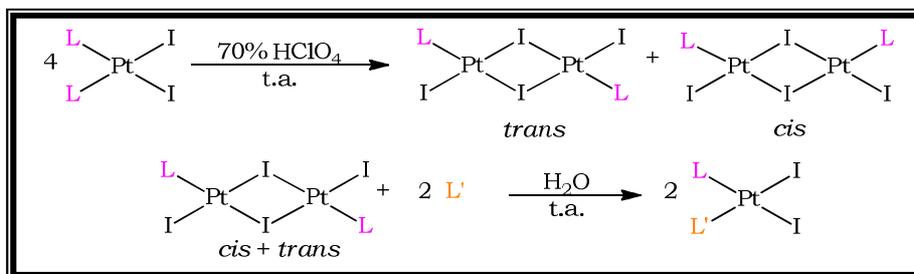


Figura 2.4. Síntesis de complejos *cis*-[Pt<sub>2</sub>(L)L'] mediante el uso de dímeros de puentes iodo como intermediarios.

Sin embargo, nuestro laboratorio utilizó un método mucho más sencillo, que no requiere la síntesis del dímero y que permite obtener los complejos deseados en un sólo paso (Figura 2.5).

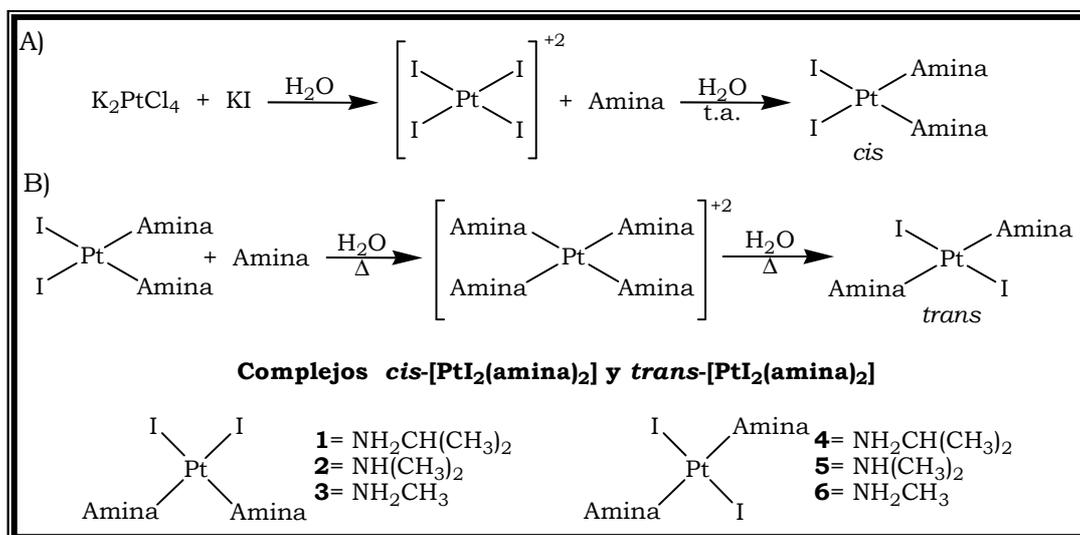


Figura 2.5. Síntesis: A) complejos *cis* y B) complejos *trans*. Familia de complejos *cis* y *trans* de Pt(II) con ligando yoduro y aminas alifáticas.

Todos los complejos *cis*-[PtI<sub>2</sub>(L)(L')] y *trans*-[PtI<sub>2</sub>(L)(L')], donde L=L', (Figura 2.6, complejos **1-6**) mostraron poseer actividad citotóxica, incluso en algunos casos con valores mejores que el cisplatino, en valores de TGI (concentración de inhibición total de crecimiento).<sup>20</sup> Los resultados de la actividad antiproliferativa mostraron, que los complejos de estructura *trans* con isopropilamina (**4**) y dimetilamina (**5**) son mucho más efectivos, que sus análogos *cis* y que el cisplatino.

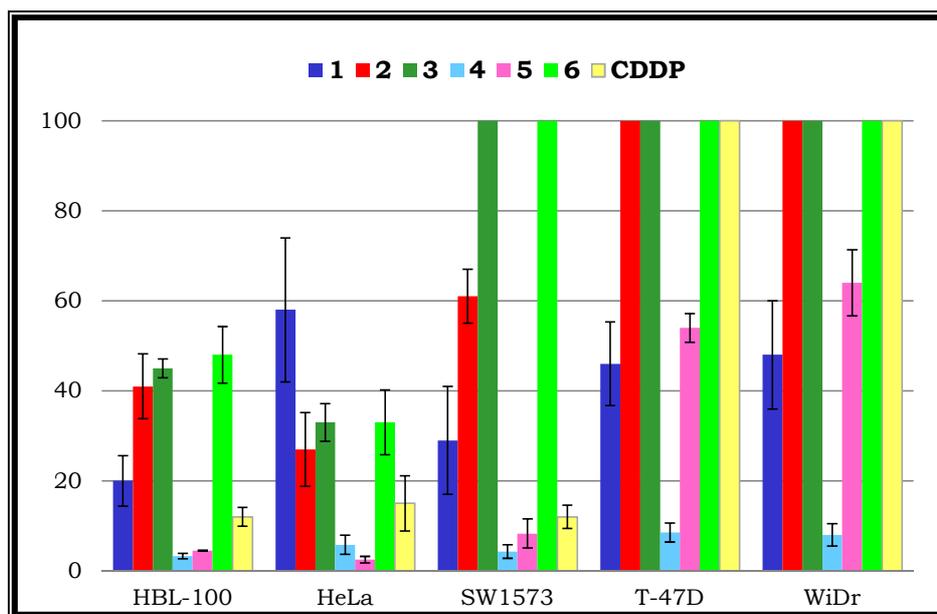


Figura 2.6. Actividad antiproliferativa en TGI ( $\mu\text{M}$ ) para la familia de complejos *cis* y *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)<sub>2</sub>] en líneas tumorales humanas.

En este trabajo también se estudió el comportamiento en disolución, el ciclo celular y la interacción con modelos biológicos de esta familia de compuestos, debido a que la existencia de enlace Pt-I, podría implicar otro tipo de interacciones, e incluso, con biomoléculas distintas al ADN. Los resultados de estos estudios frente a modelos biológicos como N-AcMet y cyt c, mostraron que estos complejos *trans* son marcadamente menos reactivos que sus análogos *cis*. Y al contrario de lo observado con el complejo *cis*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)<sub>2</sub>] (descrito anteriormente), los isómeros *trans* forman aductos de forma clásica con las biomoléculas, manteniendo las aminas alifáticas en la esfera de coordinación y liberando los ligandos yoduro.

Como ejemplo de la importancia de nuestros resultados, a partir de su publicación, otros grupos de investigación también han sintetizado compuestos de platino con ligandos yoduro. Por ejemplo, Sitkowski y

colaboradores,<sup>21-22</sup> sintetizaron complejos con enlace Pt-I (Figura 2.7) cuya actividad citotóxica, era en algunos casos, del mismo orden de magnitud que el cisplatino. Ampliaron sus estudios variando el grupo saliente de los complejos y observando que este hecho, no parece ejercer gran influencia sobre la actividad anticancerígena, aunque sí sobre la solubilidad.

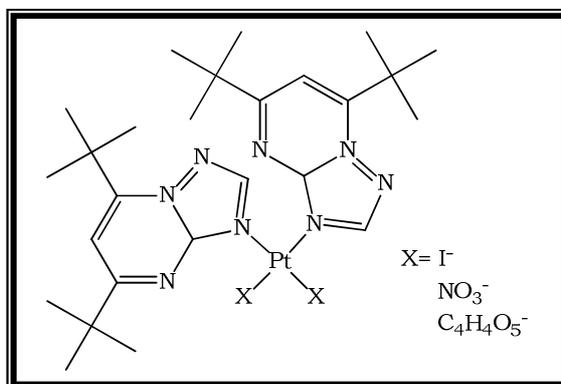


Figura 2.7. Complejos *cis*-[PtX<sub>2</sub>(dbtp)<sub>2</sub>] estudiados por Sitkowski y colaboradores.

En consecuencia el diseño, síntesis y estudio de complejos de platino con ligandos yoduro, pueden aportar nuevos datos, que permiten el desarrollo de compuestos más efectivos o en los que su mecanismo de acción sea capaz de superar los problemas de resistencia, a los fármacos comúnmente utilizados.

## 2.2 Discusión de resultados

### 2.2.1 Complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')]

#### 2.2.1.1 Síntesis y caracterización de complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')]

Dada la peculiar reactividad de los primeros complejos de Pt(II) con ligandos yoduro sintetizados en nuestro grupo, nos propusimos la síntesis de una segunda generación de complejos *trans* de fórmula general *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')], donde amina y amina' son aminas alifáticas diferentes (Figura 2.8).<sup>23</sup>

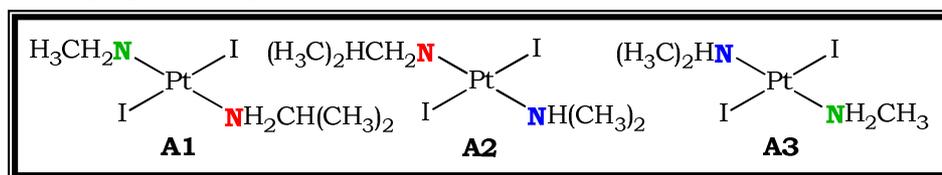


Figura 2.8. Complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')].

Para la síntesis de estos complejos fue necesaria la preparación de los compuestos de geometría *cis*, previamente publicados<sup>8,20</sup> (sección 2.1.2). Los complejos de estructura *trans* **A1**, **A2** y **A3**, se prepararon a partir de la reacción del precursor *cis* con la amina correspondiente. La reacción se lleva a cabo en agua y sin necesidad de aislar la tetramina ([Pt(amina)<sub>2</sub>(amina')<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, los complejos deseados se obtienen finalmente, por evaporación muy lenta a alta temperatura.

Todos los complejos fueron caracterizados por las técnicas usuales de análisis químico elemental, espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN y <sup>195</sup>Pt-RMN. El análisis elemental corrobora la fórmula molecular *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')] y el <sup>1</sup>H-RMN la coordinación de aminas diferentes. Los valores del desplazamiento químico en <sup>195</sup>Pt-RMN se encuentran dentro de los valores esperados para complejos con ligandos yoduro coordinado a platino(II), y no muestran variaciones relevantes con respecto a los análogos *cis*-[PtI<sub>2</sub>(amina)<sub>2</sub>] y *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)<sub>2</sub>], previamente sintetizados.<sup>8,20</sup>

### 2.2.1.2 Actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')]

La citotoxicidad de los complejos **A1**, **A2** y **A3**, se estudió en un amplio panel de líneas celulares, SAOS-2 (osteosarcoma humano), A375 (melanoma), T-47D (cáncer de mama), SF-268 (glioblastoma) y NCI-H460 (cáncer de pulmón). Los complejos muestran en la mayoría de los casos, una actividad citotóxica en valores de IC<sub>50</sub> (concentración de droga que produce un 50% de muerte en el cultivo celular) comparable al cisplatino, excepto en las células SAOS-2 y T-47D. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2.9. Los complejos sintetizados en general, mostraron ser activos, pero no eran mejores que el cisplatino; excepto en el caso del complejo **A2**, que mostró más efectividad que el cisplatino en la línea celular de cáncer de pulmón (NCI-H460).

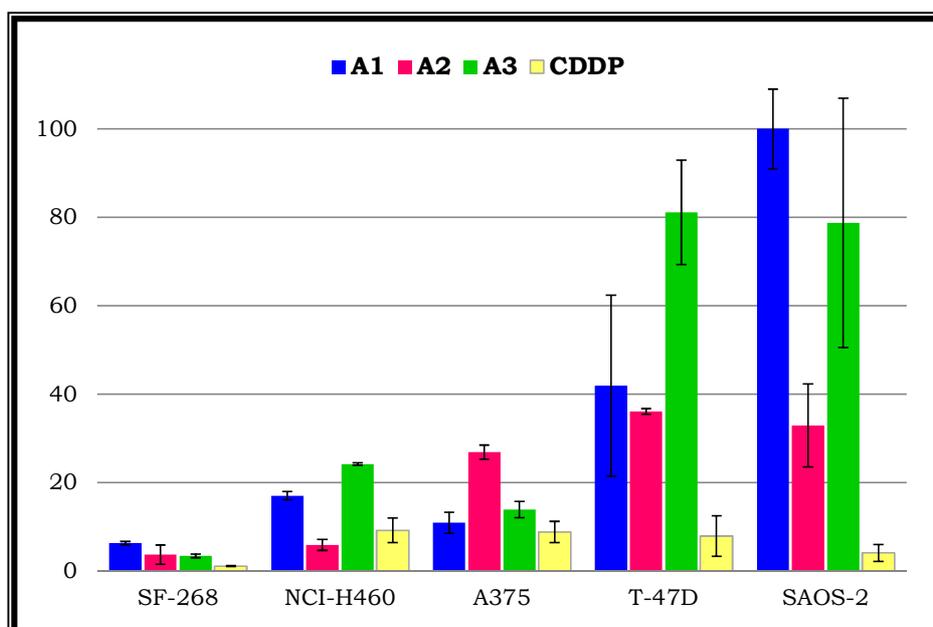


Figura 2.9. Actividad antitumoral en valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')].

En la bibliografía se ha encontrado que los complejos de platino de isomería *trans*, pueden formar aductos con el ADN y provocar daños, que podrían conllevar a la activación de p53,<sup>24-26</sup> por lo que estos complejos **A1**, **A2** y **A3** fueron probados en el par de líneas celulares isogénicas, HCT116+/+ y HCT116-/- de carcinoma de colon humano, donde la diferencia entre ambas líneas celulares es la presencia o ausencia de la proteína p53, respectivamente. La proteína p53 está relacionada con el

crecimiento de las células cancerígenas, se activa en respuesta al daño en el ADN<sup>27</sup> y algunas investigaciones han revelado que la presencia de p53 está relacionada con la sensibilidad al cisplatino, ya que algunas células tumorales con ausencia de p53, muestran resistencia a dicho fármaco.<sup>28-29</sup>

Los resultados de la actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')] (**A1**, **A2** y **A3**) y del cisplatino en las líneas isogénicas HCT116+/+ y HCT116-/-, se muestran en la figura 2.10. Los complejos no mostraron una actividad citotóxica mejor que la del cisplatino en la línea celular normal (HCT116+/+), sin embargo, en las células HCT116-/- (con ausencia de p53) el complejo **A2**, que posee las aminas alifáticas más voluminosas (ipa-dma), mostró tener mayor actividad que el cisplatino, lo que indica que es especialmente selectivo en esta línea celular con ausencia de p53. Este resultado es de particular relevancia, ya que indica que estos complejos *trans* de platino pueden ser eficaces en algunos tipos de cáncer, donde el cisplatino no presenta actividad antitumoral.

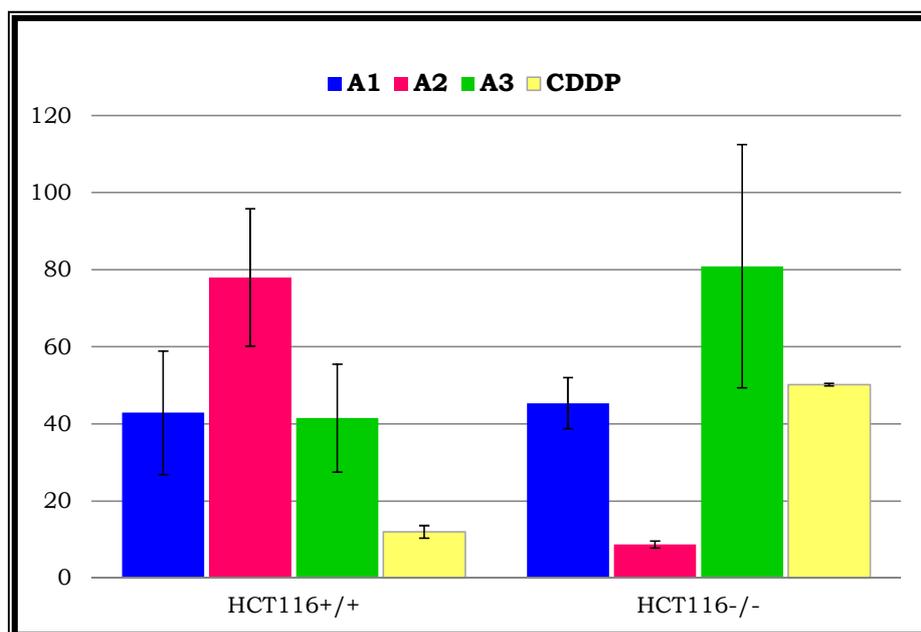


Figura 2.10. Actividad citotóxica en valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')] en HCT116+/+ y HCT116-/-.

### 2.2.1.3 Estudio de la interacción de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')] con el plásmido pBR322 y 5'GMP

El estudio de interacción de los complejos de platino con el plásmido superenrollado pBR322 se utiliza para determinar las interacciones con el

ADN. Por lo general se emplea como modelo el cisplatino, ya que se conoce que éste produce una severa distorsión en la hélice de ADN, en forma de deformación y desenrollamiento del plásmido, lo que se evidencia en un cambio en la movilidad electroforética del ADN.<sup>30</sup>

Los complejos *trans* diyoduros interaccionan con el plásmido superenrollado pBR322 de forma parecida al cisplatino, presentando el mismo tipo de deformación en la forma CCC, pero estos son menos reactivos. La variación de la movilidad electroforética se muestra con detalle en la figura 2.11. y se observa que, mientras que la forma covalente abierta (OC) permanece igual, la forma circular covalente cerrada del plásmido (CCC), disminuye marcadamente su movilidad, hasta llegar a una relación [complejo]/pares de bases ( $r_i$ ) en la que ambas formas del plásmido convergen (Carriles 7, 12 y 16).

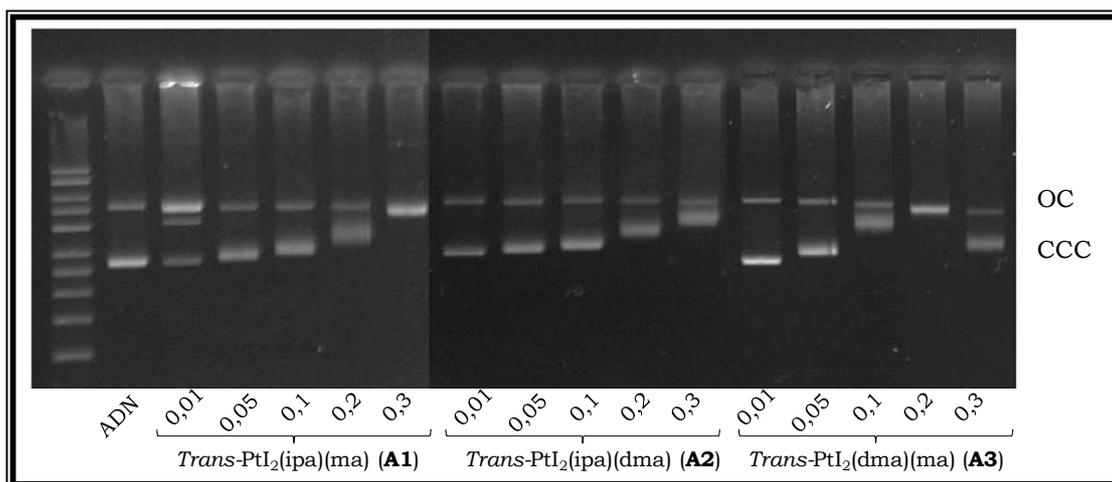


Figura 2.11. Electroforesis en gel de agarosa para los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')].

El plásmido pBR322 incubado con el complejo **A1** (Figura 2.11, carriles 3-7), empieza a mostrar variación de la movilidad de la forma OC a una relación de  $r_i$  de 0,05 y cuando  $r_i = 0,3$  ambas formas (CCC y OC) confluyen. Este mismo efecto se observó con **A2** (Figura 2.11, carriles 8-12) y **A3** (Figura 2.11, carriles 13-17) pero en diferente proporción, en el caso de **A3** el efecto es mucho más pronunciado y con **A2** las dos formas no llegan a converger en los valores de  $r_i$  estudiados, por lo que con este complejo es necesaria una mayor concentración para lograr el mismo efecto mostrado por **A1** y **A3**.

En conclusión, este resultado manifiesta que el complejo **A3** interactúa fácilmente con el plásmido, el complejo **A1** presenta una capacidad de interacción intermedia y que el complejo **A2** no logra modificar la naturaleza del plásmido en las mismas condiciones que el resto de los complejos.

La reacción de los complejos **A1**, **A2** y **A3**, con 5'GMP (5'-guanosina monofosfato) en una relación complejo:5'GMP= 4:1 se estudió empleando la monitorización por <sup>1</sup>H-RMN que nos permitió evaluar la variación de H8 de la 5'GMP (Figura 2.12). El desplazamiento de protón H8 se ve muy afectado cuando se produce la coordinación del platino a la GMP, a través de **N7**.

En la figura 2.12, se muestran los espectros de la reacción desde t=0 hasta t=17 h, donde se pueden identificar diferentes señales correspondientes a los aductos formados y su evolución. Así, **A3**, muestra la señal correspondiente al monoaducto-acuo (9,02 ppm) además de muchas señales de especiación que evolucionan con el tiempo y que se observan desde estadios tempranos de la reacción. Los complejos **A2** y **A1** también forman el monoaducto-acuo desde el inicio de la reacción pero, el aducto **A1** parece no estar muy favorecido ya que no llega a ser el producto mayoritario y pasado un tiempo todas las especies tienen la misma intensidad. En el complejo **A2** el monoaducto-acuo parece ser un poco más estable que los otros monoaductos-acuo en los primeros estadios de reacción pero, igualmente con el tiempo se llegan a observar muchas otras especies en disolución.

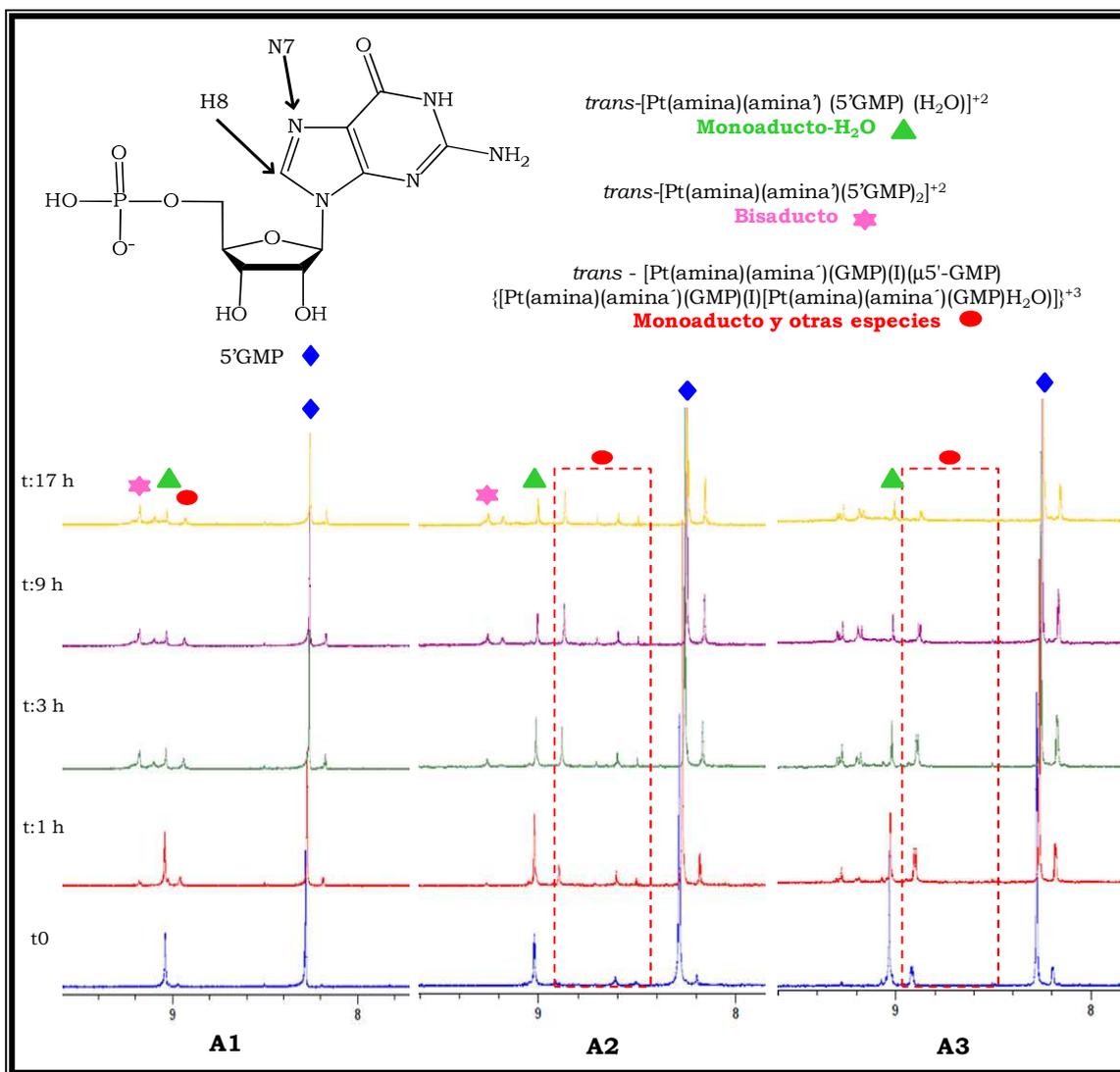


Figura 2.12. Monitorización por  $^1H$ -RMN de la reacción del complejo **A1**, **A2** y **A3** con 5'GMP.

En conclusión, la reactividad con 5'-GMP, al igual que en la interacción con el plásmido, el complejo **A3** reacciona más fácilmente con 5'GMP, seguido del complejo **A1** y siendo finalmente, el complejo **A2** el que reacciona más lentamente. Una alta reactividad con los modelos del ADN, no parece que se correlacione con una buena citotoxicidad, lo más conveniente sería una reactividad intermedia, para que el fármaco pueda llegar al blanco de acción en mayor proporción, ocasionando menos efectos secundarios. No obstante, es difícil establecer una regla inequívoca de la relación estructura-actividad, ya que cada complejo posee características individuales y reacciona de diferente manera en el medio biológico.

Los complejos  $trans\text{-PtI}_2(\text{amina})(\text{amina}')$  fueron evaluados frente a moléculas S-dadores, como N-AcMet y N-AcCys (N-acetil-cisteína) y

mostraron una tendencia similar a la observada en los complejos *trans*-PtI<sub>2</sub>(amina)<sub>2</sub> con pequeñas diferencias, como la formación preferente sólo de la especie monoadducto.<sup>23</sup>

Todos los resultados correspondientes a los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')] se han publicado en la revista J. Inorg. Biochem 2013 127:182-7.

## 2.2.2 Complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]

### 2.2.2.1 Síntesis y caracterización de complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]

Se han sintetizado y caracterizado nuevos complejos *trans* de Pt(II), de fórmula general *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] donde ipa= isopropilamina, dma= dimetilamina y ma= metilamina. El procedimiento llevado a cabo se discute a continuación y se esquematiza en la figura 2.13.

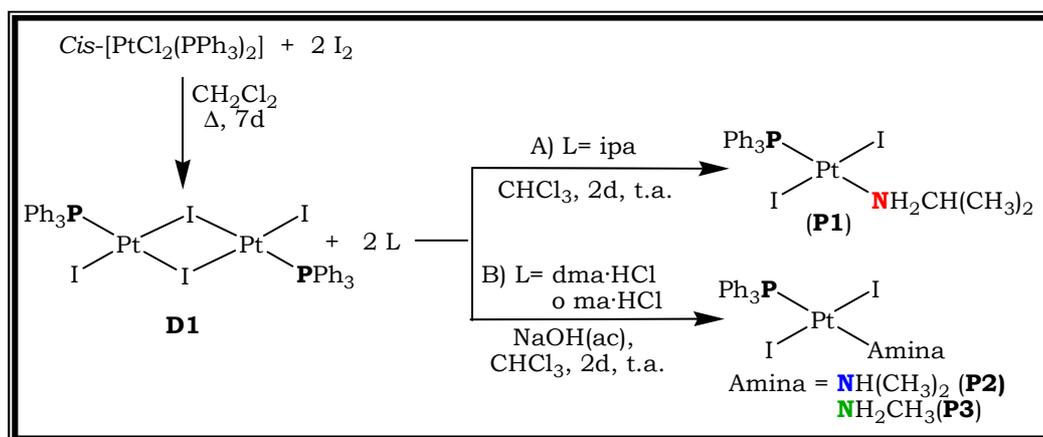


Figura 2.13. Esquema de síntesis de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)].

#### A) Síntesis del dímero *trans*-[Pt<sub>2</sub>I<sub>2</sub>(μ-I)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

La síntesis de complejos de Pt(II) con ligandos yoduro requiere la preparación de dímeros (complejo **D1** en figura 2.13). Como ya se ha mencionado en la introducción, hay ejemplos descritos en la bibliografía para complejos con ligandos de tipo N- dador, sin embargo, con fosfinas terciarias es muy limitado. Además, la información disponible para su síntesis no es muy detallada, a pesar de que se han utilizado ampliamente

como precursores, para dar otros complejos de tipo  $[\text{PtX}_2(\text{L})(\text{PR}_3)]$ , con una gran variedad de ligandos (L).<sup>31-32</sup>

En la primera síntesis para dar lugar a los complejos diméricos, (descrita en la bibliografía<sup>32</sup>) se partía de *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PPr}^n)_2]$  y KI en acetona, pero los resultados no fueron satisfactorios. De hecho, estos autores, observaron que en las reacciones de ruptura del dímero con aminas, el equilibrio se desplaza a favor del dímero, en el caso del yoduro, siendo incapaces de sintetizar el complejo final *trans*- $[\text{PtI}_2(\text{PPr}^n)(\text{amina})]$ .

La estructura del dímero *trans*- $[\text{Pt}_2\text{I}_2(\mu\text{-I})_2(\text{PPh}_3)_2]$  se publicó más tarde, pero su síntesis tampoco está descrita con detalle, mencionando tan sólo los productos de partida utilizados: di- $\mu$ -cloruro-bis- $[\eta^3\text{-2-metilalilplatino(II)}]$ , trifenilfosfina y yodo en cloroformo, siendo este procedimiento muy diferente al anterior. En esta publicación se demuestra a través de la estructura de rayos X, que los enlaces Pt-I son mucho más largos, debido al efecto *trans* del fósforo y por ello este dímero es un buen compuesto de partida para dar complejos monoméricos.

Introduciendo modificaciones en los procedimientos anteriores, realizamos varios intentos de síntesis y utilizando *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  y yodo logramos obtener una mezcla de dímeros *cis* y *trans* (sólo detectable en <sup>195</sup>Pt-RMN)<sup>a</sup>. Dicha mezcla nos conduce a los complejos finales *trans*- $[\text{PtI}_2(\text{amina})(\text{PPh}_3)]$  y se puede utilizar sin separar. La caracterización y purificación de la mezcla no fue fácil, ya que tanto los desplazamientos, como las constantes de acoplamiento Pt-P, no están publicadas en la bibliografía y el proceso de purificación de la mezcla resulta muy complicado, porque ambos isómeros (*cis* y *trans*) poseen una solubilidad muy semejante. En varios intentos de reacción, se logró aislar el dímero *trans*- $[\text{Pt}_2\text{I}_2(\mu\text{-I})_2(\text{PPh}_3)_2]$  (**D1**) puro, se obtuvieron cristales, se pudo conocer su estructura por difracción de rayos X y compararla con la publicada anteriormente.<sup>33</sup> Esto nos permitió confirmar que una de las especies de la

---

<sup>a</sup>  $\delta$  <sup>195</sup>Pt NMR (ppm)= -3885,11 ( $J_{\text{Pt-P}}=3567,27$  Hz) para *cis* y -4775,34 ( $J_{\text{Pt-P}}=3778,99$  Hz) para *trans*.

mezcla es el isómero *trans* y se pudo asignar inequívocamente a la señal de RMN de <sup>195</sup>Pt (-4775,34 ppm) para el dímero *trans*.

Este dímero también se intentó sintetizar empleando como material de partida *cis*-[PtI<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], con el propósito de disminuir el tiempo de reacción y optimizar las condiciones de la misma. Sin embargo, el rendimiento obtenido es nuevamente muy bajo, debido a la formación de diversas especies polinucleares. En la figura 2.14, se muestran los espectros de <sup>195</sup>Pt-RMN de los productos obtenidos empleando como compuestos de partida *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (Figura 2.14A) y *cis*-[PtI<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (Figura 2.14B) en la reacción con yodo.

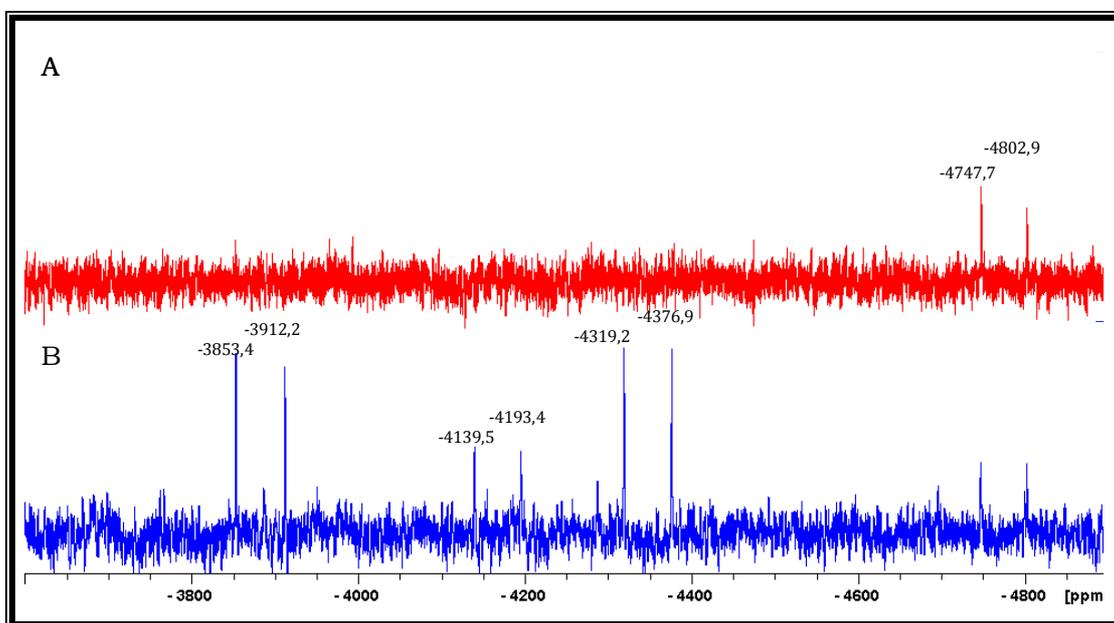


Figura 2.14. Espectro de <sup>195</sup>Pt-RMN, para el producto *trans*-[Pt<sub>2</sub>I<sub>2</sub>(μ-I)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], obtenido de la reacción con *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (A) y *cis*-[PtI<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (B).

En consecuencia, el método que nosotros proponemos para la síntesis del dímero *trans*-[Pt<sub>2</sub>I<sub>2</sub>(μ-I)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] es muy efectivo, ya que a pesar de requerir un mayor tiempo de reacción, conlleva un mejor rendimiento y una disminución de la cantidad de productos colaterales, típicos en reacciones con ligandos yoduro.

**B) Síntesis de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]**

La síntesis de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] se lleva a cabo mediante la ruptura del complejo dimérico empleando dos procedimientos, que aunque son muy similares, las pequeñas diferencias, resultan fundamentales para obtener buenos rendimientos en el producto final.

En el método A (Figura 2.13A), se utiliza una disolución de amina libre (isopropilamina), que se deja reaccionar con una suspensión del dímero en cloroformo durante 2 días, hasta obtener el complejo *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (**P1**). Para la síntesis de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(dma)(PPh<sub>3</sub>)] (**P2**) y *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ma)(PPh<sub>3</sub>)] (**P3**) se utilizó el método B (Figura 2.13B), en el que se hace reaccionar una suspensión del dímero en cloroformo con el hidrocloreuro de la amina correspondiente (dma o ma). Posteriormente, la adición lenta de NaOH en disolución acuosa, propicia la formación de la amina libre, para dar el complejo *trans* deseado.

Todos los complejos fueron caracterizados por espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, <sup>31</sup>P-RMN, <sup>195</sup>Pt-RMN, análisis elemental, ESI-MS y en el caso de **P1**, ha sido posible la obtención de monocristales por difracción de rayos-X.

Los valores de las constantes de acoplamiento Pt-P de los complejos sintetizados *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (3407,3 Hz), *trans*-[PtI<sub>2</sub>(dma)(PPh<sub>3</sub>)] (3262,2 Hz) y *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ma)(PPh<sub>3</sub>)] (3396,0 Hz), son comparables con los citados en la bibliografía, para algunos compuestos *trans* de este tipo, como por ejemplo, los complejos con ligandos cloro, de fórmula general *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)].<sup>34</sup>

La estructura del complejo **P1** fue confirmada por difracción de rayos X, observándose un entorno plano-cuadrado ligeramente distorsionado, alrededor del platino. Esta estructura es uno de los pocos ejemplos de complejos de Pt(II) con ligandos yoduro, fosfina y amina. Uno de los aspectos que destaca de esta estructura cristalina, es que la distancia del enlace Pt-N, 2,120 Å, es un poco más larga que el rango de distancias publicado en la bibliografía, para complejos con este mismo entorno químico (2,054 - 2,110 Å),<sup>34</sup> lo que se puede atribuir al efecto *trans*

de la fosfina. El enlace Pt-P en **P1**, también se muestra ligeramente más largo de lo normal (2,244 Å), aunque podría decirse que el valor se encuentra dentro del rango comúnmente observado en los trabajos reportados (entre 2,156 - 2,225 Å).<sup>35</sup> La distancia Pt-I muestra valores normalmente observados para este tipo de enlace.<sup>36</sup> La presencia de interacciones débiles entre las diferentes moléculas que conforman la red cristalina (sintones), nos da una idea de la estabilidad de este complejo en estado sólido y la alta direccionalidad que confieren este tipo de interacciones, en el crecimiento de la red cristalina. En la figura 2.15 se muestran las distancias de las interacciones débiles que forman los sintones y como es el empaquetamiento de la estructura del complejo *trans*-[Pt<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)].

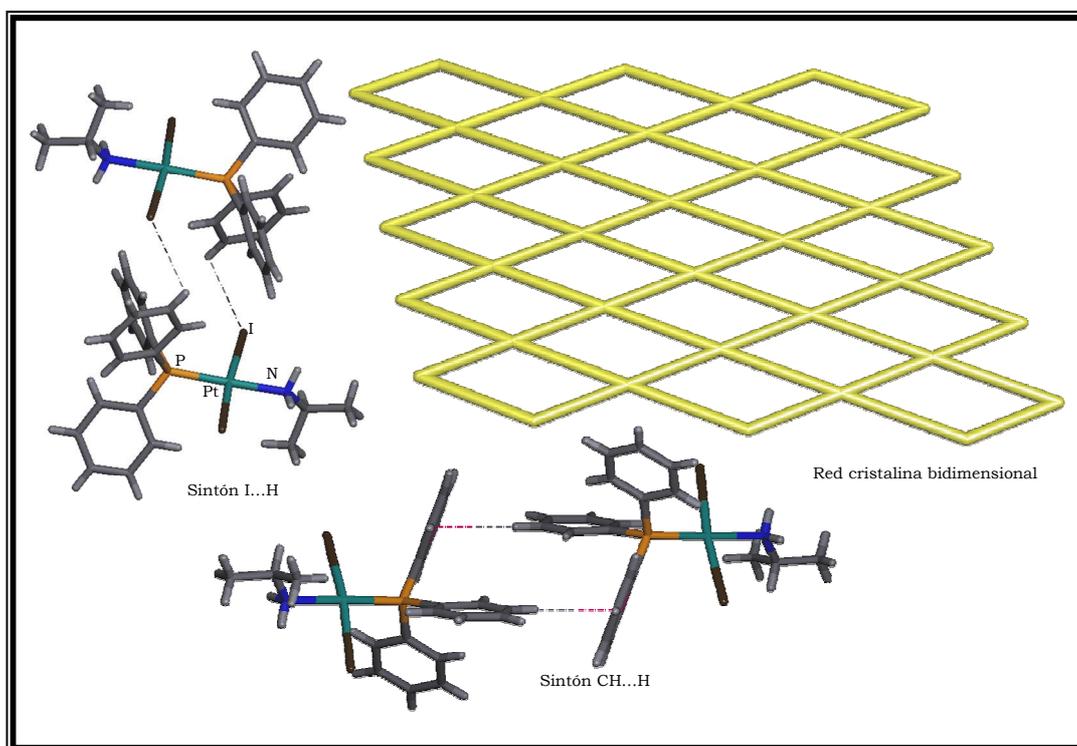


Figura 2.15. Sintones de la estructura cristalina del complejo **P1** y su red cristalina.

En definitiva podemos decir que estas reacciones son un claro ejemplo del efecto *trans*, que ejerce la fosfina sobre el complejo dimérico de puentes yoduro, lo que hace que el enlace Pt-I sea más largo y más lábil y favorece su ruptura permitiendo la entrada de la amina en posición *trans* a la trifenilfosfina.

Los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)], en contra de lo que se publicó previamente en la bibliografía,<sup>32</sup> mostraron ser estables en disolución, incluso en DMSO (requisito necesario para la realización de los experimentos biológicos). Esta estabilidad se monitorizó usando <sup>1</sup>H-RMN a diferentes tiempos. En la figura 2.16, se muestra el ejemplo para el complejo **P1**. Todos los compuestos mantienen su estructura en disolución, lo que nos ha permitido estudiar su potencial actividad antitumoral.

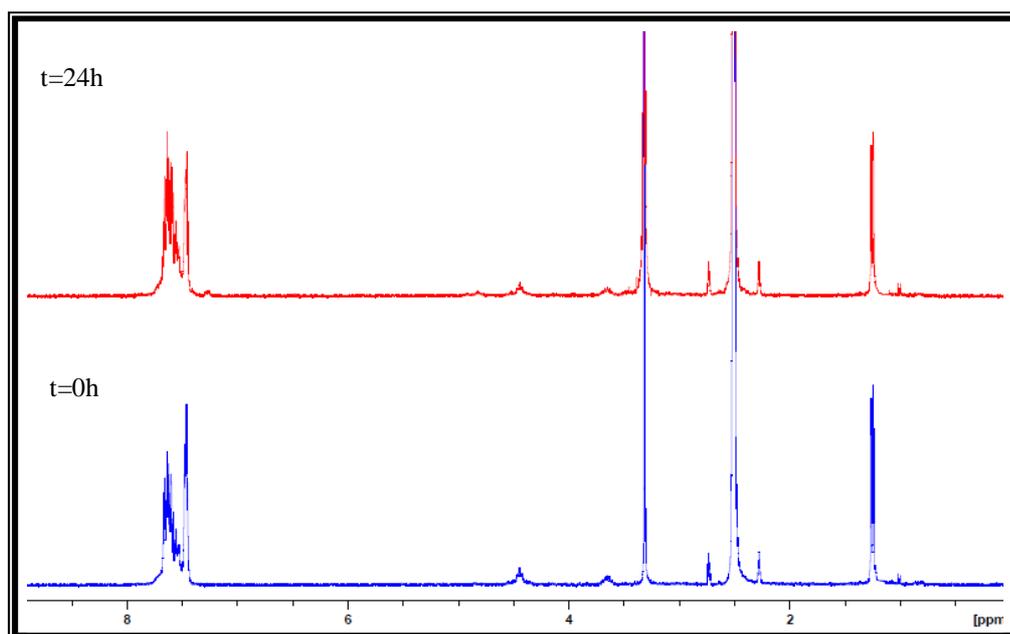


Figura 2.16. Monitorización de la estabilidad del complejo **P1** en DMSO por <sup>1</sup>H-RMN.

#### 2.2.2.2 Estudio de la actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]

La actividad citotóxica de los tres complejos **P1**, **P2** y **P3** se determinó empleando el ensayo estándar de tinción MTT en células de melanoma maligno humano (A375), adenocarcinoma de ovarios (SKOV-3), carcinoma epitelial de mama (T47D) y carcinoma de colon humano (HCT116+/+ (HCT116wt) y HCT166-/- (HCT116ko)). El cisplatino se incluyó como control positivo.

Los complejos con metilamina (**P3**) y dimetilamina (**P2**) no mostraron actividad citotóxica frente a ninguna de las células estudiadas, mostrando valores de IC<sub>50</sub> superiores a 100 μM. Sin embargo, el complejo *trans*-

[PtI<sub>2</sub>(isopropilamina)(PPh<sub>3</sub>)] (**P1**) mostró actividad en las células A375, HCT166-/- (resistentes al cisplatino) y en SKOV-3, donde el complejo resultó más activo incluso que el cisplatino (Figura 2.17).

Así, de la serie de complejos estudiados, el de isopropilamina (**P1**) mostró especial actividad frente a células resistentes al cisplatino. Este también fue el caso del complejo *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)(dma)] (**A2**) (sección 2.2.1.2 de esta tesis doctoral), que frente a esta misma línea celular,<sup>23</sup> mostró ser selectivamente activo, lo cual muestra que, una vez más los derivados con isopropilamina son excelentes candidatos como fármacos antitumorales. Y que además los complejos de isomería *trans*, deben implicar un mecanismo de acción diferente al del cisplatino, donde la presencia o ausencia de p53 no es un aspecto limitante en su actividad anticancerígena.

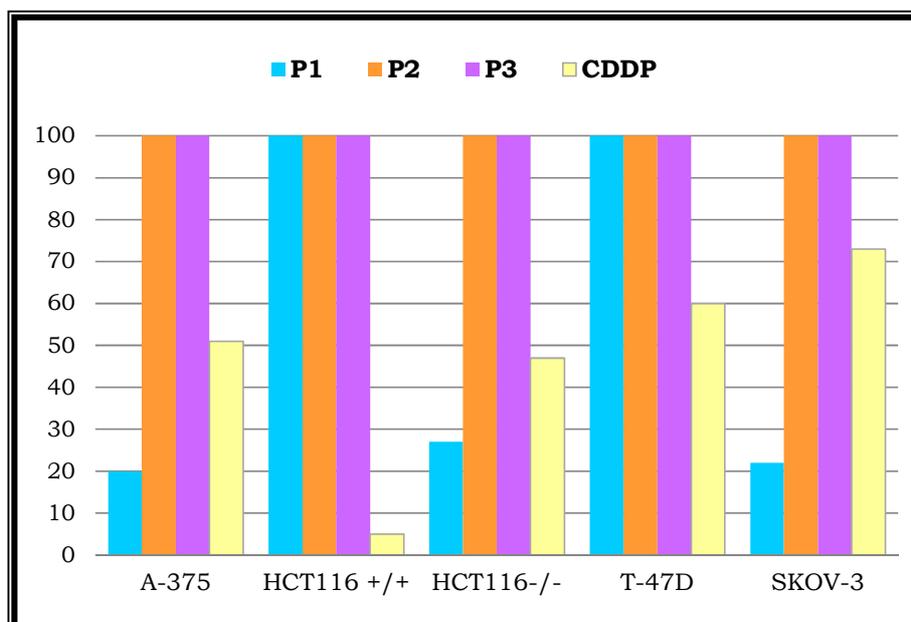


Figura 2.17. Actividad citotóxica en valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)].

Si se compara la actividad antitumoral del complejo *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (**P1**) con su análogo con ligandos cloruros, que fue sintetizado anteriormente,<sup>34,37</sup> el complejo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)], mostró una muy buena actividad citotóxica frente a células tumorales SKOV3 (carcinoma de ovario que muestra resistencia intrínseca a cisplatino), CH1 y CH1cisR (carcinoma de ovario sensible a cisplatino y la línea celular con resistencia a cisplatino) y SR2910 (sarcoma). Esto confirma la contribución positiva del ligando fosfina y que en este caso, la variación del grupo

saliente no contribuye marcadamente a mejorar la citotoxicidad, lo que puede deberse al comportamiento clásico, que ha mostrado el ligando yoduro, como grupo saliente en los complejos *trans* de platino.

### 2.2.2.3 Estudio del ciclo celular de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]

Tras evaluar la actividad citotóxica de los complejos **P1**, **P2** y **P3**, se estudió la distribución de los compuestos en el ciclo celular de las células ensayadas y se comparó con la distribución del cisplatino y con células sin tratamiento (Tabla 2.A).

Tabla 2.A. Resultados del estudio del ciclo celular con los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] y CDDP.

Fase	Sin tratamiento	P1	P2	P3	CDDP
A-375					
Sub-G1	0,0	0,0	0,0	0,0	10,4
G0/G1	62,0	65	73,9	71,5	49,0
S	17,4	17,1	10,4	14,6	23,1
G2/M	20,6	17,5	15,7	13,9	17,6
HCT116+/-					
G0/G1	51,6	45,0	45,8	39,3	15,5
S	22,8	26,0	24,6	18,8	14,7
G2/M	25,4	29,1	29,6	41,9	69,7
HCT116-/-					
G0/G1	33,3	35,1	32,6	38,2	6,2
S	28,2	31,1	26,5	22,7	11,3
G2/M	38,3	33,9	41,0	38,2	82,8
T-47D					
G0/G1	57,8	38,2	60,8	69,0	13,8
S	19,5	22,7	16,8	15,4	19,0
G2/M	22,6	38,2	22,4	15,6	62,7
SKOV-3					
G0/G1	27,7	23,5	23,6	26,9	31,2
S	8,7	6,8	9,3	5,9	4,9
G2/M	62,8	69,0	67,1	67,2	63,9

En las células A375, el complejo **P1** mostró mejor actividad que el cisplatino y su distribución en el ciclo celular, indica una marcada tendencia a la acumulación en las etapas G0/G1. Aunque los complejos **P2** y **P3** muestran esa misma tendencia, lo hacen en mucha mayor proporción, lo que indica que debe existir un equilibrio en la distribución en esta etapa, para que el complejo muestre actividad antitumoral (como en **P1** y cisplatino).

En las células HCT116+/+ (con niveles normales de p53) el cisplatino presentó la acumulación esperada en G2/M (>60%),<sup>38</sup> mientras que los complejos diyoduros **P1**, **P2** muestran una distribución en torno al 20% y **P3** un valor cerca de 40%. A pesar de la diferente distribución mostrada por nuestros complejos en los ensayos de citotoxicidad, **P1**, **P2** y **P3** no mostraron diferencia en la actividad en esta línea celular, siendo todos poco activos. Sin embargo, en las células de HCT116-/- (con ausencia de p53 y resistente a CDDP) se observa un aumento de acumulación para el cisplatino en G2/M, mientras que los complejos **P1**, **P2** y **P3** muestran una distribución, más o menos homogénea en todas las fases del ciclo celular, pero ninguna comparable con la observada para cisplatino. Aunque en esta línea celular sólo sea activo el complejo *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] **P1**, es difícil establecer una relación incuestionable entre la distribución del fármaco en el ciclo celular y la actividad citotóxica, pero nos parece importante señalar que nuevamente el derivado con isopropilamina muestra actividad antitumoral donde el cisplatino no es activo, lo que no parece ser una simple casualidad.

Aunque en las células T-47D no hay una tendencia definida, en la distribución de los diferentes complejos, y no podemos establecer relación alguna con la distribución mostrada por cisplatino, en la línea celular SKOV-3, la distribución del ciclo celular fue similar para todos complejos y también para cisplatino. Este mismo comportamiento fue observado en el estudio del ciclo celular de los complejos *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] (mencionados en el capítulo 1).<sup>37</sup>

### 2.2.2.4 Estudio de la interacción de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] con el plásmido pBR322 y con modelos biológicos (9-EtG)

El estudio de la interacción de los complejos **P1**, **P2** y **P3** con plásmido superenrollado pBR322, se realizó en un rango de concentraciones de complejo desde 1,2 a 24 μM, lo que implica relaciones de  $r_i$  desde 0,01 a 0,2 (donde  $r_i = [\text{complejo}]/(\text{número de pares de bases-ADN})$ ). En las mismas condiciones se estudió también la interacción del cisplatino con el plásmido pBR322, para utilizarse como modelo de interacción. Con esta técnica evaluamos la interacción de los complejos de platino con el plásmido superenrollado, analizando cómo se afecta la movilidad de las diferentes formas del plásmido, cuando se produce la platinación del mismo.

Los resultados del gel de electroforesis (Figura 2.18) muestran que el complejo **P1**, produce un efecto más marcado en la movilidad de la forma covalente circular cerrada (CCC), que a  $r_i = 0,2$  llega a confluir con la forma circular abierta (OC), mientras que en los complejos **P2** y **P3** a ese mismo valor de  $r_i$  no muestran un efecto tan pronunciado.

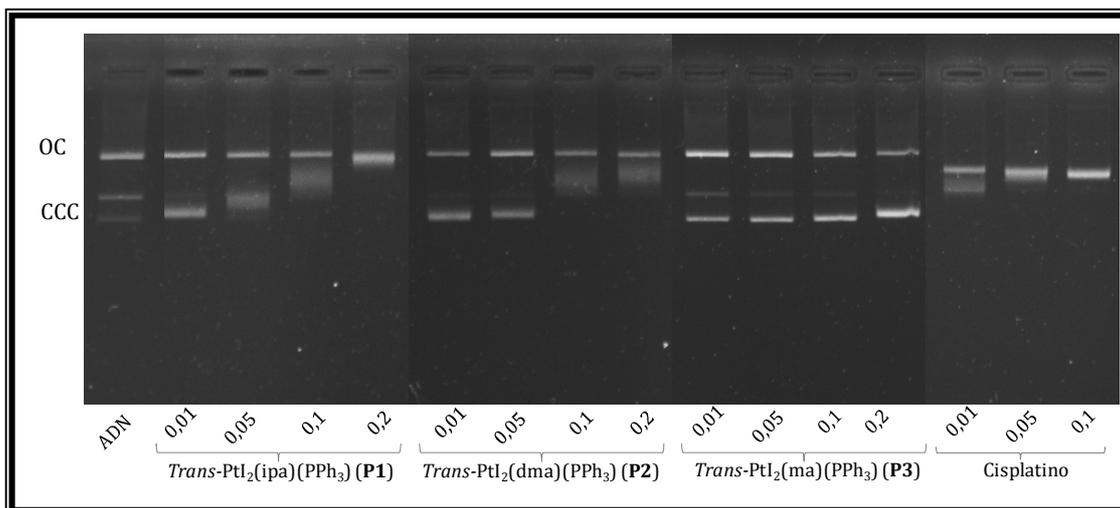


Figura 2.18. Gel de electroforesis de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] y CDDP con el plásmido pBR322.

La movilidad del plásmido en presencia de cisplatino, como era de esperar,<sup>30</sup> afecta tanto a la forma circular abierta (aumentando su movilidad) como a la covalente circular cerrada (disminuyendo su

movilidad). Comparando el efecto del cisplatino con el efecto que produce el complejo **P1**, es evidente que son interacciones diferentes, ya que en caso del complejo **P1**, solamente se modifica la forma CCC, que a  $r_i=0,2$  migra hasta alcanzar la forma OC. Por su parte el complejo **P2**, requiere concentraciones más altas para producir el mismo efecto que **P1** y el complejo **P3** no presenta señales de interacción en el rango estudiado.

El estudio de la interacción del complejo **P1** con 9-EtG (9-etil-guanina) (relación 1:2), se llevó a cabo por monitorización de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN a diferentes tiempos de reacción. Evaluando, como en el caso de la 5'-GMP, en particular la señal de H8 (que es la que más se ve afectada por la coordinación a platino). La baja solubilidad de los complejos, ha dificultado mucho este estudio por lo que, como se observa en la figura 2.19, los espectros tienen poca resolución.

A pesar de ello, los espectros de <sup>1</sup>H-RMN muestran, además del H8 de la 9-EtG libre a 7,76 ppm, la aparición de nuevas señales que aumentan su intensidad con el tiempo y que se pueden deber a la formación de aductos y a diversos productos de especiación. El desplazamiento de la señal ancha alrededor de 8,00 ppm es típica de la formación de un aducto, donde el platino se coordina al **N7** de la guanina.<sup>39</sup> Transcurridas 5 h, las señales crecen en intensidad y además aparece una nueva señal a 6,3 ppm, posiblemente debida a una especie que por el contrario muestra un H8 muy apantallado. Este efecto de apantallamiento ha sido estudiado y observado con anterioridad en complejos Pt-ADN que se encuentran muy impedidos y apantallados por grupos muy voluminosos.<sup>40</sup>

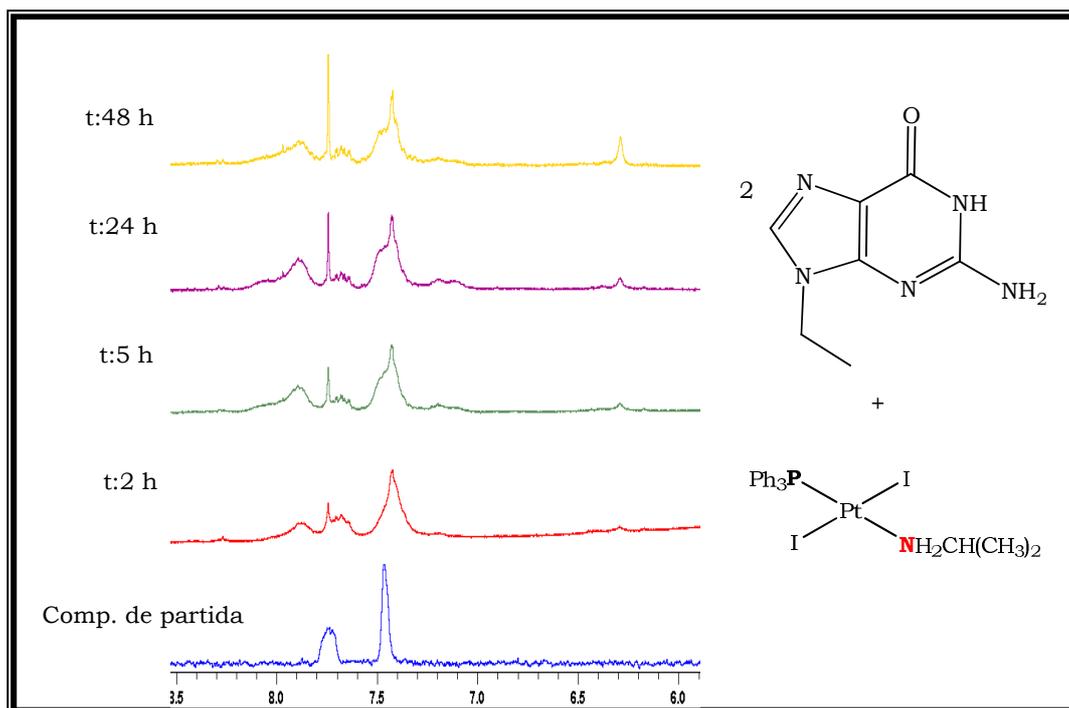


Figura 2.19. Monitorización por  $^1\text{H}$ -RMN de la reacción del complejo **P1** con 9-EtG a diferentes tiempos de reacción.

Finalmente cabe destacar, que no se observa la aparición de isopropilamina libre, que indique descomposición del complejo o que indique la pérdida de ligandos que no sean yoduro. Así, la reacción con 5'-GMP del compuesto **P1**, el único activo de la serie, no da lugar a un aducto mayoritario, que podamos asignar inequívocamente, sino a una especiación donde parece que coexisten dos especies muy diferentes.

Este trabajo ha dado lugar a una publicación en la revista Dalton Transaction (2015) y ha sido reseñado en el editorial del Prof. Michael Hannon, dedicado a “Metal interactions with nucleic acids”.

## 2.3 Parte experimental

### 2.3.1 Disolventes, reactivos y equipos empleados

Para la síntesis de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(L)], se utilizaron los reactivos de la tabla 2.B. La mayoría de los disolventes empleados se usaron sin ningún tratamiento previo, a menos que se indique lo contrario.

Tabla 2.B. Reactivos y casas comerciales.

Reactivo	Casa comercial	Reactivo	Casa comercial
Tetracloro platinato	Johnson Matthey	5'GMP	Sigma
Isopropilamina	Sigma	Hidrocloreuro de dimetilamina	Aldrich
Dimetilamina	Aldrich	Hidrocloreuro de metilamina	Aldrich
Metilamina	Aldrich	Hidróxido de sodio	Sigma Aldrich
Trifenilfosfina	Aldrich	9-etil-guanina	Sigma Aldrich
Yodo	Panreac	Yoruro potásico	Panreac

### Equipos empleados

- **Análisis químico**

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

- **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 (<sup>1</sup>H 300.13 MHz, <sup>13</sup>C 75.47 MHz, <sup>195</sup>Pt 64.53 MHz) y DRX 500 con sondas BBI y QNP de 5 mm (<sup>1</sup>H 500.13 MHz, <sup>13</sup>C 125.76 MHz).

Los valores de los desplazamientos químicos se dan en unidades  $\delta$  (ppm), y los valores de las constantes de acoplamiento en Hz. Las referencias

utilizadas en los espectros fueron tetrametilsilano ( $\text{Me}_4\text{Si}$ ) como referencia interna, y las señales residuales del disolvente deuterado  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  o  $\text{DMSO-d}_6$ , acetona- $\text{d}_6$ . Para los espectros RMN 1D  $^{195}\text{Pt}$  se utilizó la sal  $\text{Na}_2\text{PtCl}_6$  como referencia externa.

- **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 escans 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.<sup>41</sup> La estructura fue resuelta por los métodos estándar de Patterson<sup>42</sup> y refinada por ajuste de mínimos cuadrados basados en F2 y utilizando los siguientes programas: SHELXTL-PLUS, SHELXL-97 y WinGX.<sup>43</sup> 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.

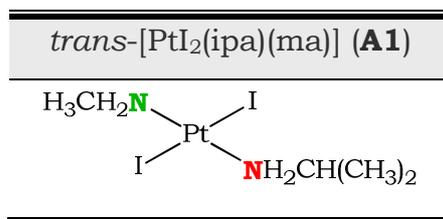
Los datos cristalográficos fueron procesados usando Mercury 3.0 (CCDC)<sup>44</sup> y las interacciones a nivel supramolecular se analizaron usando el programa ToposPro.<sup>45</sup>

### 2.3.2 Complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')]

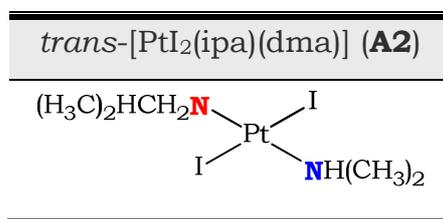
#### 2.3.2.1 Síntesis de complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')]

La preparación de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')] se realizó siguiendo el método publicado por nuestro grupo de investigación.<sup>8,20</sup>

A una suspensión de *cis*-[PtI<sub>2</sub>(amina)<sub>2</sub>] (0,500 g) en agua, se le añadieron 20 equivalentes de amina', se puso a reflujo, con agitación de 3 a 6 horas (dependiendo de la amina' empleada). Cuando se observó una disolución transparente e incolora, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró sobre celita. El filtrado se concentró muy lentamente, hasta observar la aparición de un sólido amarillo-anaranjado, que se filtró, se lavó con H<sub>2</sub>O templada y se secó a vacío.

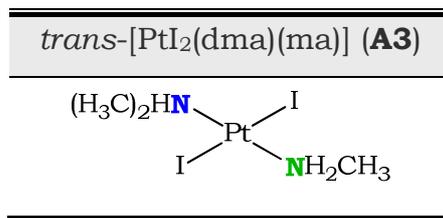


Sólido amarillo, (55%).  **$\delta$ H** (300,13 MHz; Acetona-d<sub>6</sub>) 1,25 (d, 6H, CH<sub>3</sub>(ipa),  $J=6,5$  Hz) 2,46 (t, 3H, CH<sub>3</sub>(ma),  $J=6,3$  Hz) 3,36 (sept, 1H, CH(ipa),  $J=6,1$ Hz) 3,76 (s.a. 4H, 2NH<sub>2</sub>).  **$\delta$ C** (75,47 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 24,44 (2CH<sub>3</sub>(ipa)), 34,58 (CH<sub>3</sub>(ma)) 51,46 (CH(ipa))  **$\delta$ Pt** (64,53 MHz; acetona-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -3338,27 **Análisis elemental CHN**, encontrado: C: 8,7%; H: 2,52%; N: 5,24%. Calculado para C<sub>4</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>I<sub>2</sub>Pt: C: 8,91%; H: 2,62%; N: 5,20%.



Sólido amarillo-naranja, (61%).  **$\delta$ H** (300,13 MHz; Acetona-d<sub>6</sub>) 1,29 (d, 6H, CH<sub>3</sub>(ipa),  $J=6,5$  Hz) 2,64 (d, 6H, CH<sub>3</sub>(dma),  $J=5,8$  Hz) 3,46 (sept, 1H, CH(ipa),  $J=6,0$  Hz) 3,78 (s.a. 3H, NH<sub>2</sub>(ipa) y NH(dma)).  **$\delta$ C** (75,47 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 24,46 (2CH<sub>3</sub>(ipa)), 46,18 (CH<sub>3</sub>(dma)) 51,48 (CH(ipa))  **$\delta$ Pt** (64,53 MHz; acetona-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -3195,0 **Análisis elemental CHN**, encontrado: C: 10,40%; H:

2,62%; N: 4,72%. Calculado para C<sub>5</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>I<sub>2</sub>Pt: C: 10,86%; H: 2,92%; N: 5,06%.



Sólido amarillo (42%).  **$\delta$ H** (300,13 MHz; Acetona-d<sub>6</sub>) 2,45 (t, 3H, CH<sub>3</sub>(ma),  $J=6,0$  Hz) 2,67 (d, 6H, CH<sub>3</sub>(dma),  $J=6,3$  Hz) 3,98 (s.a, 2H, NH<sub>2</sub>(ma)) 4,39 (s.a, 1H, NH(dma)).  **$\delta$ C** (75,47 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 34,42 (CH<sub>3</sub>(ma)), 45,59 (CH<sub>3</sub>(dma)).  **$\delta$ Pt** (64,53 MHz; acetona-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -3210,07 **Análisis elemental CHN**, encontrado: C: 6,56%; H: 2,32%; N: 5,25%. Calculado para C<sub>3</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>I<sub>2</sub>Pt: C: 6,86%; H: 2,30%; N: 5,33%.

### 2.3.2.2. Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')]

El protocolo utilizado en los ensayos de citotoxicidad, es una adaptación del protocolo por cristal violeta usado en el NCI (National Cancer Institute), cuantificándose colorimétricamente la presencia de células viables. Y se realizó en la universidad de Sevilla por el grupo de Dr. Amancio Carnero.

Las células se dejaron crecer y adaptar al medio en una placa, después se recogieron justo antes de hacerse confluyentes. Se contaron usando un hemocitómetro y se diluyeron con medio de cultivo, para ajustar la concentración celular al número requerido de células por cada 200  $\mu$ L. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, donde se ensayaron los compuestos, a una densidad entre 10<sup>3</sup> y 4·10<sup>3</sup> células/pocillo. Las células se dejaron crecer durante 24 horas, en una incubadora a 37 °C con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

Los compuestos se disolvieron en DMSO, a una concentración de 10 mM o 5 mM. De esta disolución se preparó una placa madre, con disoluciones en serie de hasta 200 veces la concentración final en el cultivo. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo celular, no

excede del 0,5%, para impedir que sea tóxico para las células. Un volumen adecuado de la disolución del compuesto (generalmente 1-2 µL) se añadió automáticamente al medio, hasta alcanzar la concentración final deseada para cada fármaco. Cada concentración se hizo por triplicado.

Se dejaron una serie de pocillos control en cada placa, conteniendo la misma concentración de DMSO o PBS pero sin fármaco. Una segunda serie de pocillos control, se dejó con células no tratadas justo antes de la adición del fármaco.

Tras una exposición a la droga, durante el tiempo deseado, dependiendo del experimento, las células se lavaron dos veces con un tampón salino fosfato, antes de ser fijadas con un 10% de glutaraldehído. Las células fijadas, se lavaron dos veces más y se tiñeron con cristal violeta 0,5% durante 30 minutos. Después, se lavaron las placas y se midió la absorbancia a 595 nm en un aparato Biorad Model 550 Microplate Reader. Los datos obtenidos de absorbancia se analizaron, mediante el programa GraphPad Prism 4,00 para obtener el valor de IC<sub>50</sub>.

### **2.3.2.3 Estudio de la interacción de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')] con el plásmido pBR322 y biomoléculas**

#### **Electroforesis en gel de agarosa**

Se prepararon disoluciones stock de los complejos, de concentración 5 mM en DMSO y luego diluciones en agua a 5 µM, 50 µM y 500 µM.

El plásmido utilizado es pBR322 DNA que viene en disolución de 10 MM de Tris·HCl y 1 mM de EDTA (pH=7,6), de la casa comercial Thermo Scientific. Se determinó el volumen necesario de cada una de las diluciones, para tener las diferentes relaciones de  $r_1$  (donde  $r_1 = \frac{[\text{complejo}]}{(\text{número de pares de bases-ADN})}$ ), con un número de bases de 120 pb. Todas las mezclas contienen: complejo, plásmido, buffer y agua en un volumen total de 20 µl.

Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se añadieron 2 µl del colorante de carga, que contiene 50% de glicerol, 0,25%

azul de bromofenol y 0,25% cianol xileno. El total de la muestra (20  $\mu$ l) se cargó en los pocillos de un gel de agarosa al 0,8%. La electroforesis se llevó a cabo durante un período de 2,5 h a 70 V aproximadamente.

Después de la electroforesis, el gel se sumergió en 800 ml de agua Millipore, que contiene 64  $\mu$ l de una solución madre de 10 mg/ml de bromuro de etidio, durante 30 minutos para teñir el ADN.

Finalmente, se tomó la fotografía en un equipo UVITEC Cambridge y se realizó la adquisición de la imagen con tratamiento por UVIDOC HD2.

### **Interacción de los complejos con 5'-GMP**

Se prepararon disoluciones con 1,98 mg de complejo, en acetona- $d_6$ . A continuación, se añadió una disolución de 5'-GMP (2.64 mM) en  $D_2O$ , hasta alcanzar una proporción 4:1 (complejo: 5'-GMP). Luego se mezclaron las disoluciones de manera que, al final cada mezcla de reacción tuviese una relación 1: 2 ( $D_2O$ : Acetona- $d_6$ ). Se mantuvieron en agitación, a 37 °C y en oscuridad. Todas las disoluciones se monitorizaron por  $^1H$ -RMN a 0, 1, 3, 9 y 17 h.

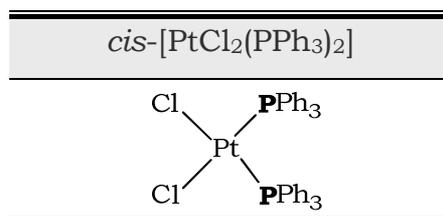
### **2.3.3 Complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]**

#### **2.3.3.1 Síntesis de complejos de partida**

##### **Síntesis de *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]**

La síntesis de este complejo está basada en el método original de Jensen<sup>46</sup>, y se ha llevado a cabo con algunas modificaciones. Una disolución de PPh<sub>3</sub> (1,263 g, 4,82 mmol) en etanol (2,5 ml), se añadió sobre una disolución de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (1,0 g, 2,4 mmol) en agua (2,5 ml) y se mantuvo con agitación durante 24 h, en oscuridad y a temperatura ambiente. El producto, un precipitado ligeramente amarillo, se lavó con agua, etanol y éter etílico. El sólido seco se trató con CHCl<sub>3</sub>, obteniéndose un sólido blanco (isómero *cis*) y una disolución amarilla (isómero *trans*). La disolución amarilla se dejó con agitación durante un par de días y en presencia de luz visible, observándose la formación de más precipitado

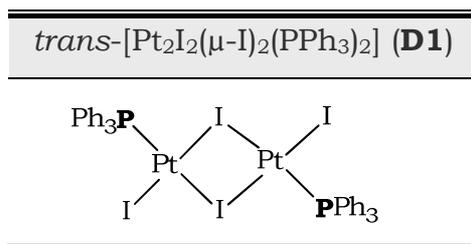
blanco. Esta isomerización del complejo amarillo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] al isómero *cis* de color blanco se cataliza con luz visible<sup>47</sup>.



Sólido blanco, (97%).  **$\delta\text{H}$**  300,13 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) 7,47 (m, 12H, CH<sub>orto</sub>), 7,29 (m, 12H, CH<sub>meta</sub>), 7,32 (m, 6H, CH<sub>para</sub>).  **$\delta\text{C}$**  (75,47 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) 114,00 (C<sub>orto</sub>), 120,67 (C<sub>meta</sub>) 116,98 (C<sub>para</sub>).  **$\delta\text{P}$**  (121,5 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) 14,79 ( $J_{\text{P-Pt}} = 3671,9$  Hz).  **$\delta\text{Pt}$**  (64,53 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -4721 (d,  $J_{\text{Pt-P}} = 3695,1$  Hz). **Análisis elemental CHN**, encontrado: C: 54,10%; H: 3,63%. Calculado para C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>P<sub>2</sub>Pt: C: 54,69%, H: 3,82%.

### Síntesis del *trans*-[Pt<sub>2</sub>I<sub>2</sub>( $\mu$ -I)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

Sobre una disolución de complejo *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (500 mg, 0,63 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a reflujo, se agregó I<sub>2</sub> (208,1 mg, 0,82 mmol) disuelto en 6 ml del mismo disolvente, en porciones de 1,5 ml cada 2 días, hasta obtener una disolución ámbar con un precipitado de color rojo. A continuación se filtró, se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> frío y se secó a vacío.



Sólido rojo, (63%).  **$\delta\text{H}$**  (300,13 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) 7,67 (m, 6H, H<sub>orto</sub>); 7,52 (m, 9H, H<sub>meta-para</sub>).  **$\delta\text{C}$**  (75,47 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) 134,7(C<sub>orto</sub>), 128,6(C<sub>meta</sub>), 131,6(C<sub>para</sub>).  **$\delta\text{P}$**  (121,5 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) 18,4 ( $J_{\text{P-Pt}}=3561,24$  Hz).  **$\delta\text{Pt}$**  (64,53 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -4775,34 ( $J_{\text{Pt-P}}=3566,20$  Hz). **MS (ESI)**: 1444,72 uma [M+Na]<sup>+</sup>. **Análisis elemental CHN**, encontrado: C: 29,61%, H: 2,18%. Calculado para C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>I<sub>4</sub>P<sub>2</sub>Pt<sub>2</sub>·0,7CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C: 29,75%, H: 2,14%.

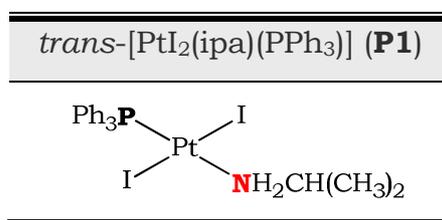
### 2.3.3.2 Síntesis de complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]

#### Método A

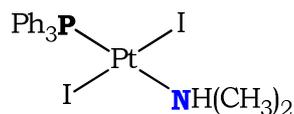
A una suspensión de *trans*-[Pt<sub>2</sub>I<sub>2</sub>(μ-I)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (80 mg, 0,056 mmol) en cloroformo, se añadieron lentamente 2 equivalentes isopropilamina en disolución acuosa. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 días, obteniéndose una disolución naranja. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y se extrajo el producto deseado con éter dietílico, se filtró y finalmente, se dejó evaporar el éter a temperatura ambiente.

#### Método B

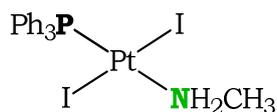
A una suspensión de *trans*-[Pt<sub>2</sub>I<sub>2</sub>(μ-I)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (80 mg, 0,056 mmol) en cloroformo, se añadieron 2 equivalentes de hidrocloreuro de la amina correspondiente (dimetilamina o metilamina) y luego se adicionaron lentamente 2 equivalentes de NaOH. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 días. A partir de aquí la reacción continuó siguiendo los mismos pasos del método A.



Sólido naranja claro, (71%).  **$\delta$ H** (300,13 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 7,73 (m, 6H, H<sub>orto</sub>), 7,71 (m, 9H, H<sub>meta-para</sub>), 3,84 (sp, 1H, CH<sub>(ipa)</sub>), 3,51 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 1,38 (d, 6H, CH<sub>3(ipa)</sub>).  **$\delta$ C** (75,47 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 135,1(C<sub>orto</sub>), 132,8(C<sub>ipso</sub>) 130,6(C<sub>para</sub>), 127,5(C<sub>meta</sub>), 40,04 (CH<sub>(ipa)</sub>), 25,4(CH<sub>3(ipa)</sub>).  **$\delta$ P** (121,5MHz; CDCl<sub>3</sub>) 0,78 ( $J_{\text{P-Pt}}=3407,28$  Hz).  **$\delta$ Pt** (64,53MHz; CDCl<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -5004,90 ( $J_{\text{Pt-P}}=3407,28$  Hz). **MS (Mald)**: 771 uma [M-H]<sup>+</sup>. **Análisis elemental CHN**, encontrado: C: 36,99%, H: 3,52%, N: 1,85%. Calculado para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>I<sub>2</sub>NPt·1.3C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O: C: 36,31%, H: 4,03%, N: 1,62%.

*trans*-[PtI<sub>2</sub>(dma)(PPh<sub>3</sub>)] (**P2**)

Sólido naranja, (80%).  **$\delta$ H** (300,13 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 7,72 (m, 6H, H<sub>orto</sub>), 7,42 (m, 9H, H<sub>meta-para</sub>), 4,68 (sa, 1H, NH<sub>(dma)</sub>), 2,80 (sept, 6H, CH<sub>3</sub>(dma)).  **$\delta$ C** (75,47 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 135,1 (C<sub>orto</sub>), 127,5 (C<sub>meta</sub>), 130,5 (C<sub>para</sub>), 42,2 (CH<sub>3</sub>(dma)).  **$\delta$ P** (121,5 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) -1,17 ( $J_{P-Pt}$ =3262,22 Hz).  **$\delta$ Pt** (64,53 MHz; acetona-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -4933,56 ( $J_{Pt-P}$ =3262,37 Hz). **MS (ESI)**: 755,9 uma [M]<sup>+</sup>. **Análisis elemental CHN**, encontrado: C: 34,53%, H: 3,34%, N: 1,63%. Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>Ni<sub>2</sub>Ppt·(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO: C: 33,92%, H: 3,47%, N: 1,72%.

*trans*-[PtI<sub>2</sub>(ma)(PPh<sub>3</sub>)] (**P3**)

Sólido naranja, (60%).  **$\delta$ H** (300,13 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 7,71 (m, 6H, H<sub>orto</sub>), 7,40 (m, 9H, H<sub>meta-para</sub>), 2,72 (d, 3H, CH<sub>3</sub>(ma),  $J_{H-H}$ =7 Hz).  **$\delta$ C** (75,47 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 135,1 (C<sub>orto</sub>), 127,7 (C<sub>meta</sub>), 130,1 (C<sub>para</sub>), 31,2 (CH<sub>3</sub>(ma)).  **$\delta$ P** (121,5 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 0,88 ( $J_{P-Pt}$ =3391,74 Hz).  **$\delta$ Pt** (64,53 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -5045,48 ( $J_{Pt-P}$ =3396,0 Hz). **MS (ESI)**: 741 uma [M-H]<sup>+</sup>. **Análisis elemental CHN**, encontrado: C: 30,97%, H: 2,72%, N: 1,62%. Calculado para C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>Ni<sub>2</sub>Ppt·0.6CHCl<sub>3</sub>·0.6(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)O: C: 30,64% , H: 3,11%, N: 1,62%.

### 2.3.3.3 Estructuras de rayos X

#### Datos cristalográficos del complejo *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (P1)

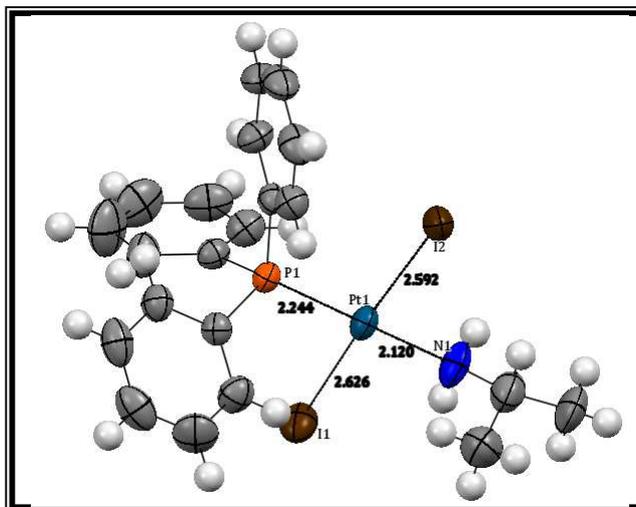


Figura 2.20. Estructura cristalina del complejo **P1**.

Tabla 2.C. Longitudes y ángulos de enlace seleccionados para **P1**.

Longitudes de enlace seleccionadas (Å)			
Pt1-I1	2,6255(5)	Pt1-N1	2,120(4)
Pt1-I2	2,5920(5)	Pt1-P1	2,244(1)
Ángulos de enlace seleccionados (°)			
I1-Pt1-I2	172,33(2)	I2-Pt1-P1	93,99(3)
I1-Pt1-P1	91,51(3)	I2-Pt1-N1	86,5(2)
I1-Pt1-N1	87,8(2)	N1-Pt1-P1	177,4(1)

Tabla 2.D. Datos cristalográficos del complejo **P1**.

Fórmula química	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> I <sub>2</sub> NPt	
Peso molecular	770,27	
Temperatura	296 (2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Tamaño del cristal	0.10 x 0.19 x 0.22 mm	
Apariencia del cristal	Prismática de color naranja claro	
Sistema cristalino	Triclinico	
Grupo espacial	<i>p</i> -1	
Dimensiones de la celda unidad	<i>a</i> = 9,5189(7) Å <i>b</i> = 10,9327(10) Å <i>c</i> = 11,5197(10) Å	$\alpha$ = 84,048(4)° $\beta$ = 81,976(4)° $\gamma$ = 86,335(4)°
Volumen	1179,20(17) Å <sup>3</sup>	
<i>Z</i>	2	
Densidad calculada	2,169 mg/cm <sup>3</sup>	
Coefficiente de absorción	8,641 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	712	

#### **2.3.3.4 Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]**

Para la evaluación de la citotoxicidad se utilizaron las siguientes líneas celulares: A375 (melanoma maligno humano), SKOV-3 (adenocarcinoma de ovarios), T47D (carcinoma epitelial de mama), HCT116+/+ y HCT116-/- carcinoma de colon humano, normal para p53 y con ausencia de p53, respectivamente. Las células se mantuvieron en monocapas con aire humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C en DMEM- $\alpha$ , con excepción de las células HCT116-/- y T47D, que se mantuvieron en medio RPMI. Todos los medios contenían suero bovino fetal al 10% y estreptomomicina 1x/ampicilina.

Para determinar la citotoxicidad, se empleó una placa de 96 pocillos con una densidad de 4000 células por pocillo. Las células se dejaron fijar y recuperar durante 48 horas y a continuación, se trataron por triplicado con 200  $\mu$ l de diferentes concentraciones de complejo, diluidas en medio de cultivo. Los compuestos **P1**, **P2** y **P3** fueron disueltos en DMSO a 10 mM (disolución stock recién preparada); mientras que el cisplatino fue preparado a 5 mM en PBS. Los compuestos se mantuvieron en las células durante 2 horas, después de lo cual, se eliminó el medio que contiene el fármaco y se reemplazó con medio de cultivo fresco. Después de otras 24 horas, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 10% durante 15 minutos.

Las células se lavaron de nuevo dos veces con PBS y después se tiñeron con 0,25% violeta a 37 °C durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS y el colorante restante se solubilizó utilizando 0,200 ml de ácido acético al 33%. La absorbancia del color púrpura se cuantifica a 595 nm utilizando un lector de absorbancia de placas Tecan Amanecer.

#### **2.3.3.5 Estudio del ciclo celular de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]**

Para llevar a cabo el análisis del ciclo celular, todas las líneas celulares se sembraron, con una densidad de 75.000 células por pocillo, en una placa de 12 pocillos. Las células se dejaron fijar y recuperar durante

24 h, y a continuación, se trataron con 1,0 ml de 50 o 10  $\mu\text{M}$  de complejo diluido en medio de cultivo. Los compuestos **P1**, **P2** y **P3** se diluyeron, a partir de una disolución stock 100 mM recién preparada en DMSO, mientras que el cisplatino se administró a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , preparada a partir de una disolución 5 mM en PBS.

Cada uno de los compuestos, se mantuvo en las células durante 48 h, después de lo cual el medio de cultivo que contiene el fármaco se aspiró y se reemplazó con medio fresco. Después del tratamiento, las células se lavaron y se separaron de la placa, se suspendieron en 1 ml de medio de cultivo nuevo y se transfirieron a un tubo de cultivo. Éstas se sedimentaron a 450 xg durante 5 minutos en una centrífuga de cubo y se lavaron dos veces con 1 ml de PBS.

Después, las células lavadas se resuspendieron en 0,25 ml de PBS y luego se añadió lentamente con agitación 2,25 ml de etanol frío al 70%. Esta suspensión se mantuvo a -20 °C hasta la clasificación de las células.

Antes del análisis del ciclo celular, las células fueron sedimentadas a 450 xg durante 5 minutos, se lavaron con 1 ml de PBS y se sedimentaron de nuevo. Para sedimentar las células se utilizaron 0,2 ml de reactivo Guava Cell Cycle (Millipore), y las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se analizó la distribución del ciclo celular, usando un citómetro de flujo Guava Easy Cyte Flow Cytometer y el software Guava CytoSoft Analysis.

### **2.3.3.6 Estudio de la interacción de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] con el plásmido pBR322 y biomoléculas**

#### **Electroforesis en gel de agarosa**

El procedimiento empleado para el estudio de la interacción de los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] con el plásmido pBR322 fue el mismo que el utilizado para los complejos *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')], con las variaciones necesarias en los valores de las relaciones de  $r_i$  (donde  $r_i = [\text{complejo}] / (\text{número de pares de bases-ADN})$ ).

**Interacción del complejo P1 con 9-Etil-Guanina**

Se disolvió el complejo (0,0025 mmol) en acetona-d<sub>6</sub> y luego se agregó la 9-etilguanina (0,0052 mmol) disuelta en una mezcla acetona-agua, de manera que la relación de disolventes fuera de 2:1. La reacción se mantuvo a 37 °C, con agitación durante todo el seguimiento. Se realizaron espectros de <sup>1</sup>H-RMN con supresión de agua a 2, 5, 24 y 48 h.

## **2.4 Bibliografía**

- <sup>1</sup> M. J. Cleare, J. D. Hoeschele, *Bioinorg. Chem.*, **1973**, 2, 187.
- <sup>2</sup> E.-C. Koch, *Propell. Explos. Pyrot.*, **2005**, 30, 5.
- <sup>3</sup> J. Whittaker, W. D. McFadyen, G. Wickham, L. P. G. Wakelin, V. Murray, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 3933.
- <sup>4</sup> A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko, B. K. Keppler, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 2224.
- <sup>5</sup> N. A. Kratochwil, J. A. Parkinson, C. Sacht, P. d. S. Murdoch, T. Brown, P. J. Sadler, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2001**, 2743.
- <sup>6</sup> A. Hegmans, M. Sabat, I. Baxter, E. Freisinger, B. Lippert, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 4921.
- <sup>7</sup> S. Grabner, M. Cemazar, N. Bukovec, G. Sersa, *Acta Chim. Slov.*, **2006**, 53, 153.
- <sup>8</sup> L. Messori, A. Casini, C. Gabbiani, E. Michelucci, L. Cubo, C. Rios-Luci, J. M. Padron, C. Navarro-Ranninger, A. G. Quiroga, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 381.
- <sup>9</sup> A. Casini, C. Gabbiani, G. Mastrobuoni, R. Z. Pellicani, F. P. Intini, F. Arnesano, G. Natile, G. Moneti, S. Francese, L. Messori, *Biochemistry*, **2007**, 46, 12220.
- <sup>10</sup> L. Cubo, A. Casini, C. Gabbiani, G. Mastrobuoni, L. Messori, J. Jimenez-Barbero, C. Navarro-Ranninger, A. G. Quiroga, *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 9139.
- <sup>11</sup> L. Messori, T. Marzo, C. Gabbiani, A. A. Valdes, A. G. Quiroga, A. Merlino, *Inorg. Chem.*, **2013**, 52, 13827.
- <sup>12</sup> B. Rosenberg in *Platinum Complexes for the Treatment of Cancer: Why the Search Goes On*, Vol. Verlag Helvetica Chimica Acta, **2006**, pp. 1.
- <sup>13</sup> M. Van Beusichem, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 634.
- <sup>14</sup> E. I. Montero, S. Diaz, A. M. Gonzalez-Vadillo, J. M. Perez, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 4264.
- <sup>15</sup> F. D. Rochon, P. C. Kong, *Can. J. Chem.*, **1986**, 64, 1894.
- <sup>16</sup> F. D. Rochon, V. Buculei, *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, 358, 3919.
- <sup>17</sup> E. Pantoja, A. Alvarez-Valdes, J. M. Perez, C. Navarro-Ranninger, J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, 339, 525.
- <sup>18</sup> F. D. Rochon, C. Bonnier, *Inorg. Chim. Acta*, **2007**, 360, 461.
- <sup>19</sup> A. R. Battle, R. Choi, D. E. Hibbs, T. W. Hambley, *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 6317.
- <sup>20</sup> L. Messori, L. Cubo, C. Gabbiani, A. Alvarez-Valdes, E. Michelucci, G. Pieraccini, C. Rios-Luci, L. G. Leon, J. M. Padron, C. Navarro-Ranninger, A. Casini, A. G. Quiroga, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 1717.
- <sup>21</sup> I. Lakomska, M. Fandzloch, T. Muziol, J. Sitkowski, J. Wietrzyk, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 115, 100.

- <sup>22</sup> I. Lakomska, M. Fandzloch, B. Poplawska, J. Sitkowski, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2012**, *91*, 126.
- <sup>23</sup> T. Parro, M. A. Medrano, L. Cubo, S. Munoz-Galvan, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, A. G. Quiroga, *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, *127*, 182.
- <sup>24</sup> K. Stehlikova, J. Kasparkova, O. Novakova, A. Martinez, V. Moreno, V. Brabec, *FEBS J.*, **2006**, *273*, 301.
- <sup>25</sup> H. Pivonkova, M. Brazdova, J. Kasparkova, V. Brabec, M. Fojta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, *339*, 477.
- <sup>26</sup> S. M. Aris, N. P. Farrell, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, 1293.
- <sup>27</sup> K. H. Vousden, X. Lu, *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 594.
- <sup>28</sup> A. Vekris, D. Meynard, M.-C. Haaz, M. Bayssas, J. Bonnet, J. Robert, *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 356.
- <sup>29</sup> P. Perego, M. Giarola, S. C. Righetti, R. Supino, C. Caserini, D. Delia, M. A. Pierotti, T. Miyashita, J. C. Reed, F. Zunino, *Cancer Res.*, **1996**, *56*, 556.
- <sup>30</sup> M. Frik, J. Jimenez, V. Vasilevski, M. Carreira, A. de Almeida, E. Gascon, F. Benoit, M. Sanau, A. Casini, M. Contel, *Inorg. Chem. Front.*, **2014**, *1*, 231.
- <sup>31</sup> J. Chart, N. P. Johnson, B. L. Shaw, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 1662.
- <sup>32</sup> J. Chatt, L. M. Venanzi, *J. Chem. Soc.*, **1955**, 3858.
- <sup>33</sup> A. N. Biswas, V. Bagchi, P. Das, P. Bandyopadhyay, *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep.*, **2007**, *63*, m2836.
- <sup>34</sup> F. J. Ramos-Lima, A. G. Quiroga, J. M. Perez, M. Font-Bardia, X. Solans, C. Navarro-Ranninger, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2003**, 1591.
- <sup>35</sup> D. Belli Dell'Amico, C. Broglia, L. Labella, F. Marchetti, D. Mendola, S. Samaritani, *Inorg. Chim. Acta*, **2013**, *395*, 181.
- <sup>36</sup> F. P. Fanizzi, L. Maresca, G. Natile, M. Lanfranchi, A. Tiripicchio, G. Pacchioni, *Chem. Commun.*, **1992**, 333.
- <sup>37</sup> F. J. Ramos-Lima, A. G. Quiroga, B. Garcia-Serrelede, F. Blanco, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, **2007**, *50*, 2194.
- <sup>38</sup> R. F. Murphy, E. Komlodi-Pasztor, R. Robey, F. M. Balis, N. P. Farrell, T. Fojo, *Cell Cycle*, **2012**, *11*, 963.
- <sup>39</sup> C. G. Barry, C. S. Day, U. Bierbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 1160.
- <sup>40</sup> V. Beljanski, L. G. Marzilli, P. W. Doetsch, *Mol Pharmacol*, **2004**, *65*, 1496.
- <sup>41</sup> Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods Enzymol.*, **1997**, *276*, 307.
- <sup>42</sup> G. M. Sheldrich, *Acta Crystallogr. A*, **1990**, *46*, 467.
- <sup>43</sup> L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, **1999**, *32*, 837.
- <sup>44</sup> C. F. Macrae, I. J. Bruno, J. A. Chisholm, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. v. d. S. and, P. A. Wood, *J. Appl. Cryst.*, **2008**, *41*, 466.
- <sup>45</sup> V.A. Blatov, A.P. Shevchenko, D. M. Proserpio, *Cryst. Growth Des.*, **2014**, *14*, 3576.
- <sup>46</sup> O. Hannebohn, W. Klemm, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **1936**, *229*, 225.
- <sup>47</sup> R. D. Gillard, M. F. Pilbrow, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1974**, 2320.



**Capítulo 3.**  
**Complejos de platino(II) con**  
**un ligando acetato**



Este capítulo reúne los resultados de la síntesis, caracterización, actividad citotóxica y otros estudios biológicos de complejos de platino(II) con la combinación de un grupo cloruro y un acetato, como grupos salientes, para obtener nuevos complejos de fórmula general *trans*-[PtCl(OCOCH<sub>3</sub>)(amina)(PPh<sub>3</sub>)] (Figura 3.1).

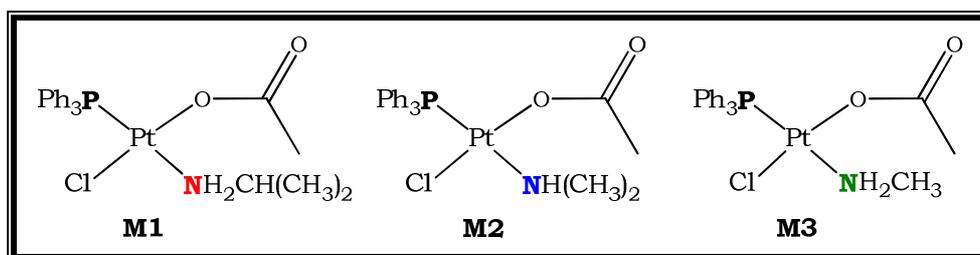


Figura 3.1. Complejos *trans*-[PtCl(OCOCH<sub>3</sub>)(amina)(PPh<sub>3</sub>)].

### **3.1 Introducción y antecedentes**

De los medicamentos basados en platino, el cisplatino y el carboplatino, son los principales agentes quimioterapéuticos, utilizados en pacientes con cáncer avanzado, sobre todo en cáncer de ovario.<sup>1</sup> El cisplatino, como hemos dicho anteriormente, no es muy soluble en agua y a pH neutro tiende a hidrolizarse, dando paso a la formación de oligómeros con puentes hidroxilo que son muy tóxicos. Pero el cambio de los ligandos cloruros por grupos carboxilatos, reduce la toxicidad de los compuestos de platino y mejora su solubilidad en agua.<sup>2</sup>

Roberts y colaboradores,<sup>3</sup> estudiaron la cinética de la reacción de acuación del cisplatino y el carboplatino, y sus reacciones posteriores con el ADN, tanto *in vitro* como *in vivo*, encontrando que una vez que se rompe el anillo quelato del carboplatino se forma el monoadducto y el siguiente ligando carboxilato se vuelve más lábil, mientras que en el caso del cisplatino ambos cloruros se pierden a la misma velocidad. Este trabajo demostró que tanto cisplatino como carboplatino, causan las mismas lesiones bifuncionales una vez unidos al ADN. Por lo que las diferencias en las dosis utilizadas con estos fármacos para producir las lesiones al ADN están determinadas por la velocidad de acuación, que es más rápida para el cisplatino.

### 3.1.1 El carboplatino, mecanismo de acción y su estabilidad en disolución

El carboplatino, como se indicó en la introducción (Figura 1.4), es un agente antitumoral que difiere del cisplatino, en que tienen un sólo ligando saliente dicarboxilato bidentado. Para mayor comodidad en su administración, este fármaco se suministra como disolución de infusión, a ~27 mM (10 mg/ml) en agua, que contiene manitol o dextrosa, y en algunos casos, una pequeña cantidad del ligando dicarboxilato (ciclobutano-1,1 dicarboxilato (CBDCA)).<sup>4</sup>

La síntesis del carboplatino implica varios pasos, incluyendo la formación del complejo *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]SO<sub>4</sub> y la reacción final con un equivalente de Ba (CBDCA) da el producto deseado.<sup>5</sup> El carboplatino, es menos tóxico que el cisplatino pero igual de eficiente y ambos tienen un espectro de actividad antitumoral similar.<sup>6</sup>

El carboplatino actúa como un agente alquilante bifuncional, igual que el CDDP. Este atraviesa fácilmente la membrana celular y una vez dentro de la célula, el anillo Pt-CBDCA se abre para formar la fracción activa, esta reacción se produce más lentamente que la activación de CDDP. Por lo que, se requiere de 4-6 veces la cantidad de carboplatino para producir los mismos efectos citotóxicos que el cisplatino. Una vez que se ha formado la especie activa, el carboplatino actúa de manera similar al CDDP y el fármaco se une con el ADN, ARN, u otras macromoléculas en dos sitios para formar enlaces inter e intracatenarios. El carboplatino forma enlaces covalentes irreversibles que inhiben la replicación del ADN, la transcripción del ARN, y la síntesis de proteínas. Los enlaces intracatenarios en la posición **N7** de la guanina, son los sitios de unión predominantes, al igual que con el CDDP. Los efectos de la exposición a carboplatino ocurren 18 h después de su administración mientras que con CDDP se observan a las 6-12 h, debido a que los aductos monofuncionales se forman más lentamente y en consecuencia la eliminación del fármaco es también más lenta.

### 3.1.2 Complejos *cis*-Pt(II) con grupos carboxilato como ligando saliente

Aparte del carboplatino, pocos complejo de Pt(II) con ligandos amina y carboxilato muestran buenas actividades antitumorales como por ejemplo: [Pt(dach)(oxalato)] (oxaliplatino), [Pt(dach)(malonato)] (donde dach=1,2-diaminociclohexano) y [Pt(etilendiamina)(malonato)], donde la mayoría tiene grupos dicarboxilato coordinados de forma bidentada al Pt.<sup>7</sup> Aunque, estos tipos de compuestos se han estudiado ampliamente, el conocimiento químico relacionado con la síntesis y caracterización de estas moléculas es limitado, especialmente para complejos con aminas distintas de NH<sub>3</sub>, DACH (diaminociclohexano) o etilendiamina.

Zheng y colaboradores,<sup>8</sup> prepararon una familia de complejos *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)(dicarboxilato)] con algunas variaciones en el ligando dicarboxilato y estudiaron su actividad antitumoral (Tabla 3.A).

Tabla 3.A. Actividad antitumoral *in vivo* de los complejos *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)(dicarboxilato)].

Complejos	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	HL-60	U937
<i>cis</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> )(CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> )((OCO) <sub>2</sub> )]	19,05	17,57
<i>cis</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> )(CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> )((OCO) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )]	24,32	21,87
<i>cis</i> -[Pt(NH <sub>3</sub> )(CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> )((OCO) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> )]	16,21	14,45

Los resultados indicaron una buena actividad citotóxica, además de tener la ventaja de ser muy solubles en agua. Las variaciones en los ligandos carboxilato no implicaron grandes diferencias en la citotoxicidad.

En esta misma línea, se sintetizaron tres nuevos complejos de Pt(II) NH<sub>3</sub>/ciclohexilamina con ligandos dicarboxilatos de fórmula *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>NH<sub>2</sub>)((OCO)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>)] (n= 0, 1 y 2).<sup>9</sup> Los resultados mostraron que los complejos poseen actividad antitumoral, especialmente en EJ y HL-60 (cáncer de vejiga humano y leucemia promielocítica humana, respectivamente). En particular, el complejo *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)(NH<sub>2</sub>)(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>)((OCO)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)] muestra una citotoxicidad superior a la

del cisplatino. En los estudios del ciclo celular los complejos mostraron una acumulación de las células en la fase G2/M, el mismo efecto observado con el cisplatino en células HL-60, y en estudios de platinación al ADN en las células HL-60 y EJ, sólo el complejo con  $n=2$  mostró mayor unión al ADN que el CDDP.

Otra familia de complejos con ligandos carboxilatos monodentados de fórmula  $cis-[Pt(NH_3)(CH_3CH_2CH_2NH_2)X_2]$  (a-g) ( $X= C_6H_5COO^-$ ,  $p-CH_3(C_6H_4)COO^-$ ,  $p-CH_3(C_6H_4)COO^-$ ,  $p-NO_2(C_6H_4)COO^-$ ,  $CH_3COO^-$ ,  $ClCH_2COO^-$  y  $Cl_2CHCOO^-$ ) fue estudiada por Zhao y colaboradores.<sup>10</sup> Estos complejos mostraron buena actividad antitumoral sobretodo en células EJ y HL-60. Las variaciones en los grupos carboxilato, demostraron que los complejos con grupos carboxilatos aromáticos, muestran una mejor citotoxicidad aunque, las diferencias respecto a los carboxilatos alifáticos no son muy grandes (Figura 3.3).

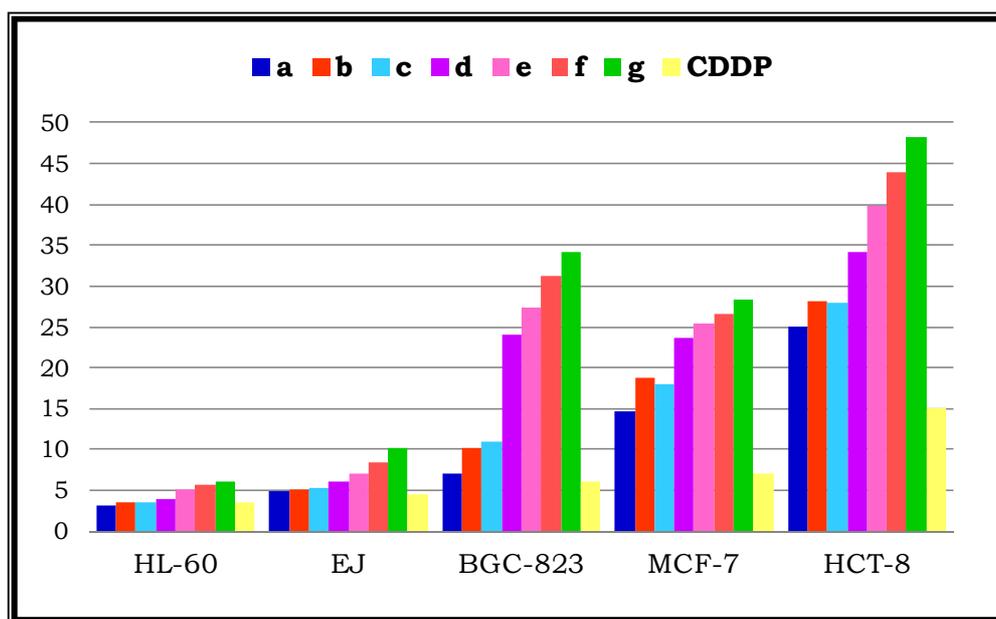


Figura 3.3. Actividad antitumoral de los complejos  $cis-[Pt(NH_3)(n-PrNH_2)X_2]$ .

A pesar de que los complejos de Pt(II) con grupos carboxilatos como grupo saliente, parecen ser una buena alternativa para la preparación de nuevos antitumorales, en la bibliografía,<sup>11-12</sup> la mayoría de la publicaciones se limitan a la síntesis y caracterización, indicando que los rendimientos son generalmente bajos y los productos obtenidos son muy difíciles purificar.

Un ejemplo, es el miriplatino (*cis*- [(1R,2R)-N,N'-1,2-diaminociclohexano]-bis-(tetradecanoato-O)platino) (MPT) que fue descubierto por Maeda y colaboradores,<sup>13</sup> es un complejo divalente que tiene miristato como ligando saliente y DACH como ligando no saliente. El MPT se utiliza en TACE (quimioembolización transcatéter arterial), debido a su alto grado lipofílico, por lo que se puede suspender fácilmente en lipiodol (aceite de semilla de amapola que se usa como agente de contraste en imágenes)<sup>14</sup> y se libera gradualmente como compuesto de platino activo en el tejido tumoral, disminuyendo su toxicidad, por lo que puede ser una alternativa prometedora para el tratamiento del carcinoma hepatocelular (HCC).<sup>15</sup>

### 3.1.3 Complejos *trans*-Pt(II) con grupos carboxilato como ligando saliente

Los complejos de Pt(II) de geometría *trans*, también se han sintetizado con ligandos carboxilatos. Benetollo y colaboradores,<sup>16</sup> por ejemplo, prepararon el complejo *trans*-[Pt(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)], que posteriormente se ha utilizado para estudiar el efecto y la influencia *trans*, comparándolo con otros complejos de Pt(II),<sup>17</sup> pero no se estudió su actividad antitumoral.

Farrell y colaboradores,<sup>18</sup> sintetizaron y estudiaron complejos de fórmula general *trans*-[Pt(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(L)(L')] donde L y L' son NH<sub>3</sub> y/o ligandos piridina y quinolina. Estos autores demostraron que el uso de ligandos acetato en los complejos *trans*, también aumenta la solubilidad en agua, lo que puede conducir a una mayor actividad en las pruebas *in vivo* y así resultar significativamente más citotóxicos.

De estas series de compuestos, se estudiaron los complejos *trans* con los siguientes ligandos: 3-metil-piridina, 4-metil piridina y NH<sub>3</sub>.<sup>19</sup> Los resultados citotóxicos se evaluaron y compararon con sus precursores dicloruros, en células Pam-212 (queratinocitos tumorales murinos). Los resultados mostraron que los complejos diacetato tienen una actividad citotóxica mejor en las células Pam-212 que la de sus precursores,

mientras que en las células resistentes a CDDP no se observó la misma tendencia (Tabla 3.B).

Tabla 3.B. Actividad antitumoral diferentes complejos *trans*-Pt(II) diacetato y sus precursores.

Complejo	IC <sub>50</sub> (μM)	
	Pam-212	Pam-212 <sub>ras</sub>
<i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (3-Mepy) <sub>2</sub> ]	41,0±2,0	72,0±5,0
<i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (4-Mepy) <sub>2</sub> ]	32,0±1,0	20,0±1,0
<i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> )(3-Mepy)]	52,0±4,0	99,0±10,0
<i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> )(4-Mepy)]	28,0±2,0	26,0±2,0
<i>trans</i> -[Pt(OCOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (3-Mepy) <sub>2</sub> ]	19,4±1,0	21,0±3,0
<i>trans</i> -[Pt(OCOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (4-Mepy) <sub>2</sub> ]	16,9±2,0	23,3±1,0
<i>trans</i> -[Pt(OCOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> )(3-Mepy) <sub>2</sub> ]	34,1±3,0	101,3±9,0
<i>trans</i> -[Pt(OCOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> )(4-Mepy) <sub>2</sub> ]	36,5±2,0	167,5±12,0
CDDP	103,0±8,0	106,0±7,0

En algunos complejos *trans* con ligandos como 4-metilpiridina y NH<sub>3</sub>, también se ha estudiado el efecto de diferentes grupos carboxilatos (OCOR) con R= H, CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub>OH.<sup>20</sup> La citotoxicidad de estos complejos aumenta en el siguiente orden <sup>-</sup>OAc < <sup>-</sup>OAcOH < <sup>-</sup>OFm, lo que sugiere que la naturaleza del grupo carboxilato tiene relación con la citotoxicidad. Estudios adicionales demostraron, que en esta familia de complejos, la velocidad de hidrólisis se ralentiza aproximadamente un orden de magnitud, en comparación a sus análogos de dicloruro. Lo que indica que los ligando cloruros unidos a Pt(II), se pierden más rápidamente que los ligandos carboxilato.

## 3.2 Discusión de resultados

### 3.2.1 Síntesis de los complejos *trans*-[PtCl(OCOCH<sub>3</sub>)(amina)PPh<sub>3</sub>]

Para llevar a cabo la síntesis de los complejos monoacetato de Pt(II), se utilizó como material de partida los complejos *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)], previamente publicados por nuestro grupo de investigación. Ensayamos la reacción de los complejos de Pt(II) dicloruro con un equivalente de acetato de plata usando una amplia variedad de disolventes, tiempos de reacción y temperatura, sin llegar a obtener el producto deseado.

Tras muchos intentos variando las condiciones de reacción y la estequiometría de los reactivos, conseguimos los complejos deseados *trans*-[PtCl(OCOCH<sub>3</sub>)(amina)(PPh<sub>3</sub>)] (Figura 3.4) utilizando 2 equivalentes de AgAcO en una mezcla acetona/agua a reflujo durante 6h. Llegamos incluso a probar la reacción utilizando hasta con 20 equivalentes de AgAcO y disolventes muy coordinantes tales como DMF, sin observar una sustitución total de los cloruros, o mayores rendimientos en el complejo deseado.

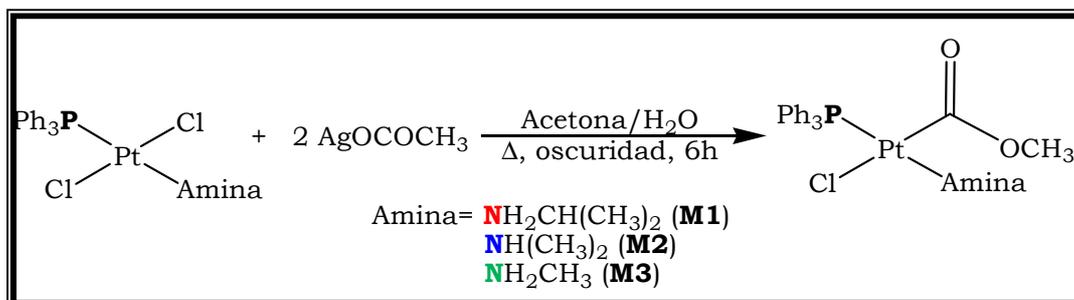


Figura 3.4. Reacción de síntesis de complejos monoacetatos de Pt(II).

Todos los complejos fueron caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P y <sup>195</sup>Pt, además de análisis elemental, MS-ESI y difracción de rayos X en los casos en los que se obtuvieron cristales.

En los espectros de <sup>1</sup>H-RMN, se puede identificar la señal correspondiente al grupo CH<sub>3</sub> del ligando acetato, en todos los casos en torno a 1,3 -1,4 ppm. Los desplazamientos de <sup>31</sup>P y <sup>195</sup>Pt de los complejos de partida y los productos finales se muestran en la tabla 3.C.

Tabla. 3.C. Desplazamiento químico de los complejos de partida y los productos monoacetatos.

Desplazamiento químico (ppm) de los complejos de partida			Desplazamiento químico (ppm) de los complejos monoacetatos		
Complejos	<sup>31</sup> P	<sup>195</sup> Pt	Complejos	<sup>31</sup> P	<sup>195</sup> Pt
<i>t</i> -[PtCl <sub>2</sub> (ipa)(PPh <sub>3</sub> )] <b>S1</b>	3,89	-3742,9	<i>t</i> -[PtCl(OAc)(ipa)(PPh <sub>3</sub> )] <b>M1</b>	4,00	-3130,0
<i>t</i> -[PtCl <sub>2</sub> (dma)(PPh <sub>3</sub> )] <b>S2</b>	3,83	-3837,7	<i>t</i> -[PtCl(OAc)(dma)(PPh <sub>3</sub> )] <b>M2</b>	3,50	-3195,5
<i>t</i> -[PtCl <sub>2</sub> (ma)(PPh <sub>3</sub> )] <b>S3</b>	3,60	-3597,6	<i>t</i> -[PtCl(OAc)(ma)(PPh <sub>3</sub> )] <b>M3</b>	3,93	-3152,2

Las variaciones en <sup>31</sup>P-RMN entre los complejos de partida y los complejos monoacetatos no son muy marcadas, sin embargo, en <sup>195</sup>Pt-RMN si se observa una variación más significativa, lo que permite confirmar el enlace de coordinación del grupo acetato al platino(II).

La espectrometría MS-ESI, permite identificar el ion para molecular [M<sup>+</sup>] para **M1** y **M2** (612,11 y 598,10 una respectivamente).

El complejo **M1**, fue caracterizado por difracción de rayos X. Esta estructura cristalina confirmó, la coordinación de un solo ion acetato en posición *trans* al cloruro, en la bibliografía no se ha encontrado ningún complejo de Pt(II) con este entorno químico. La estructura cristalina muestra, la formación de un sintón entre el NH (ipa) y el grupo carbonilo C=O de una molécula cercana, estas interacciones débiles, son asociaciones moleculares importantes ya que dan estabilidad a la estructura cristalina. Otra interacción importante es la Cl...CH, que hace que las moléculas conectadas a través del sintón, se conecten con cuatro moléculas más, para hacer crecer la red cristalina (Figura 3.5).

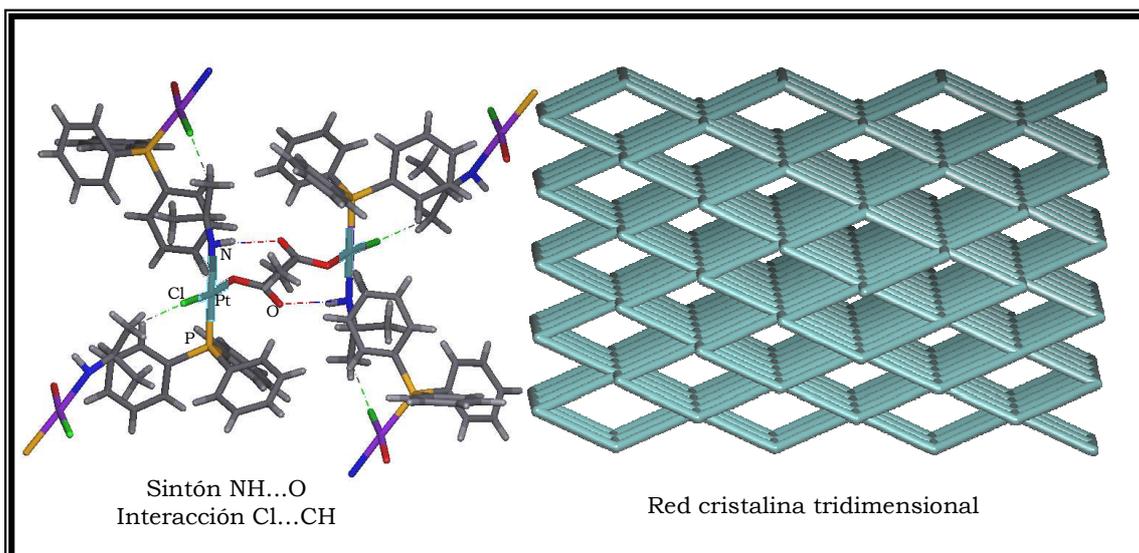


Figura 3.5. Sintón y una de las interacciones Cl...CH, mostradas por **M1** y su red cristalina.

Se estudió la estabilidad del complejo *trans*-[PtCl(OAc)(dma)(PPh<sub>3</sub>)] por <sup>1</sup>H-RMN, con el objetivo de determinar si los complejos mantienen su estructura intacta en DMSO. En la figura 3.6, se muestra una monitorización por <sup>1</sup>H-RMN a diferentes tiempos. En todos los espectros, se pueden identificar las señales correspondientes al grupo CH<sub>3</sub> de acetato coordinado a 1,38 ppm y en el área de los <sup>1</sup>H aromáticos se detectan las señales del ligando PPh<sub>3</sub>. Sin embargo, la señal de los metilos correspondientes al ligando dimetilamina quedan solapados por la señal del disolvente, en torno a 2,50 ppm (HMBC). Los complejos mantienen su estructura en DMSO, aunque a las 24 h, como es de esperar, se puede percibir nuevas señales minoritarias cerca de los grupos dma y trifenilfosfina.

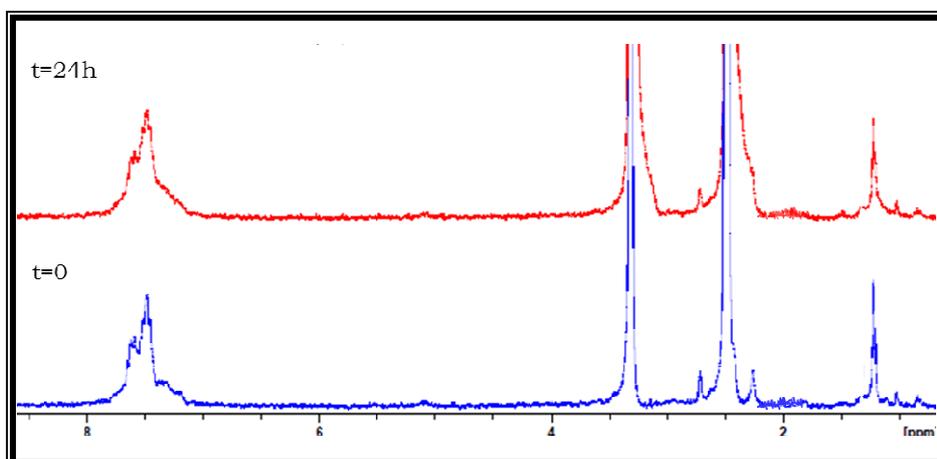


Figura 3.6. Monitorización de la estabilidad del complejo **M2** en DMSO por <sup>1</sup>H-RMN.

### 3.2.2 Estudio de la actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtCl(OAc)(amina)PPh<sub>3</sub>]

Los complejos **M1**, **M2** y **M3** y sus precursores (**S1**, **S2** y **S3**) se evaluaron en células tumorales A2780 (cáncer de ovario), A2780cisR (cáncer de ovario resistente a CDDP), HCT116wt (carcinoma de colon p53+/+) y HCT116ko (carcinoma de colon con supresión de p53-/-), los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.6.

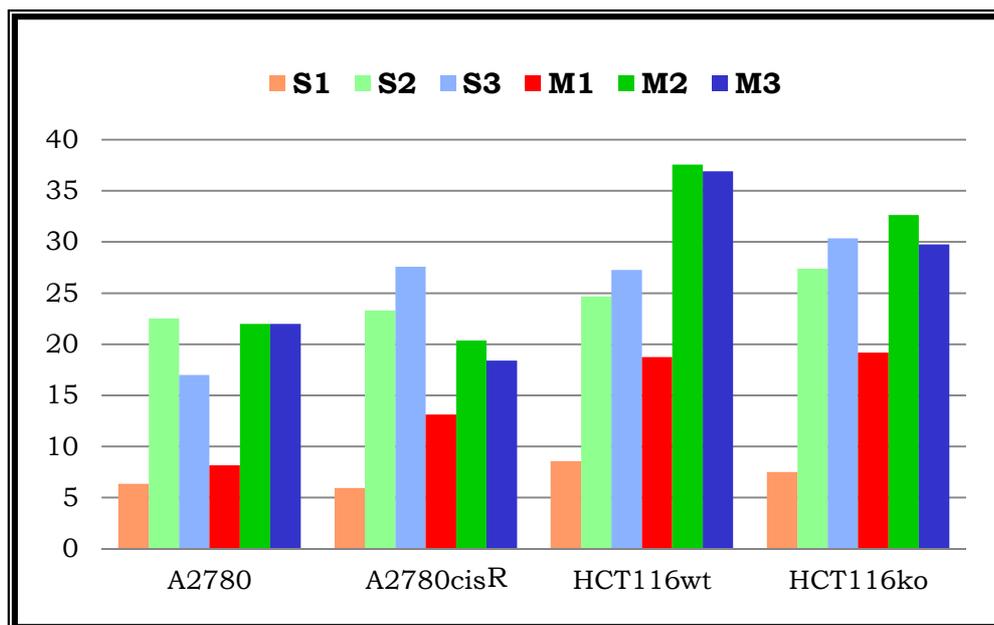


Figura 3.6. Actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtCl(OAc)(amina)PPh<sub>3</sub>] y sus precursores.

Según los resultados de la figura 3.6, los complejos con isopropilamina son los que muestran mejor actividad citotóxica (tanto para los precursores como para los complejos monoacetatos). Los resultados al comparar los compuestos de partida con los complejos monoacetatos, tienen la misma tendencia que los resultados obtenidos por Farrell y colaboradores,<sup>19</sup> que observaron que los complejos dicloruro, mostraban igual o mejor citotoxicidad que sus análogos dicarboxilato.

Por lo que, aunque los complejos monoacetatos (**M1**, **M2** y **M3**), no muestran una mejoría importante en la actividad antitumoral, serían necesarios más estudios para determinar las diferencias que podrían presentar estos complejos en su perfil farmacológico.

Por lo que también, se estudió si el número de células tenía impacto en la actividad antitumoral. Así se sembraron las células en varias concentraciones y se estudiaron tanto los precursores como los complejos monoacetados. Los resultados preliminares mostraron que el número de células con los precursores no tiene influencia. Sin embargo, los nuevos complejos **M1**, **M2** y **M3**, parecen especialmente activos en cultivos celulares en estadios de crecimiento temprano ya que la actividad citotóxica disminuye ligeramente cuando se aumenta el número de células. A pesar de esto, los complejos con acetatos son más activos o del mismo rango que los precursores en todos los experimentos.

### 3.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los resultados del estudio en gel de agarosa de la interacción de los complejos **M1**, **M2** y **M3** con el plásmido superenrollado pBR322, se muestran en la figura 3.7.

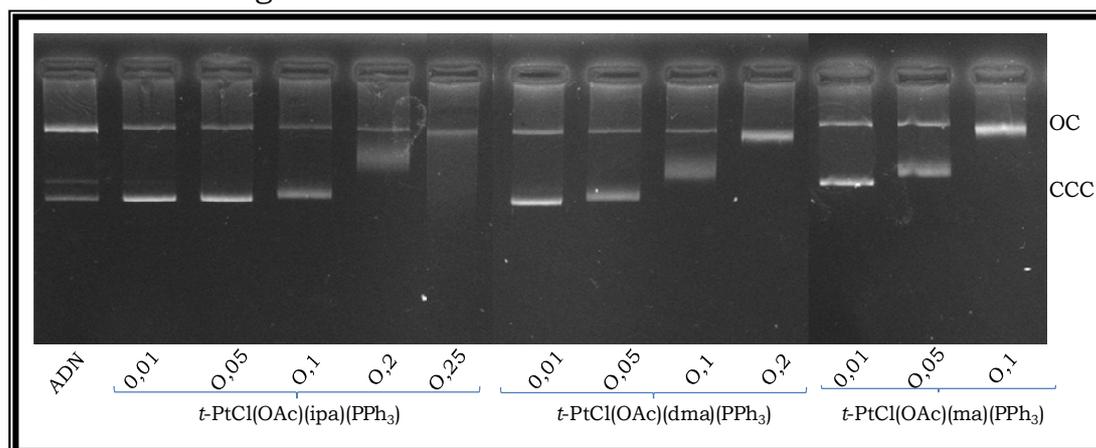


Figura 3.7. Electroforesis en gel de agarosa para los complejos *trans*-[PtCl(OAc)(amina)(PPh<sub>3</sub>)].

Como se puede observar en la figura 3.7, todos los complejos monoacetato muestran interacción con el plásmido pBR322, de forma similar a otros complejos mostrados en esta tesis (con variación sólo de la movilidad electroforética de la forma CCC). El complejo que interacciona a una menor relación de  $r_1$  ([complejo]/pares de bases) es el complejo con metilamina (**M3**), seguido por **M2** y **M1**. Si comparamos estos resultados con la movilidad electroforética mostrada por los precursores **S1**, **S2** y **S3** (Capítulo 4, Figura 4.15), podemos notar diferencias. Quizás la más

llamativa sea la diferencia en las concentraciones a las que confluyen las formas OC y CCC. Así, mientras los precursores con isopropilamina (**S1**) y dimetilamina (**S2**) dichas formas confluyen a una relación de  $r_i = 0,3$ , los complejos monoacetatos análogos (**M1** y **M2**) ambas formas confluyen a valores de  $r_i$  ligeramente más pequeños (carriles 6 y 10). Es decir, se necesitan concentraciones menores para producir el mismo efecto de confluencia.

### **3.3 Parte experimental**

#### **3.3.1 Disolventes, reactivos y equipos empleados**

Para la síntesis de los complejos monoacetato, se utilizaron muchos de los reactivos mostrados en la tabla 2.B (Capítulo 2, sección 2.3.1) y los siguientes adicionales: cloruro de platino (Johnson Matthey) y acetato de plata (Sigma-Aldrich)

La mayoría de los disolventes empleados se usaron sin ningún tratamiento previo, a menos que se indique lo contrario. Y los experimentos de caracterización se llevaron a cabo en el SIDI-UAM (como se indicó en el capítulo anterior).

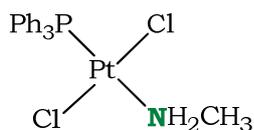
#### **3.3.2 Síntesis de los complejos de partida**

Para la síntesis de los complejos de Pt(II) con ligando acetato, fue necesaria la preparación de los complejos análogos de Pt(II) (*trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]), siguiendo la metodología previamente publicada por nuestro grupo, con algunas pequeñas modificaciones.<sup>21-22</sup>

El complejo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ma)(PPh<sub>3</sub>)], fue sintetizado por primera vez y el procedimiento y caracterización se muestran a continuación:

- **Síntesis de complejos *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ma)(PPh<sub>3</sub>)]**

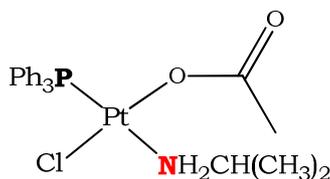
Se preparó una suspensión del dímero *trans*-[Pt<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(μ-Cl)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] en cloroformo con 2 equivalentes de hidrocloreuro de metilamina. Sobre esta suspensión se adicionaron lentamente 2 equivalentes de hidróxido de sodio disueltos en 500 μl de agua. Una vez finalizó la adición, la mezcla se dejó reaccionar durante una noche a oscuridad. Luego se llevó a sequedad y al crudo se añadió éter etílico. Se filtró y la parte soluble se dejó evaporar a temperatura ambiente hasta obtener un sólido cristalino como producto.

*trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ma)(PPh<sub>3</sub>)] (**S3**)

Sólido amarillo intenso (84%).  **$\delta$ H** (300,13 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 7,69 (m, 6H, H<sub>orto</sub>), 7,46 (m, 9H, H<sub>para-meta</sub>), 2,61 (d, 3H, CH<sub>3</sub>(ma),  $J_{H-H}=4,6$  Hz), 4,02 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>(ma)).  **$\delta$ C** (75,47 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 134,7 (d, C<sub>orto</sub>,  $J_{C-P}=8,4$  Hz), 127,7 (d, C<sub>meta</sub>,  $J_{C-P}=12,0$  Hz), 130,6 (d, C<sub>para</sub>,  $J_{C-P}=3,1$ Hz), 14,2 (s, CH<sub>3</sub>(ma)).  **$\delta$ P** (121,5 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 4,63 ( $J_{P-Pt}=2158,17$  Hz).  **$\delta$ Pt** (64,53 MHz; acetona-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) = -1583,0 (d,  $J_{Pt-P}=2159,43$  Hz). **Análisis elemental CHN**, encontrado: C:40,60%, H:3,42%, N:2,41%. Calculado para C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>NCl<sub>2</sub>Ppt: C:40,80%, H:3,60%, N: 2,50%.

**3.3.3 Síntesis de complejos *trans* de platino(II) monoacetato**

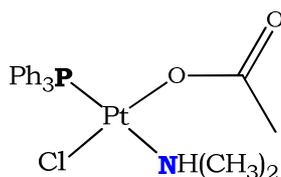
A una disolución de complejo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] en acetona, se agregó una disolución de 2 equivalentes de AgCH<sub>3</sub>COO en una mezcla de acetona-agua. La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 6 h, con agitación y en oscuridad. Después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró sobre celita. El filtrado se llevó a sequedad bajo presión reducida, el crudo obtenido se disolvió en la mínima cantidad de cloroformo, se agregó una capa de hexano y se dejó a baja temperatura durante una noche. Se obtuvo un precipitado que se filtró y se secó a vacío. Para purificar los complejos es necesario realizar varias precipitaciones.

*trans*-[PtCl(OAc)(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (**M1**)

Sólido beige, (36,5%).  **$\delta$ H** (300,13 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 7,70 (m, 6H, H<sub>orto</sub>), 7,43 (m, 9H), 3,31 (hp, 1H, CH<sub>(ipa)</sub>,  $J_{H-H}=6,4$  Hz), 1,34 (d, 6H, CH<sub>3</sub>(ipa),  $J_{H-H}=7$  Hz), 4,09 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>(ipa)), 1,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(OAc)).  **$\delta$ C** (75,47 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 178,59

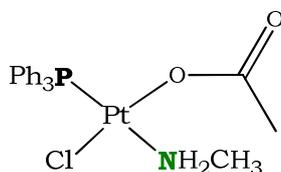
(s, C=O<sub>(OAc)</sub>) 134,5 (d, C<sub>orto</sub>, J<sub>C-P</sub>=10,8 Hz), 128,2 (d, C<sub>meta</sub>, J<sub>C-P</sub>=11,0 Hz), 130,8 (d, C<sub>para</sub>, J<sub>C-P</sub>=2,4 Hz), 46,67(s, CH<sub>(ipa)</sub>), 24,5 (s, CH<sub>3(ipa)</sub>), 22,5 (s, CH<sub>3(OAc)</sub>). **δP** (121,5MHz; CDCl<sub>3</sub>) 4,00 (J<sub>P-Pt</sub>=3867,7 Hz). **δPt** (64,53 MHz; acetona-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -3130,0 (d, J<sub>Pt-P</sub>=3870,2 Hz). **MS (ESI)**: 612,11 uma [M+]. **Análisis elemental CHN**, encontrado: C:47,27, H:4,81, N:1,83. Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>NClO<sub>2</sub>Pt·1,25C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O: C:47,00%, H:5,09%, N: 2,05%.

*trans*-[PtCl(OAc)(dma)(PPh<sub>3</sub>)] (**M2**)



Sólido beige, (64%). **δH** (300,13 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 7,74 (m, 6H, H<sub>orto</sub>), 7,43 (m, 9H), 2,71 (d, 6H, CH<sub>3(dma)</sub>, J<sub>H-H</sub>=7,0 Hz), 4,35 (sa, 1H, NH<sub>(dma)</sub>), 1,38 (s, 3H, CH<sub>3(OAc)</sub>). **δC** (75,47 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 177,8 (s, C=O<sub>(OAc)</sub>) 134,6 (d, C<sub>orto</sub>, J<sub>C-P</sub>=10,4 Hz), 128,2 (d, C<sub>meta</sub>, J<sub>C-P</sub>=11,2 Hz), 130,7 (d, C<sub>para</sub>, J<sub>C-P</sub>=2,1 Hz), 40,7 (s, CH<sub>3(dma)</sub>), 21,7 (s, CH<sub>3(OAc)</sub>). **δP** (121,5MHz; CDCl<sub>3</sub>) 3,50 (J<sub>P-Pt</sub>=3725,3 Hz). **δPt** (64,53 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -3195,8 (d, J<sub>Pt-P</sub>=3719,9 Hz). **MS (ESI)**: 598,10 uma [M+]. **Análisis elemental CHN**, encontrado: C:36,49%, H3,63%, N:1,79%. Calculado para C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NClO<sub>2</sub>Pt·1,65CHCl<sub>3</sub>·0,15Hx: C:36,55%, H:3,59%, N: 1,74%.

*trans*-[PtCl(OAc)(ma)(PPh<sub>3</sub>)] (**M3**)



Sólido beige (58%). **δH** (300,13 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 7,74 (m, 6H, H<sub>orto</sub>), 7,43 (m, 9H), 2,71 (d, 6H, CH<sub>3(ma)</sub>, J<sub>H-H</sub>=6,9 Hz), 4,35 (sa, 1H, NH<sub>2(ma)</sub>), 1,38 (s, 3H, CH<sub>3(OAc)</sub>). **δC** (75,47 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 178,6 (s, C=O<sub>(OAc)</sub>) 134,6 (d, C<sub>orto</sub>, J<sub>C-P</sub>=10,1 Hz), 128,1 (d, C<sub>meta</sub>, J<sub>C-P</sub>=11,0 Hz), 130,8 (d, C<sub>para</sub>, J<sub>C-P</sub>=2,2 Hz), 30,6 (s, CH<sub>3(ma)</sub>), 22,4 (s, CH<sub>3(OAc)</sub>). **δP** (121,5MHz; CDCl<sub>3</sub>) 3,93 (J<sub>P-Pt</sub>=2289,8 Hz). **δPt**

(64,53 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -3152,2 (d,  $J_{\text{Pt-P}}=2299,9$  Hz). **MS (ESI)**: 526,12 uma [M-Cl]<sup>+</sup>. **Análisis elemental CHN**, encontrado: C:44,49%, H:4,47%, N:1,28%. Calculado para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NC1O<sub>2</sub>PPt·0.9C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O·0.05CHCl<sub>3</sub>: C:44,88%, H:4,10%, N: 2.,08%.

### 3.3.3.1 Estructura de rayos X

#### Complejos *trans*-[PtCl(OCOCH<sub>3</sub>)(ipa)PPh<sub>3</sub>] (**M1**)

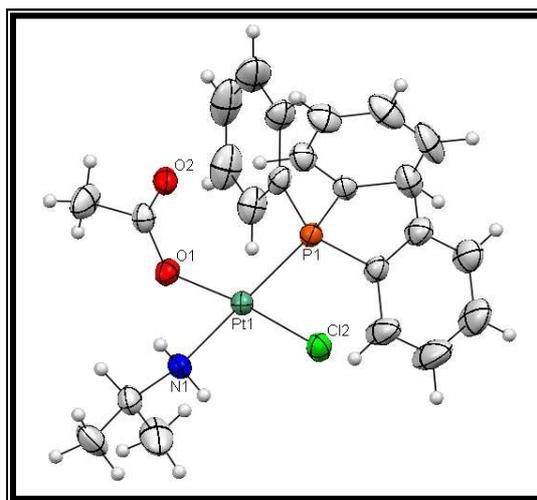


Figura 3.8. Estructura cristalina del complejo **M1**

Tabla 3.D Longitudes y ángulos de enlace seleccionados para el complejo **M1**.

Longitudes de enlace seleccionadas (Å)			
Pt1-O1	2,016(4)	Pt1-Cl1	2,2935(16)
Pt1-N1	2,101(5)	Pt1-P1	2,2273(15)
Ángulos de enlace seleccionados (°)			
O1-Pt1-Cl2	173,12(13)	O1-Pt1-N1	86,82(18)
N1-Pt1-P1	175,79(14)	O1-Pt1-P1	96,12(13)

Tabla 3.E. Datos cristalográficos del complejo **M1**.

Fórmula química	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> ClNO <sub>2</sub> PPt	
Peso molecular	610,97	
Temperatura	296(2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Tamaño del cristal	0,04 x 0,04 x 0,06 mm	
Apariencia del cristal	Amarillo pálido prismático	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P 1 21/n 1	
Dimensiones de la celda unidad	a = 9,9846(5) Å b = 17,4069(8) Å c = 14,0618(7) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 98,257(2)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Volumen	2418,6(2) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Densidad calculada	1,678 mg/cm <sup>3</sup>	
Coefficiente de absorción	5,996 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1192	

### 3.3.4 Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtCl(OAc)(amina)(PPh<sub>3</sub>)]

Los complejos de Pt(II) con ligando acetato, fueron evaluados en las siguientes líneas celulares: A2780 (cáncer de ovario), A2780cisR (cáncer de ovario resistente a CDDP), HCT116wt (carcinoma de colon p53+/+) y HCT116ko (carcinoma de colon con supresión de p53-/-). Estas líneas de células se cultivaron con RPMI con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomycin en aire humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Los compuestos se ensayaron en placas de 96 pocillos. Las células se sembraron en las placas de 96 pocillos, a una densidad entre 3000 células/pocillo (A2780) y 2000 células/pocillo (HCT116+/+ y -/-) en 100 µl por pocillo. Después de un período de recuperación y adaptación de las células al medio de 24 h, las soluciones madre de los fármacos (10 mM) (recién preparados en DMSO), se diluyeron con volúmenes adecuados de medio de cultivo y se añadieron a las muestras, en volúmenes de 100 µl por pocillo. Las concentraciones finales de DMSO nunca superaron el 0,5%.

Después de la exposición de las células al fármaco durante 72 h, se determinó la viabilidad celular por MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil Bromuro de 2H-tetrazolio). Después, se eliminó la mezcla medio/MTT y los cristales formados se disolvieron en DMSO y luego se midieron las densidades ópticas a 550 nm (referencia longitud de onda, 690 nm), con un lector de microplacas (ELX880, BioTek). La cantidad de células viables se expresa como un porcentaje.

### **3.3.5 Electroforesis en gel de agarosa de los complejos *trans*-[PtCl(OAc)(amina)(PPh<sub>3</sub>)]**

Se prepararon disoluciones stock de los complejos de concentración 5 mM en DMSO y luego diluciones con agua a 5  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 500  $\mu$ M.

Se determinó el volumen necesario de cada una de las diluciones para tener las diferentes relaciones de  $r_i$  (donde  $r_i = [\text{complejo}]/(\text{número de pares de bases-ADN})$ ), con un número de bases de 120 pb del plásmido pBR322 (Thermo Scientific). Al final todas las mezclas contenían: complejo, plásmido, buffer y agua en un volumen total de 20  $\mu$ l.

Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Luego se añadieron 2  $\mu$ l del colorante o buffer de carga, que contiene 50% de glicerol, 0,25% azul de bromofenol y 0,25% cianol xileno. El total de la muestra (20  $\mu$ l), se cargó en los pocillos de un gel de agarosa al 0,8%. La electroforesis se llevó a cabo durante 1,5 h a aproximadamente 70 V. Después de la electroforesis, el gel se sumergió en 800 ml de agua Millipore, que contiene 64  $\mu$ l de una solución madre de 10 mg/ml de bromuro de etidio, durante 30 minutos para teñir el ADN.

Finalmente, se toma la fotografía en un equipo UVITEC Cambridge y se realiza la adquisición de la imagen con tratamiento por UVIDOC HD2.

### **3.4 Bibliografía**

- <sup>1</sup> K. Aabo, M. Adams, P. Adnitt, D. S. Alberts, A. Athanazziou, V. Barley, D. R. Bell, U. Bianchi, G. Bolis, M. F. Brady, H. S. Brodovsky, H. Bruckner, M. Buyse, R. Canetta, V. Chylak, C. J. Cohen, N. Colombo, P. F. Conte, D. Crowther, J. H. Edmonson, C. Gennatas, E. Gilbey, M. Gore, D. Guthrie, S. B. Kaye, A. H. Laing, F. Landoni, R. C. Leonard, C. Lewis, P. Y. Liu, C. Mangioni, S. Marsoni, H. Meerpohl, G. A. Omura, M. K. B. Parmar, J. Pater, S. Pecorelli, M. Presti, W. Sauerbrei, D. V. Skarlos, R. V. Smalley, H. J. Solomon, L. A. Stewart, J. F. G. Sturgeon, M. H. N. Tattersall, J. T. Wharton, W. W. Ten Bokkel Huinink, M. Tomirotti, W. Torri, C. Trope, M. M. Turbow, J. B. Vermorken, M. J. Webb, D. W. Wilbur, C. J. Williams, E. Wiltshaw, B. Y. Yeap, *Br. J. Cancer*, **1998**, 78, 1479.
- <sup>2</sup> O'Dwyer, Peter J., Stevenson, James P., Johnson, Steven W. (2006). Clinical Status of Cisplatin, Carboplatin, and Other Platinum-Based Antitumor Drugs in Cisplatin. Verlag Helvetica Chimica Acta Ed. Zürich, Switzerland. 29-69.
- <sup>3</sup> R. J. Knox, F. Friedlos, D. A. Lydall, J. J. Roberts, *Cancer Research*, **1986**, 46, 1972.
- <sup>4</sup> B. Schnurr, H. Heinrich, R. Gust, *Mikrochim. Acta*, **2002**, 140, 141.
- <sup>5</sup> G. J. Sewell, C. M. Riley, C. G. Rowland, *J. Clin. Pharm. Ther.*, **1987**, 12, 427.
- <sup>6</sup> W. C. Rose, J. E. Schurig, *Cancer Treat. Rev.*, **1985**, 12, Supplement A, 1.
- <sup>7</sup> S. E. Sherman, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 1153.
- <sup>8</sup> J. Zhang, Y. Gong, X. Zheng, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, **2002**, 32, 49.
- <sup>9</sup> J. Zhang, S. Yong, *Synth. React. Inorg., Met.-Org., Nano-Met. Chem.*, **2006**, 36, 345.
- <sup>10</sup> J. Zhang, X. Zhao, *Eur. J. Med. Chem.*, **2007**, 42, 286.
- <sup>11</sup> F. D. Rochon, L. M. Gruia, *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 306, 193.
- <sup>12</sup> A. Alvarez-Valdes, J. M. Perez, I. Lopez-Solera, R. Lannegrand, J. M. Contiente, P. Amo-Ochoa, M. J. Camazon, X. Solans, M. Font-Bardia, C. Navarro-Ranninger, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1835.
- <sup>13</sup> K. Tanaka, T. Kunimatsu, J. Shimakura, M. Hanada, *Sumitomo Kagaku (Osaka, Jpn.)*, **2011**, 39.
- <sup>14</sup> Y.-S. Guan, Y. Hu, Y. Liu, *J Gastroenterol Hepatol*, **2006**, 21, 941.
- <sup>15</sup> M. Biosciences. in *MedKoo product information: Miriplatin Vol. Enero 2015* **2014**.
- <sup>16</sup> M. Basato, A. Biffis, G. Martinati, C. Tubaro, A. Venzo, P. Ganis, F. Benetollo, *Inorg. Chim. Acta*, **2003**, 355, 399.
- <sup>17</sup> L. Rigamonti, C. Manassero, M. Rusconi, M. Manassero, A. Pasini, *Dalton Trans.*, **2009**, 1206.

- <sup>18</sup> E. S. F. Ma, W. D. Bates, A. Edmunds, L. R. Kelland, T. Fojo, N. Farrell, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5651.
- <sup>19</sup> A. G. Quiroga, J. M. Perez, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, N. Farrell, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 224.
- <sup>20</sup> G. H. Bulluss, K. M. Knott, E. S. F. Ma, S. M. Aris, E. Alvarado, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, **2006**, *45*, 5733.
- <sup>21</sup> F. J. Ramos-Lima, A. G. Quiroga, J. M. Perez, M. Font-Bardia, X. Solans, C. Navarro-Ranninger, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2003**, 1591.
- <sup>22</sup> F. J. Ramos-Lima, A. G. Quiroga, B. Garcia-Serrelde, F. Blanco, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 2194.

**Capítulo 4.**  
**Complejos de platino(IV)**



En los últimos años, el estudio de complejos de platino(IV) ha cobrado una gran relevancia en el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales, que sean capaces de superar las limitaciones del cisplatino y sus análogos. En este capítulo se presenta la síntesis, caracterización, actividad citotóxica, estudio del potencial de reducción y mecanismo de reducción, de complejos de platino(IV) de fórmula general *trans*-PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>) (Figura 4.1).

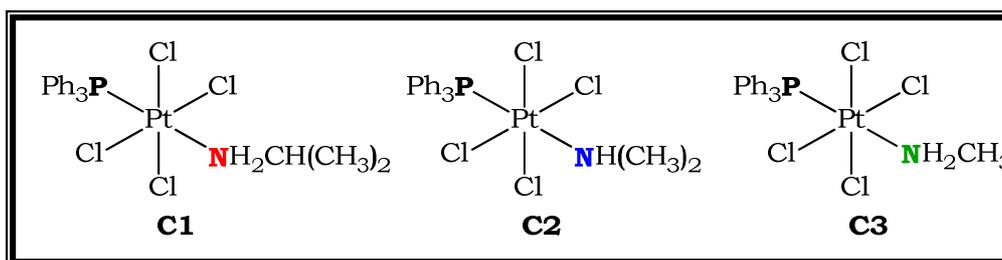


Figura 4.1. Complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)].

#### **4.1 Introducción**

Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, los fármacos basados en platino son muy eficaces como anticancerígenos y ampliamente utilizados en clínica.<sup>1</sup> Los complejos de platino(II) tienen estructura plano cuadrada y mediante su unión covalente al ADN, provocan la distorsión de su estructura, impidiendo la replicación celular, lo que da inicio a la cascada apoptótica que concluye con la muerte celular.<sup>2</sup> Las reacciones secundarias de estos fármacos, su acumulación en el sistema y el desarrollo de resistencia, han hecho que gran parte de los esfuerzos científicos se hayan enfocado hacia el diseño y estudio de otro tipo de complejos de platino, menos reactivos frente a proteínas y biomoléculas, que además, resulten ser más selectivos.

Los complejos de platino(IV) constituyen una buena alternativa, ya que como veremos se emplean como profármacos y de hecho, la actividad anticancerígena de estos depende en gran parte de su precursor de Pt(II).<sup>3-4</sup> Entre las varias ventajas que ofrecen, se encuentran: 1) una suficiente estabilidad para ser administrados por vía oral, ya que la configuración electrónica  $d^6$  de bajo espín del Pt(IV), hace a estos complejos

prácticamente inertes y resistentes a la hidrólisis por los jugos gástricos,<sup>5</sup> 2) una mayor estabilidad que provocaría menores efectos secundarios y 3) una susceptibilidad a modificaciones estructurales a través de los ligandos axiales que se puede utilizar, para mejorar sus propiedades farmacológicas.<sup>6</sup>

#### 4.1.1 Complejos de platino(IV) en clínica

Los complejos de platino(IV) han alcanzado diferentes fases en los ensayos clínicos. A continuación, se explican algunos de los ejemplos más desarrollados y los diseños más importantes (Figura 4.2).

Los primeros compuestos de Pt(IV) en clínica fueron complejos con aminas en posición *cis* como: el tetraplatino (*cis*-[PtCl<sub>4</sub>(DACH)]), que mostró resultados prometedores en triadas clínicas, pero fue abandonado durante la fase I, ya que su uso estaba asociado con una severa neuropatía.<sup>7-8</sup> El iproplatino (*cis,trans,cis*-(dicloro-dihidroxo-diisopropilamina) platino(IV)) alcanzó los ensayos de fase III, pero nunca fue registrado, ya que resultó ser menos activo que el carboplatino.<sup>9-11</sup> El oxoplatino (*cis,cis,trans*-(diamino-dicloro-dihidroxo) platinum(IV)) mostró buena actividad citotóxica en diferentes líneas celulares, incluso en la mayoría de los casos mejor que el cisplatino, pero algunos estudios *in vivo* mostraron que producía necrosis en los túbulos distales de los riñones.<sup>12</sup>

En septiembre de 2006, GPC Biotech había anunciado resultados muy positivos para el satraplatino (*trans,cis,cis*-bis(acetato)amino (ciclohexilamino)dicloro platino(IV)) y la prednisona, contra el cáncer de próstata refractario y llegó a fase III, los estudios han continuado en algunos países y se han logrado grandes avances.<sup>13-14</sup>

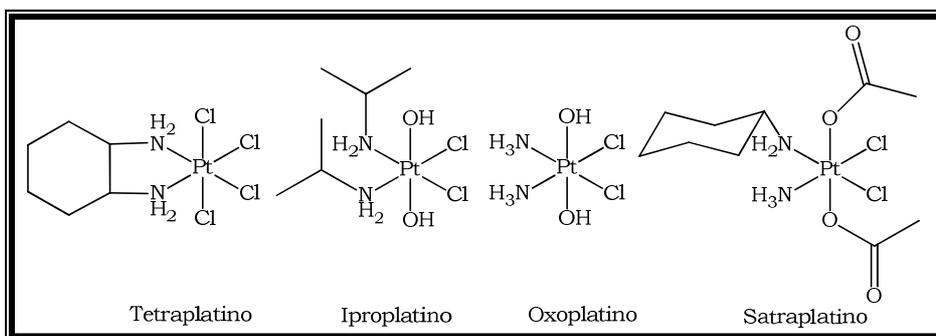


Figura 4.2. Complejos de Pt(IV) con aminas en posición *cis* que han sido probados en clínica.

Estudios preclínicos de complejos de Pt(IV), derivados de LA-12 (*trans,cis,cis*-bis-(acetato)-adamantilamina-(amina) dicloro platino(IV)) muestran resultados prometedores, tanto en plasmocitoma murino ADJ/PC6, como en carcinoma de ovario humano (células A2780), lo que indica que este compuesto tiene una mayor actividad antitumoral *in vivo* que el propio cisplatino o el satraplatino, con una menor toxicidad general.<sup>15</sup>

También se hicieron ensayos clínicos con complejos de Pt(IV) con ligandos aminas en posición *trans*, por ejemplo: con JM335 (*trans,trans,trans*-[PtCl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>2</sub>)(NH<sub>3</sub>))] que mostró una actividad *in vitro* comparable al *cis*-DDP, superando las expectativas en algunas células con resistencia adquirida.<sup>16</sup> Igualmente, varios de los complejos con isomería *trans* mostraron una significativa actividad antitumoral *in vivo*, en el modelo murino de plasmocitoma subcutáneo ADJ/PC6, la mayoría eran complejos de platino(IV) con ligandos axiales hidroxilo, y sólo uno de los complejos tenía ligandos etil-carboxilato axiales. Mientras que, sus homólogos tetracloruro de Pt(IV) resultaron inactivos (Figura 4.3).<sup>17</sup>

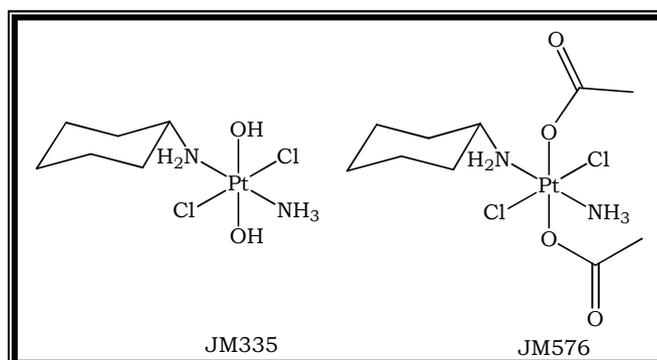


Figura 4.3. Algunos complejos *trans* de platino(IV) con actividad antitumoral.

El gran desarrollo del estudio de los complejos de Pt(IV), se basa en aprovechar las ventajas que ofrece la versatilidad de este centro metálico, para dar un efecto sinérgico con los ligando axiales, que pueda potenciar la actividad tumoral y para emplear nuevas perspectivas con el uso de nanoestructuras,<sup>18</sup> que sirvan como medio de transporte, para focalizar la acción del fármaco.

#### 4.1.2 Antecedentes en la síntesis de complejos de platino(IV)

Los complejos de platino(IV) se preparan por oxidación del complejo plano cuadrado de platino(II), usando peróxido de hidrógeno o cloro (Figura 4.4). Estos complejos de Pt(IV) son de configuración  $d^6$ , típicamente octaédricos, dando como resultado la expansión de la esfera de coordinación en las posiciones axiales por los grupos hidroxilo o cloruro. En particular, los grupos hidroxilo pueden ser modificados a grupos carboxilatos, permitiendo así la preparación de una amplia gama de compuestos con diferentes ligandos axiales.<sup>19-22</sup> La estructura octaédrica de los complejos de Pt(IV), los hace inertes frente a la sustitución, por lo que las reacciones con nucleófilos biológicos, como cisteína y metionina, son extremadamente lentas.<sup>23</sup>

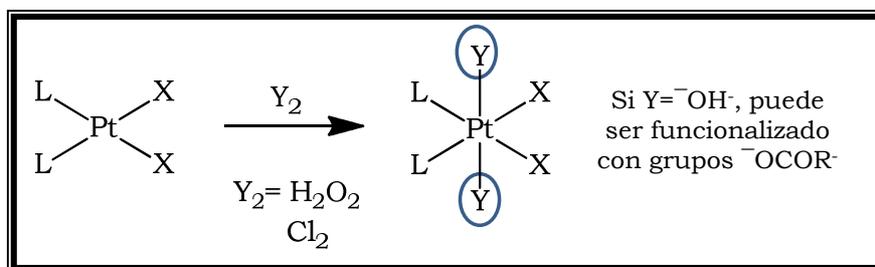


Figura 4.4. Síntesis de complejos de platino(IV).

El mecanismo de oxidación de complejos de platino(II) con peróxido de hidrógeno o cloro, tiene importantes implicaciones en la estructura final de los productos aislados. Estudios de oxidación de este tipo de complejos, usando  $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$  y/o  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  revelaron, que sólo uno de los ligandos hidroxilo del producto de platino(IV), proviene del peróxido de hidrógeno marcado; y en consecuencia el otro ligando hidroxilo proviene del agua.<sup>24</sup> Recientemente, Natile y colaboradores<sup>25</sup> han investigado la oxidación del complejo *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(1,4-DACH)] con Cl<sub>2</sub> en diferentes disolventes. Mediante

RMN, lograron identificar un intermedio correspondiente a la coordinación al Pt(IV) de una molécula de disolvente y de un cloruro:  $[\text{PtCl}_3(\text{cis-1,4-DACH})(\text{solv})]^+$ .<sup>25-27</sup>

En las reacciones de oxidación, el uso de disolventes con capacidad coordinante da lugar a una mezcla de productos, tal como ocurre en la oxidación de Pt(II) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en medios alcohólicos, que conduce a la formación de complejos *trans*-hidroxo-alcoxo de Pt(IV). Un protocolo optimizado para la síntesis de estos complejos, como por ejemplo, el *cis,cis,trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2(\text{OH})(\text{OR})]$ , análogo al cisplatino, utiliza alcohol puro y la oxidación con una disolución acuosa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 50%. El uso de esta disolución de peróxido de hidrógeno al 50% en lugar del 30%, presumiblemente minimiza la cantidad de agua que puede competir con el alcohol para coordinarse al platino.<sup>28-29</sup>

Inicialmente la mayoría de los intentos de preparar profármacos de Pt(IV) con grupos cloruros, hidroxo o carboxilato en las posiciones axiales, giraban en torno a la oxidación de cisplatino o de complejos de Pt(II) con dos ligandos aminas orientados en *cis* y dos ligandos cloruro.<sup>30</sup> Puesto que los ligandos axiales se pierden durante la etapa de activación, estos se pueden utilizar para conferir a los profármacos propiedades farmacológicas favorables.

Todos estos ejemplos han puesto de manifiesto que la síntesis y purificación de los complejos de Pt(IV) es laboriosa, ya que depende de numerosos factores.

#### **4.1.3 Mecanismo de acción de los complejos de platino(IV)**

Como se indicó en la introducción general, se acepta que los complejos de Pt(IV) son profármacos, que se activan *in vivo* por reducción a Pt(II), causada por un agente biológico. La velocidad de reducción, que se asocia normalmente con el potencial de reducción, es uno de los parámetros más importantes para determinar la eficacia de los complejos de Pt(IV) como agentes anticancerígenos.

Hay que considerar muchos otros parámetros en el diseño de estos complejos de Pt(IV). En estas prodrogas, cada uno de los ligandos coordinados al centro metálico ejerce influencia sobre las propiedades fisicoquímicas de los compuestos (Figura 4.5), por lo que en su diseño deben considerarse también parámetros como: estabilidad, lipofilia, etc. El estudio y la modulación de estos parámetros han modificado algunas de las bases de relación estructura-actividad que se habían establecido en la última década,<sup>30</sup> demostrando que la citotoxicidad de estos compuestos depende en gran medida, no sólo del potencial de reducción sino también de la lipofilia y es, en este último aspecto, donde los ligando axiales juegan un papel importante. Un buen ejemplo es el caso del satraplatino cuyos ligandos carboxilatos axiales lo convierten en un excelente candidato para la administración oral.<sup>31</sup>

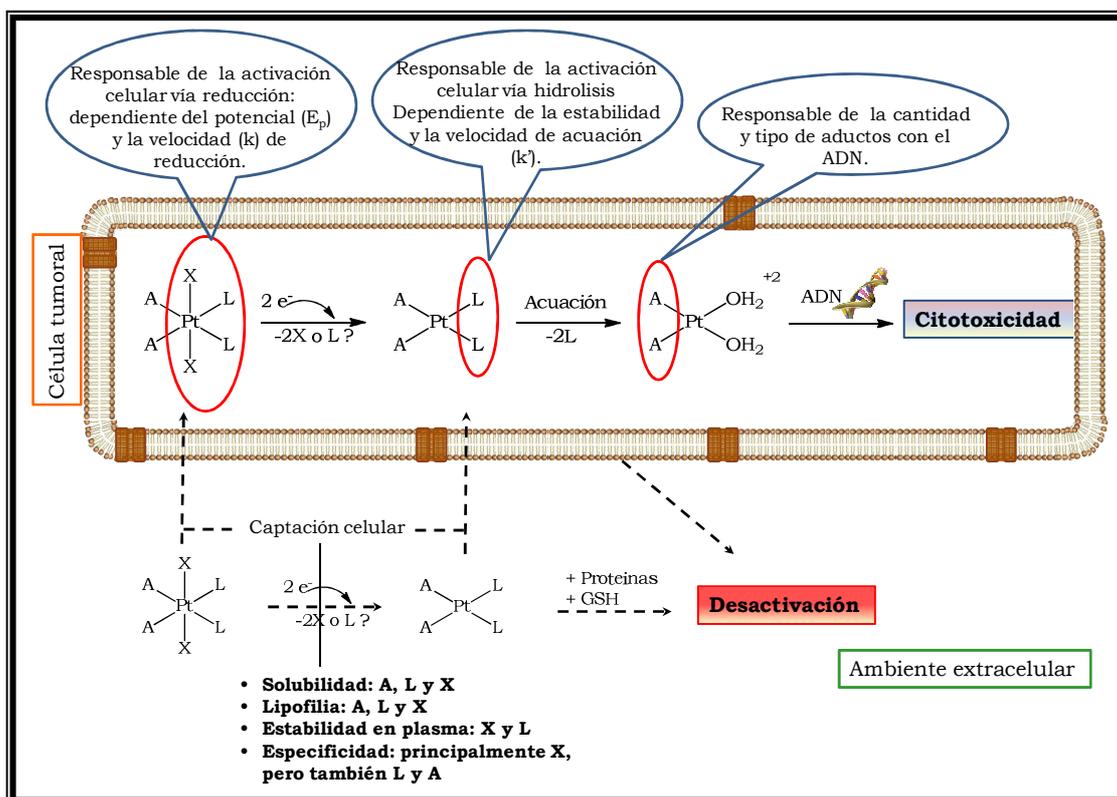


Figura 4.5. Aspectos relevantes en la actividad de los complejos de Pt(IV).

La estabilidad de los complejos de Pt(IV), es una ventaja que debe ser adecuadamente controlada, para que las especies subsistan en el medio biológico el tiempo necesario para minimizar los efectos no deseados, pero estos han de ser suficientemente reactivos como para poder formar la especie activa de Pt(II).

La lipofilia es una característica clave que está directamente relacionada con la capacidad de una molécula para atravesar la membrana celular de forma pasiva.<sup>32</sup> Uno de los parámetros fisicoquímicos más usados para representar la lipofilia molecular es el coeficiente de partición, porque mide la solubilidad diferencial de un compuesto entre el n-octanol (un modelo de la bicapa lipídica de una membrana celular) y agua (el disolvente dentro y fuera de las células).

En un estudio realizado por Osella y colaboradores con diferentes complejos de Pt(IV) establecieron que cuanto más fácil es la reducción de estos complejos y cuanto mayor sea la lipofilidad, mayor será la actividad citotóxica.<sup>33</sup> Estas dos propiedades, que a su vez están relacionadas con la captación celular y la activación por reducción en el citosol, se pueden ajustar a través de la correcta elección de los seis ligandos unidos al centro metálico.<sup>34-35</sup>

#### **4.1.4 Estudios de la etapa de reducción de complejos de platino(IV)**

Para estudiar el comportamiento de los complejos de Pt(IV), y poder establecer algunas pautas en la relación estructura-actividad, se emplean principalmente una serie de ensayos enfocados a la determinación de:

- El potencial y la velocidad de reducción de los complejos de Pt(IV).
- Agentes biológicos capaces de llevar a cabo la reducción de Pt(IV) a Pt(II) en condiciones biológicas.
- El coeficiente de partición Log P/PW (relacionado con la lipofilia de los complejos de Pt(IV)).

##### **4.1.4.1 El potencial y la velocidad de reducción**

Son muchos los estudios que se ha realizado sobre el potencial y la velocidad de reducción de los complejos de platino(IV) y su relación con la actividad antitumoral, sin embargo, la mayoría de estos estudios coinciden en que no se puede establecer una relación inequívoca entre estos parámetros.<sup>36</sup> Por ejemplo, Spaulding y colaboradores,<sup>37</sup> observaron una

relación entre la velocidad de reducción, el potencial redox y la citotoxicidad *in vitro* en un conjunto de complejos de Pt(IV), pero también observaron que esa relación no siempre se cumple en los ensayos *in vivo*.<sup>38</sup> Green y Evans,<sup>39</sup> también llegaron a la misma conclusión después de realizar estudios con el tetraplatino, iproplatino, JM-221 y otros complejos de Pt(IV) y de determinar sus constantes de velocidad de reducción y citotoxicidad en células L1210/0 y en células sensibles al cisplatino.

A pesar de esta dificultad se pueden encontrar tendencias generales. En la tabla 4.A se muestran algunos ejemplos representativos y que permiten explicar, cómo los complejos de Pt(IV) con cloruros como ligandos axiales, son más fáciles de reducir que los complejos análogos con ligandos acetato o hidroxilo. Por lo que los complejos con cloruros como ligandos axiales, formarán la especie de platino(II) de forma más rápida y más fácilmente.<sup>30</sup>

Tabla 4.A. Valores de  $E_p$  para complejos de Pt(IV) con diferentes ligandos axiales.

Complejo	Ligando axial	Potencial de reducción ( $E_p$ (mV))	Referencia
$c$ -[PtCl <sub>4</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	Cl <sup>-</sup>	-260	Hambley 2004
$c,t,c$ -[PtCl <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	-OH	-815	Osella 2010
$c,t,c$ -[PtCl <sub>2</sub> (OCOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	-OCOCH <sub>3</sub>	-565	Osella 2010
$c,t,c$ -[PtCl <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> (ipa) <sub>2</sub> ]	-OH	-730	Spaulding 1998

#### 4.1.4.2 Los agentes reductores

Hoeschele,<sup>40</sup> y posteriormente Khokhar y colaboradores,<sup>41</sup> fueron de los primeros en sugerir que los complejos de platino(IV) se podían reducir *in vivo* a platino(II), y que esta nueva especie es la que posee efectos citotóxicos de manera similar al cisplatino y sus análogos. Esta hipótesis se reforzó, cuando se detectó la presencia de *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] en plasma y orina de pacientes que habían sido tratados con iproplatino (*cis,trans,cis*-dicloro-dihidroxido-diisopropilamina platino(IV)).<sup>42</sup>

### Reducción con ácido ascórbico

El ácido ascórbico, presente en el plasma sanguíneo en una concentración de 50-150  $\mu\text{M}$  y en el citosol en concentración de alrededor de 1 mM,<sup>43-44</sup> es un agente reductor de dos electrones capaz de reducir el Pt(IV) a Pt(II). En el caso de los complejos iproplatino y el oxoplatino, Dabrowiak y colaboradores<sup>45</sup> utilizaron  $^{195}\text{Pt}$ -RMN y otras técnicas para demostrar que el ascorbato (AsA) reduce estos complejos a *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] y cisplatino, respectivamente, y que los productos de reducción pueden unirse a ADN y PM2 (anillos de doble cadena cerrada). Además, algunos estudios<sup>37,39,46</sup> relacionados con el mecanismo de reducción del iproplatino y oxoplatino, con ascorbato, concluyeron que la reducción de estos compuestos de Pt(IV) transcurre a través de un mecanismo de esfera externa, con una constante de velocidad similar a las anteriormente reportadas.<sup>47-49</sup> Después de que el Pt(II) aparezca en la mezcla de reacción, la reducción se acelera en gran medida, por la capacidad de las especies de Pt(II) para servir como catalizadores, para que la reducción de Pt(IV) a Pt(II) sea más rápida.

Pearson<sup>50</sup> y más tarde Bose,<sup>46</sup> estudiaron como especies de Pt(II) catalizaban la reducción de los complejos de Pt(IV) del tipo *c,t,c*-[PtCl<sub>2</sub>X<sub>2</sub>(amina)<sub>2</sub>] donde X = OH<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>. Propusieron la formación de un oxo (o cloruro) dímero puente del tipo AsA-Pt(II)-X-Pt(IV)-X, a través del cual se transfieren los electrones, dando lugar a la formación de un intermedio Pt(IV)-ascorbato, que finalmente se reduce dando *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)<sub>2</sub>] (Figura 4.6). Este mecanismo no es coherente con algunos de los hallazgos encontrados por Gibson y colaboradores,<sup>51</sup> que reseñaremos al final de esta introducción.

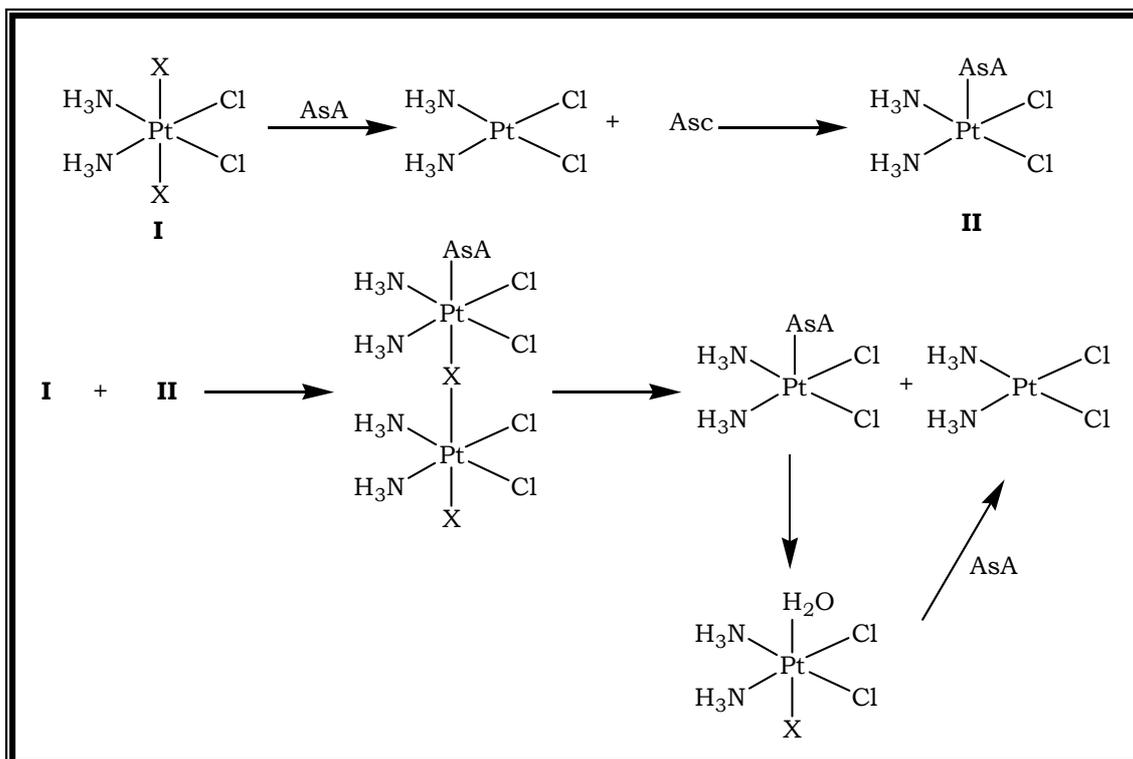


Figura 4.6. Mecanismo de reducción propuesto por Pearson y Basolo.

Muchos de los complejos de platino(IV) publicados en los últimos años, poseen ligandos carboxilato en las posiciones axiales, que probablemente no funcionen como puentes para la transferencia electrónica. Para estos complejos, que tienen potencial de reducción más bajo que sus análogos con cloruro, y que además se reducen más lentamente, se propone un mecanismo de reducción de esfera externa. El grupo de investigación dirigido por Elding,<sup>52</sup> estudió la reducción de JM576 (que posee dos ligandos cloruro en *trans*), y la de JM216 (donde los dos ligandos cloruro están orientados *cis*), y observaron que la reducción para JM576 era tres veces más rápida que para JM216, lo que se atribuyó a la incapacidad del ligando carboxilato para formar grupos puente eficientes, que ayuden a la pérdida de los ligandos en posición *trans* (Figura 4.7). JM576 tiene dos ligandos cloruro en orientación *trans*, que pueden transferir electrones vía esfera interna de forma más rápida, que la transferencia vía esfera externa necesaria en la reducción de JM216.

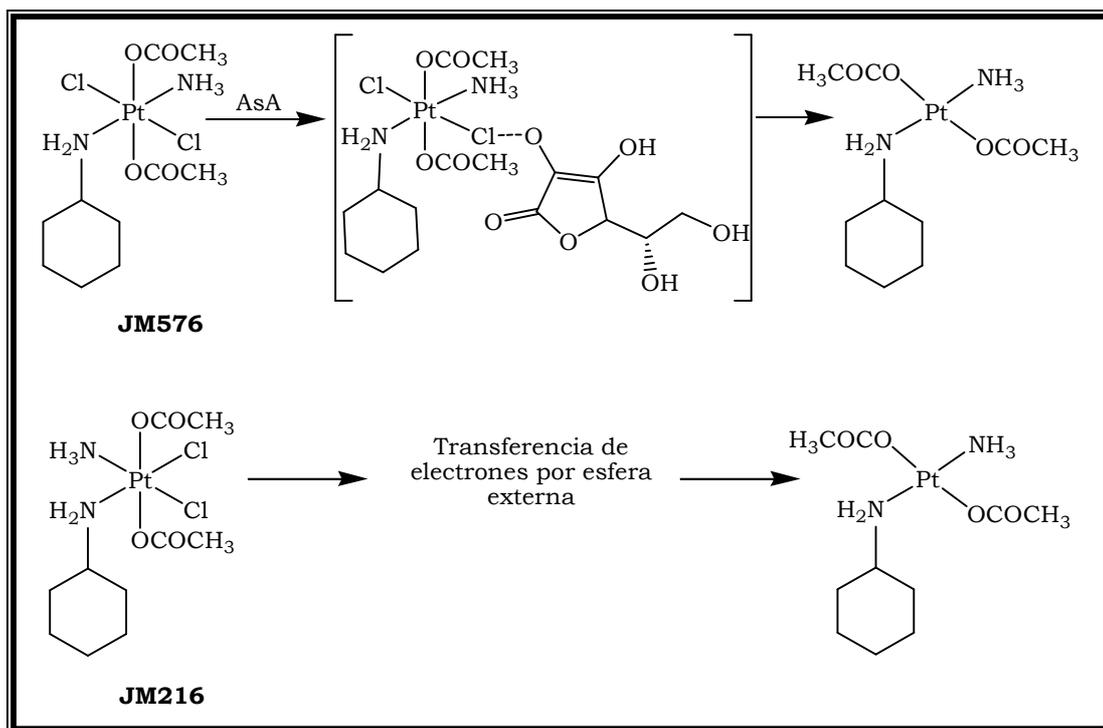


Figura 4.7. Mecanismos de esfera interna y esfera externa propuestos por Elding.

### Reducción con GSH

El glutatión (GSH) es un agente reductor de un electrón que es capaz de reducir el Pt(IV) a Pt(II), la naturaleza de los productos de reducción producidos por el GSH ha sido objeto de numerosas investigaciones.<sup>53</sup> La concentración típica del GSH, es de aproximadamente 2 mM en el citosol y de 850  $\mu$ M en sangre.<sup>54</sup> Bose y colaboradores<sup>55</sup> han utilizado una gran variedad de técnicas físicas para demostrar que el GSH reduce rápidamente iproplatino, para producir *cis*-di(isopropilamina)cloro-glutationato platino(II), que presenta el grupo tiolato de una molécula de GSH coordinado al Pt(II). Debido a que este tipo de complejo no podría tener una interacción 1,2-intracatenaria con el ADN, se sugirió que el producto de la reducción podría tener otras dianas biológicas distintas.<sup>56</sup>

La reducción de los complejos de platino(IV) con GSH, a través de la formación de puentes haluro de esfera interna, se ha postulado sin que se observen los productos intermedios (Figura 4.8). Para complejos de Pt(IV) con ligandos cloruro en posición *trans*, el mecanismo de reducción puede ser considerado como un ataque electrofílico, por el ligando cloruro

altamente polarizado del complejo Pt(IV) donde el grupo tiol conduce a la formación de un puente intermedio.<sup>57</sup>

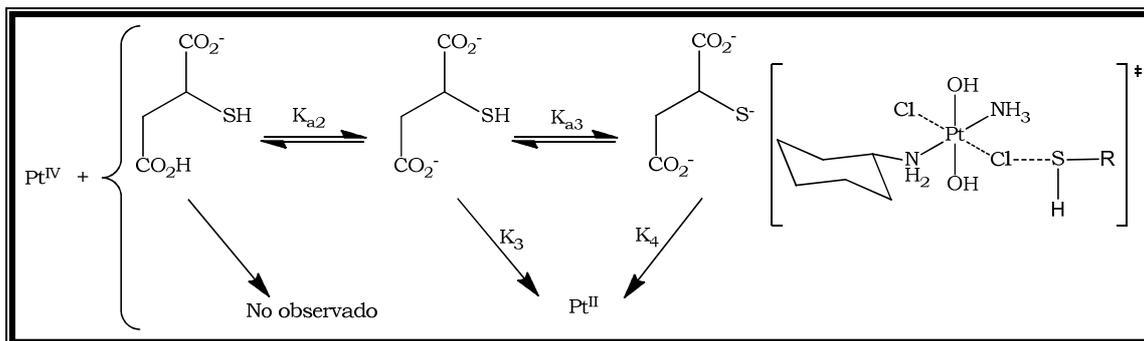


Figura 4.8. Modelo de la reducción de JM335 con GSH y su intermedio.

Un estudio sobre la reducción de los isómeros *cis* y *trans* del complejo [PtCl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>2</sub>)(NH<sub>3</sub>)] (JM149 y JM335 respectivamente), permitió observar que el isómero *cis* (JM149) no podía reducirse con GSH, mientras que el isómero *trans* (JM335) si formaba la especie de Pt(II) correspondiente.<sup>52</sup>

Otros estudios<sup>58</sup> han comparado el poder reductor de diferentes agentes reductores, determinando el siguiente orden decreciente: GSH > L-Cys > L-Met, donde L-Met es el reductor menos potente. También se ha estudiado el efecto de la acidez de la disolución sobre la velocidad de reducción, a valores de pH alto, el proceso es mucho más rápido, debido a la fácil formación del intermedio puenteado, con la forma desprotonada de los tioles.

#### 4.1.5. Propuestas más recientes en el estudio del mecanismo de reducción de platino(IV)

Desde hace tiempo muchos autores han cuestionado el mecanismo general de acción de los complejos de Pt(IV). Recientemente, una serie de estudios demostraron que la composición de los productos de Pt(II) depende de la naturaleza del agente reductor.<sup>6,51,55,59</sup> Además, la cinética intracelular del Pt(IV) y su reducción puede depender, tanto del tipo de células,<sup>60</sup> como de los ligandos que definen la esfera de coordinación del complejo.<sup>61</sup>

En este sentido, Gibson y colaboradores,<sup>60</sup> estudiaron la reducción del complejo *cis,trans,cis*-[PtCl<sub>2</sub>(<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(amina)] por monitorización de la reacción mediante RMN 2D [<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C] HSQC e identificaron que, no sólo se observaba la formación del producto de reducción por pérdida de los ligandos axiales (acetato), sino que además habían otros productos de Pt(II) que conservaban alguno de estos ligandos, como por ejemplo la especie [PtCl(<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)(NH<sub>3</sub>)(amina)]. Así, la pérdida tanto de ligandos axiales y/o ecuatoriales pueden dar paso a reacciones de hidrólisis, que también producirían complejos activos de Pt(II).

El grupo de Wong<sup>62</sup> realizó otro tipo de estudios, con complejos como el *cis,trans,cis*-[PtCl<sub>2</sub>(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], que le llevaron a sugerir una eliminación reductora por tioles o tioéteres. Dicha reducción se produce a través de la formación de un puente entre los ligandos acetatos y el azufre que facilita la transferencia de electrones. En este trabajo se observó que los tioéteres son unos reductores menos potentes que los tioles y que pueden incluso llegar a coordinar en la especie final de Pt(II).

En consecuencia, el mecanismo de acción de los complejos de Pt(IV), puede verse considerablemente afectado por múltiples aspectos, lo que hace difícil establecer pautas inequívocas, sobre su relación estructura-actividad.

## 4.2 Discusión de resultados

### 4.2.1 Síntesis de los complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)PPh<sub>3</sub>]

#### 4.2.1.1 Síntesis de complejos de partida *trans*-Pt(II)PPh<sub>3</sub>

Para llevar a cabo la síntesis de los complejos *trans* de Pt(IV), primero fue necesaria la preparación de los complejos de partida de Pt(II), cuya síntesis se resume en la figura 4.9, y que ha sido publicada previamente por nuestro grupo de investigación.

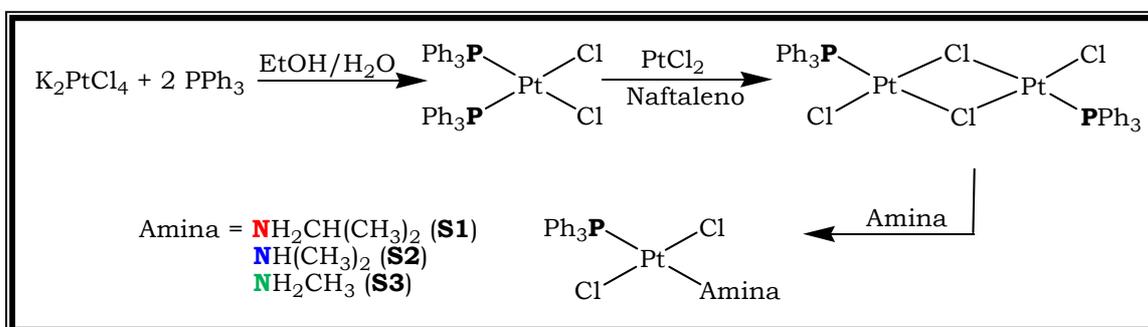


Figura 4.9. Esquema de síntesis de los complejos de partida.

Todos los complejos de partida fueron caracterizados por las técnicas espectroscópicas comunes (<sup>1</sup>H-RMN, <sup>31</sup>P-RMN, etc.).

#### 4.2.1.2 Síntesis de complejos de platino(IV)

Una vez sintetizados los complejos de Pt(II) de estructura *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)], se procedió a la oxidación de los mismos empleando una corriente de cloro gas (Figura 4.10). Cada uno de los complejos obtenidos se caracterizó por diferentes técnicas espectroscópicas y los resultados obtenidos para cada uno de ellos se discuten a continuación.

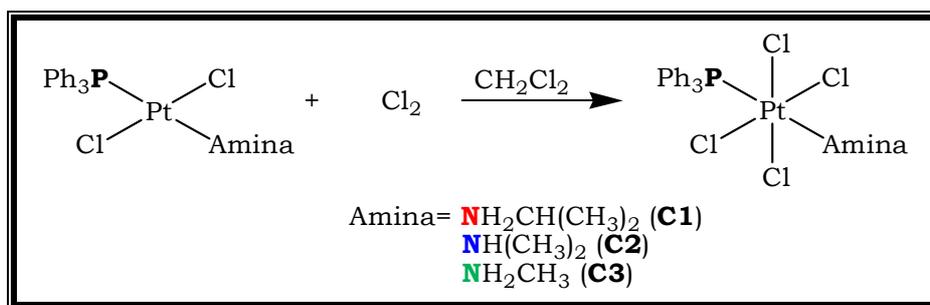


Figura 4.10. Síntesis de complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)].

Los nuevos complejos de fórmula general *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)], se sintetizaron a partir de una disolución del correspondiente complejo análogo de Pt(II) en diclorometano, a través de la cual se hace pasar una corriente de cloro gas. En todos los casos, la disolución pasa de un color amarillo pálido a una coloración amarilla intensa y aunque el cambio es casi inmediato, es necesario prolongar la reacción durante 2 h. El tiempo de reacción es un aspecto importante, ya que tiempos de reacción muy largos, no favorecen la formación del complejo deseado, y dan paso a la formación varios productos de especiación, que finalmente complican el proceso de purificación.

Los complejos sintetizados, *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (**C1**), *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(dma)(PPh<sub>3</sub>)] (**C2**) y *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(ma)(PPh<sub>3</sub>)] (**C3**), son los únicos ejemplos existentes en la bibliografía, de complejos de Pt(IV) monoméricos, que contienen fosfina y cloruro como ligandos, y ningún enlace metal-carbono. Los escasos ejemplos similares encontrados en la bibliografía, indican que los compuestos son bastante inestables en disolución, mientras que nuestros complejos de Pt(IV) son estables en estado sólido y en disolución (incluso en DMSO), lo que nos permite hacer un estudio detallado de su estabilidad, su estructura y comprobar su citotóxicidad.

Los complejos **C1**, **C2** y **C3** se caracterizaron por diferentes técnicas espectroscópicas, las variaciones observadas de <sup>31</sup>P-RMN, <sup>195</sup>Pt-RMN se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4.B), donde podemos observar los datos de los complejos de Pt(IV) con respecto a los productos de partida de Pt(II).

Tabla 4.B. Comparación de los desplazamientos químicos en  $^{31}\text{P}$ -RMN y  $^{195}\text{Pt}$ -RMN de los complejos de Pt(IV) y Pt(II).

Complejos	$^{31}\text{P}$ -RMN (ppm)	$^{195}\text{Pt}$ -RMN (ppm)
<i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (ipa)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>C1</b> )	0,79	-1479,2
<i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (dma)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>C2</b> )	2,11	-1528,5
<i>trans</i> -[PtCl <sub>4</sub> (ma)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>C3</b> )	2,07	-1583,0
<i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (ipa)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>S1</b> )	4,64	-3792,7
<i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (dma)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>S2</b> )	4,42	-3837,7
<i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (ma)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>S3</b> )	4,83	-3152,2

El RMN de  $^{195}\text{Pt}$  es una de las técnicas más útiles, para identificar y monitorizar la oxidación de estas especies. Los complejos de Pt(II) muestran desplazamientos a campo bajo (alrededor de -3000 ppm), mientras que los análogos de Pt(IV) presentan señales a campo alto (entorno a -1500 ppm). Esta misma tendencia, aunque mucho más marcada se observó en complejos de Pt(IV) de fórmula general *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(amina)(amina')], que aparecen a 750 ppm frente a los valores de -2200 ppm de sus análogos de Pt(II).

Los complejos **C1** y **C2** se caracterizaron por difracción de rayos X, sólo cinco estructuras cristalinas de compuestos octaédricos de Pt(IV) con ligando fosfina han sido reportadas según la Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC).<sup>63-68</sup> En las estructuras cristalinas de los complejos **C1** y **C2** se encontró, que las distancias de los enlaces Pt-Cl (2,309 a 2,330 Å) son similares a las distancias publicadas previamente para los complejos de Pt(IV), citados en la bibliografía con valores entre 2,311 a 2,444 Å. Las distancias Pt-P también se encuentran dentro del rango de los valores reportados (2,302 a 2,364 Å), aunque en nuestro caso (Pt-P: 2,350 y 2,342 para **C1** y **C2**, respectivamente) tienden a estar cerca de los valores más altos, probablemente debido al volumen del ligando PPh<sub>3</sub>.

El empaquetamiento de estas estructuras, muestra la formación de sintones e interacciones débiles, que para el complejo **C1** dan paso a la formación de una red tridimensional hexaconectada con dos sintones y cuatro interacciones débiles (Figura 4.11A), mientras que para el complejo

**C2**, se forma una red tridimensional uninodal septaconectada (Figura 4.112B).

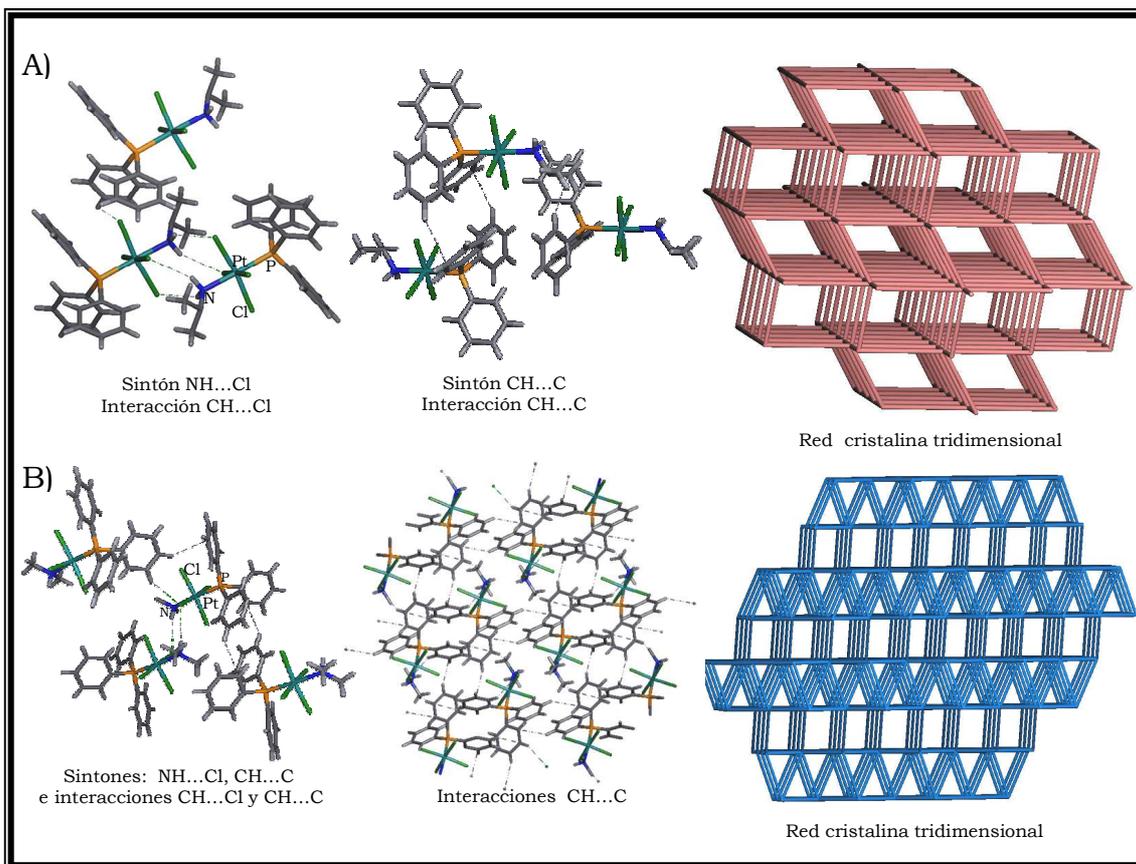


Figura 4.11. Sintones, interacciones débiles y red cristalina para A) complejo **C1** y B) complejo **C2**.

#### 4.2.2 Estudio de la actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]

Se llevó a cabo una evaluación de la actividad citotóxica de los complejos **C1**, **C2**, **C3** y de sus precursores de Pt(II),<sup>1</sup> en células MG-63 de osteosarcoma humano, donde el complejo **C3** mostró ser el menos activo de esta familia de complejos de Pt(IV) (Tabla 4.C).

<sup>1</sup> Gracias a la colaboración de la Prof Carmen Navarro-Ranninger con Ignacio León en la unidad de biología celular del Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay.

Tabla 4.C. Estudios de la actividad antitumoral de los complejos de Pt(IV) y sus precursores en células G-63.

Actividad citotóxica de células G-63 (Osteosarcoma humano)			
Complejos de Pt(IV)	IC <sub>50</sub> (μM)	Complejos de Pt(II)	IC <sub>50</sub> (μM)
<i>t</i> -[PtCl <sub>4</sub> (ipa)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>C1</b> )	33±4,9	<i>t</i> -[PtCl <sub>2</sub> (ipa)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>S1</b> )	18±2,0
<i>t</i> -[PtCl <sub>4</sub> (dma)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>C2</b> )	21±2,9	<i>t</i> -[PtCl <sub>2</sub> (dma)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>S2</b> )	31±4,4
<i>t</i> -[PtCl <sub>4</sub> (ma)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>C3</b> )	84±4,6	<i>t</i> -[PtCl <sub>2</sub> (ma)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>S3</b> )	31±1,9
		Cisplatino	38±1,5

Los complejos **C1** y **C2** se han evaluado también en células de melanoma metastásico (A375), células de carcinoma de pulmón (NCI-H460) y adenocarcinoma de colon (HCT116, normal (+/+)) y con ausencia de p53 (-/-). Los valores de IC<sub>50</sub> para estos dos complejos y para el cisplatino se muestran en la figura 4.12.

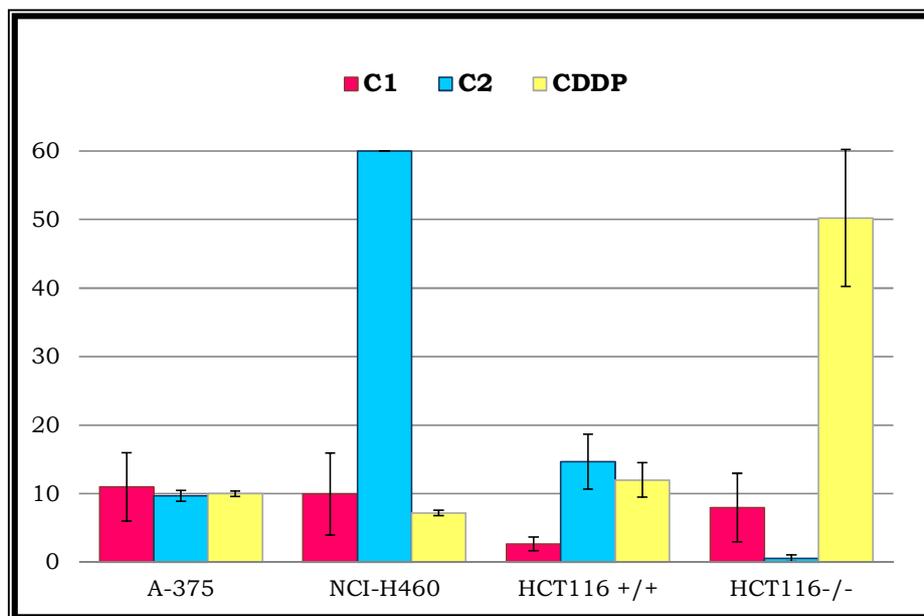


Figura 4.12. Actividad citotóxica en valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los complejos **C1**, **C2** y CDDP.

En general, se observó que los valores de IC<sub>50</sub> para los complejos **C1** y **C2**, son muy similares a los valores mostrados por el cisplatino en células de melanoma metastásico (A375), mientras que en las células tumorales de carcinoma de pulmón (NCI-H460), sólo resulta activo el complejo **C1**.

Como ya se ha mencionado anteriormente, muchos de los complejos *trans* de platino, han mostrado ser efectivos en células tumorales que son resistentes al cisplatino, debido a la supresión del gen p53. Con el propósito de evaluar la efectividad de nuestros complejos de Pt(IV), en células resistentes a CDDP, se determinó la actividad citotóxica en dos líneas celulares isogénicas, de adenocarcinoma de colon: HCT116+/+ (célula normal) y HCT116-/- (célula que carece de p53). Los complejos de Pt(IV) muestran mayor actividad antitumoral, especialmente en las células resistentes a cisplatino (HCT116 -/-) con valores de IC<sub>50</sub> de 8,0 y 0,6 μM para **C1** y **C2**, respectivamente. En las otras células HCT116+/+ los valores de citotoxicidad de nuestros complejos de Pt(IV), están en el mismo orden del valor obtenido por el cisplatino, aunque nuevamente en este caso, el complejo **C1** (con isopropilamina) es el más efectivo.

Otras líneas celulares (osetosarcoma (SAOS-2), cáncer de mama (T47D) y glioblastoma humano (SF268)) también fueron evaluadas, pero los resultados aunque buenos, no fueron mejores que los mostrados por el cisplatino.

#### **4.2.3 Estudio del potencial de reducción de los complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]**

Los complejos de platino(IV), han sido diseñados pensando que puedan funcionar como prodrogas y que su principio activo sea el correspondiente precursor de Pt(II), que conocíamos y que mostraban tener actividad citotóxica. Se seleccionaron los complejos activos **C1** y **C2**, ya que eran los más citotóxicos y se evaluó su potencial de reducción.

La voltametría cíclica (VC) se utiliza para medir el potencial de reducción (Ep). La reducción de Pt(IV) es un proceso de dos electrones irreversibles, que implica la pérdida de los ligandos axiales y una vuelta a la geometría plano cuadrada del Pt(II). Los voltamogramas obtenidos se muestran en la figura 4.13.

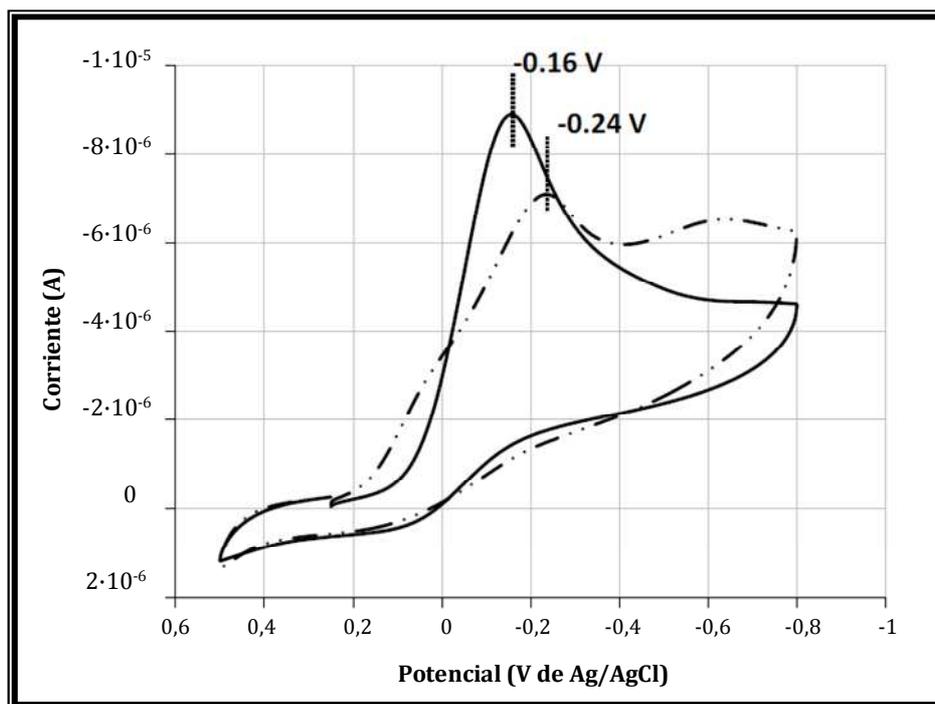


Figura 4.13. Voltametría a cíclica de los complejos de Pt(IV), **C1** (línea sólida) y **C2** (línea discontinua).

En ambos casos la reducción es un proceso irreversible, parece que es más fácil de reducir, el complejo que tiene isopropilamina (**C1**) con un potencial de reducción de  $-160 \text{ mV}$ . En el caso del complejo con dimetilamina (**C2**) el potencial de reducción es de  $-240 \text{ mV}$ , lo que indica que este complejo es ligeramente más difícil de reducir que su análogo con isopropilamina. Tal como refleja la bibliografía,<sup>69</sup> la presencia de los ligandos axiales cloruro hace que el potencial de reducción sea menos negativo, que el de los complejos con  $\text{OH}^-$  por lo que se cumple la tendencia.

Para complejos octaédricos de Pt(IV) con dos ligandos aminas, dos ligandos cloruro en posición ecuatorial y variaciones en los ligandos axiales, tanto los potenciales de reducción, como las velocidades de reducción con moléculas pequeñas (por ejemplo el ascorbato), dependen principalmente de la naturaleza de los ligandos axiales. La tendencia observada en la bibliografía, como indicamos en la tabla 4.A, permite establecer que dentro los grupos axiales, los cloruros son más fáciles de reducir, seguidos por los acetatos y los grupos hidroxilo, por lo que el orden creciente de facilidad para la reducción sería el siguiente:



Esta correlación entre el potencial y la velocidad de reducción, ha guiado el diseño de los complejos de Pt(IV) durante muchos años, ya que se cree que proporciona una manera de predecir y modular la farmacología del profármaco.<sup>61</sup>

Los complejos **C1** y **C2**, mostraron un potencial de reducción mucho menor que otros complejos similares encontrados en la bibliografía (como por ejemplo el tetraplatino  $E_p = -0,26 \text{ V}$ ), pero han demostrado tener buena actividad citotóxica, por lo que debe existir una relación entre el potencial, la velocidad de reducción y la actividad antitumoral.

Un aspecto importante, en el potencial de reducción de estos complejos es que, los profármacos de Pt(IV) no deben ser demasiado estables o difíciles de reducir, ya que no darían paso a la formación de la especie activa de Pt(II) y quizás serían evacuados del organismo de forma intacta, pero tampoco deberán ser muy fáciles de reducir ya que al entrar al medio celular se reducirían a Pt(II) y terminarían por ocasionar los mismos efectos tóxicos que los análogos de cisplatino. Por lo que, debe existir un punto intermedio en el potencial de reducción, que permita al profármaco llegar al blanco de acción y luego dar paso a la formación de la especie activa.<sup>36</sup>

#### **4.2.4 Estudio de la reducción de los complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] con algunos agentes reductores biológicos**

La electroforesis es una técnica ampliamente utilizada, para estudiar la interacción de los complejos de Pt(II) y su unión al ADN, ya que emplea la variación en la movilidad del plásmido superenrollado para describir la platinación del ADN. Algunos autores como Dabrowiak y colaboradores,<sup>6</sup> también han usado la electroforesis en gel de agarosa, para estudiar la reducción de los complejos de Pt(IV).

Inicialmente, si nuestros compuestos son reducidos por alguno de estos agentes, se formará el complejo de Pt(II) por pérdida de dos ligandos

cloruros, estos podrían interactuar con ADN y producir variación en la movilidad del plásmido pBR322 (Figura 4.14).

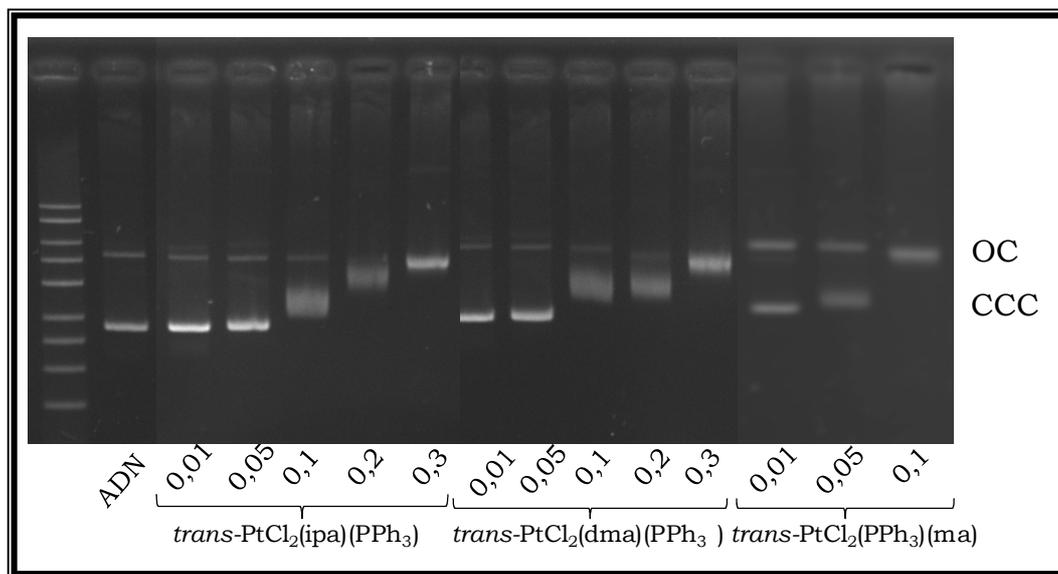


Figura 4.14. Gel de electroforesis en agarosa los complejos de Pt(II),  $trans$ -[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] con pBR322.

Como se puede observar en los resultados de la electroforesis en todos los casos, los complejos de Pt(II) muestran interacción, donde la banda correspondiente a la forma covalente circular cerrada (CCC) disminuye su movilidad, hasta que finalmente llega a confluir con la forma circular abierta (OC). Para el complejo  $trans$ -[PtCl<sub>2</sub>(ma)(PPh<sub>3</sub>)] (**C3**) tan sólo a  $r_i$  0,1 (12  $\mu$ M) se observó el mismo efecto, que el que muestran los complejos  $trans$ -[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (**C1**) y  $trans$ -[PtCl<sub>2</sub>(dma)(PPh<sub>3</sub>)] (**C2**) a  $r_i$  0,3 (36  $\mu$ M), indicando que el complejo de Pt(II) con metilamina interacciona más fácilmente con el plásmido.

Esto confirma lo observado previamente con estos complejos,<sup>70</sup> y nos da indicio sobre el efecto que tienen estos complejos de platino(II), en su interacción con ADN y en particular con pBR322.

Para determinar el comportamiento de los complejos de platino(IV) sintetizados, se decidió estudiar estos complejos frente a agentes reductores que se encuentran en el medio biológico, como es el caso de la GSH y el ácido ascórbico (ASA), en presencia de plásmido. Llevamos a cabo los estudios de movilidad de los aductos por electroforesis en gel de agarosa.

En la figura 4.15, se muestra el gel de agarosa de los complejos de Pt(IV) **C1**, **C2** y **C3** con pBR322, en presencia de GSH, en una relación 1:2 (complejo:GSH) y 24 h de incubación. La movilidad del plásmido, no se ve afectada en ninguna de sus dos formas (OC y CCC), incluso a valores de  $r_i$  muy grandes (carriles 8, 15 y 24 donde  $r_i$  es 0,5) donde no se observa variación en la movilidad del plásmido, por efecto de algún tipo de platinación.

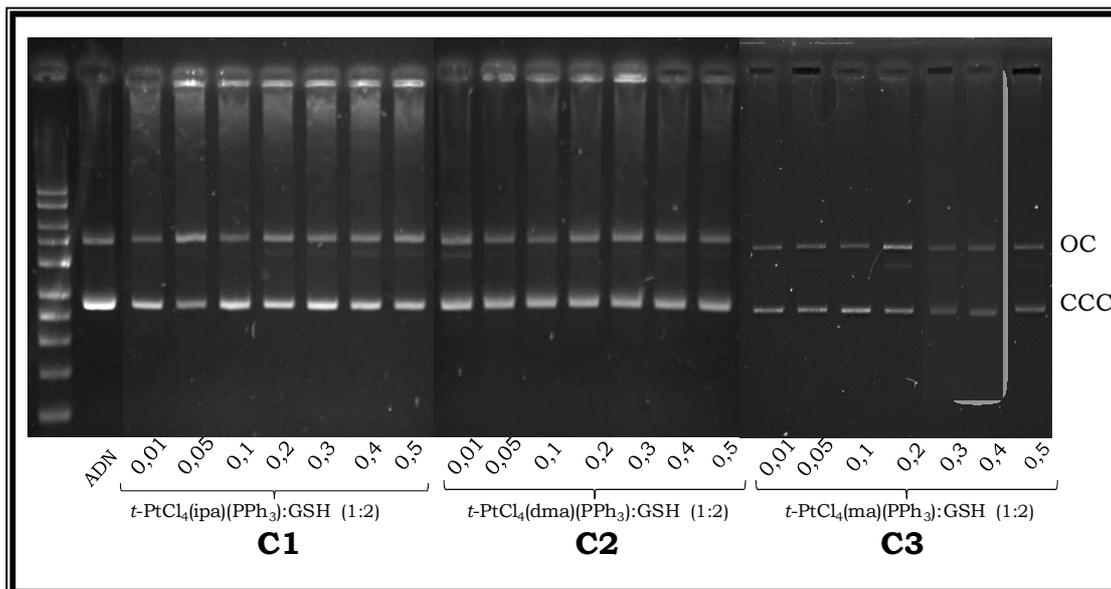


Figura 4.15. Electroforesis en gel de agarosa de los complejos, *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] en presencia de GSH.

Los resultados obtenidos para los complejos de Pt(IV), son muy diferentes a los obtenidos con los complejos de Pt(II). En principio la presencia de GSH debería reducir el Pt(IV) a los respectivos complejos de Pt(II), ya que incluso en un seguimiento por <sup>195</sup>Pt-RMN se observan los productos de reducción a tiempos cortos de reacción (Figura 4.16), pero los resultados de la electroforesis en gel de agarosa no se corresponden con la reducción. Por lo que, en medio biológico esta reducción puede que no se produzca tan rápidamente en presencia de GSH.

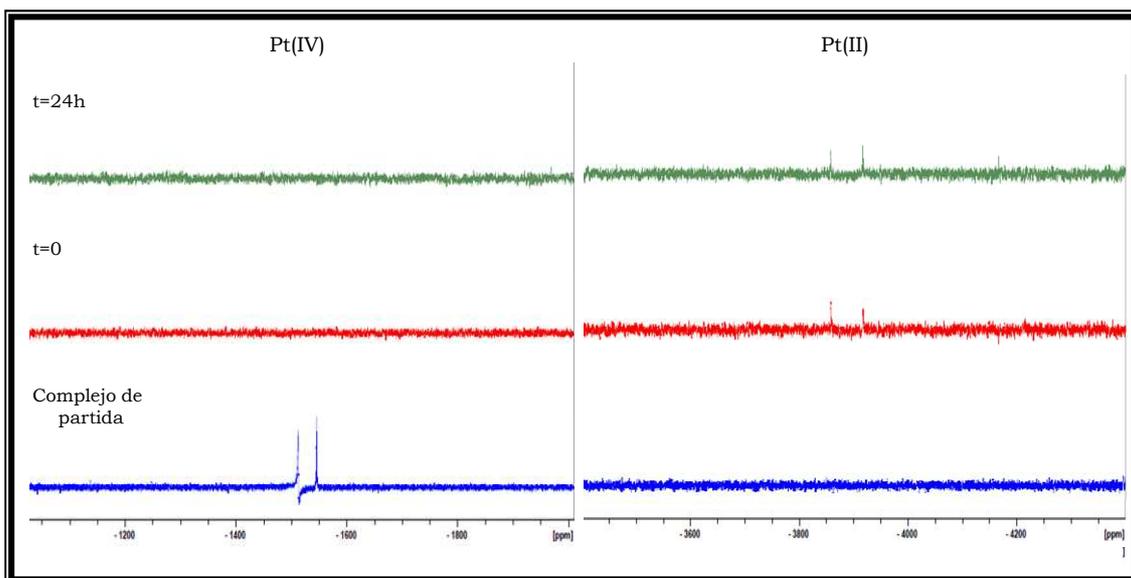


Figura 4.16. Espectro de RMN  $Pt^{195}$  para la reducción del complejo **C2** en presencia de GHS.

Este mismo estudio se realizó con los complejos de Pt(IV), pero empleando ácido ascórbico (ASA), como agente reductor, con una relación complejo:ASA=1:1 (Figura 4.17).

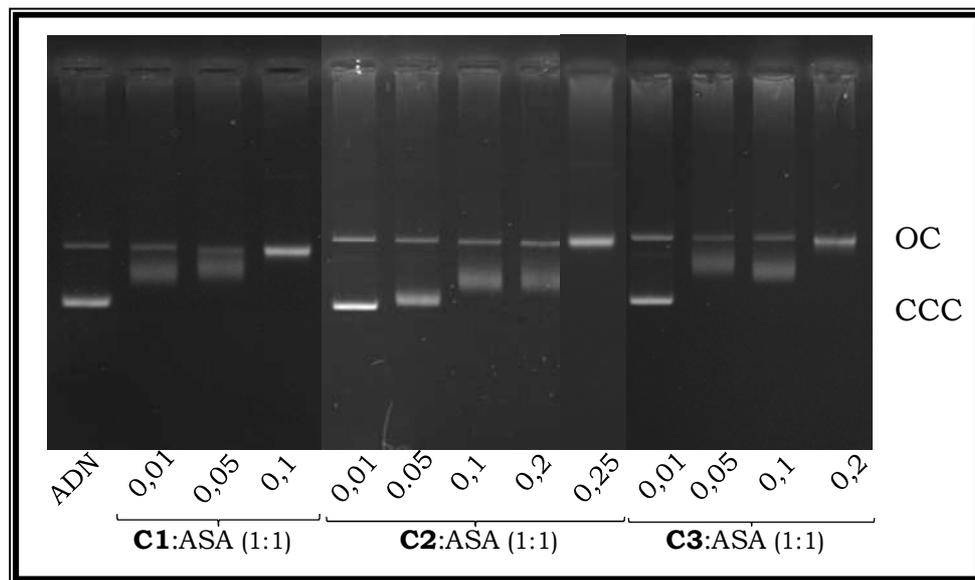


Figura 4.17. Electroforesis en gel de agarosa de los complejos, *trans*- $[PtCl_4(\text{amina})(PPh_3)]$  en presencia de ASA (1:1).

Los resultados obtenidos con el ácido ascórbico como reductor, muestran que en este caso si hay evidencia de reducción, ya que se observó variación en la movilidad electroforética de la forma covalente circular cerrada (CCC), un comportamiento similar al que mostraron los precursores de Pt(II), pero a diferentes relaciones de  $r_1$ .

Estos resultados mostraron, que para estos complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] el AsA resulta un buen agente reductor en presencia del plásmido pBR322, mientras que con GSH se observó reducción de los complejos sólo en disolución, pero cuando el plásmido está presente no hay evidencia de reducción. Por lo que en este caso, la presencia de ADN y las condiciones de estudio parecen tener influencia sobre la reactividad de estos complejos de Pt(IV).

La mayoría de los estudios realizados con estos complejos de Pt(IV) fueron publicados en la revista *Chemical Communications* y ha sido reseñado en artículos de opinión como el de Zijian Guo en *Current Opinion in Chemical Biology*.

### **4.3 Parte experimental**

#### **4.3.1 Disolventes, reactivos y equipos empleados**

La mayoría de los reactivos empleados para la síntesis de los complejos de este capítulo, ya han sido utilizados en capítulos anteriores, adicionalmente, se utilizaron los siguientes reactivos para la generación del cloro gas: Permanganato de potasio (Scharlau), ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich).

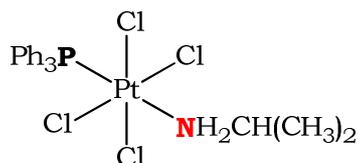
Los equipos utilizados para la caracterización por: RMN, espectrometría de masas, análisis elemental y difracción de rayos X, ya han sido mencionados anteriormente, todos los experimentos fueron realizados en el SIDI-UAM.

#### **4.3.2 Síntesis de los complejos de partida**

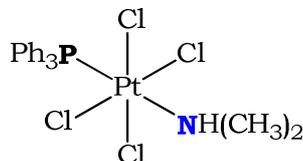
Para la síntesis de los complejos de Pt(IV) fue necesaria la preparación de los complejos análogos de Pt(II) (*trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)], *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(dma)(PPh<sub>3</sub>)] y *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ma)(PPh<sub>3</sub>)] para su posterior oxidación.

#### **4.3.3 Síntesis de los complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]**

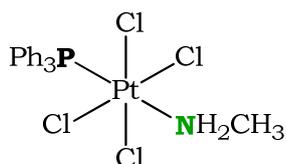
Se pasó una corriente de Cl<sub>2</sub> gas a través de una disolución de complejo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] (donde amina= ipa, dma y ma) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 1,5 h, A continuación, se redujo el volumen de disolvente a presión reducida y se dejó en la nevera durante una noche. Después se dejó evaporar totalmente el disolvente a temperatura ambiente, obteniéndose un sólido de aspecto cristalino.

*trans*-[PtCl<sub>4</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (**C1**)

Sólido amarillo intenso, (52%).  **$\delta$ H** (300,13 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 7,61 (m, 6H, H<sub>orto</sub>), 7,56 (m, 3H, H<sub>para</sub>), 7,49 (m, 6H, H<sub>meta</sub>), 3,72 (sept, 1H, CH<sub>(ipa)</sub>), 1,43 (d, 6H, CH<sub>3(ipa)</sub>,  $J_{H-H}=5,6$  Hz), 4,73 (sa, 2H, NH<sub>2(ipa)</sub>).  **$\delta$ C** (75,47 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 135,7 (d, C<sub>orto</sub>,  $J_{C-P}=8,7$  Hz), 127,7 (d, C<sub>meta</sub>,  $J_{C-P}=12,0$  Hz), 131,9 (d, C<sub>para</sub>,  $J_{C-P}=3,5$  Hz), 46,4 (s, CH<sub>(ipa)</sub>) 23,4 (s, CH<sub>3(ipa)</sub>).  **$\delta$ P** (121,5 MHz; acetona-d<sub>6</sub>) 0,79 ( $J_{P-Pt}=2158,17$  Hz).  **$\delta$ Pt** (64,53 MHz; acetona-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) = -1479,2 (d,  $J_{Pt-P}=2159,43$  Hz). **Análisis elemental CHN**, encontrado: C:38,26%, H:4,02%, N:2,07%. Calculado para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>NCl<sub>4</sub>PPt: C:38,32%, H:3,67%, N: 2,13%.

*trans*-[PtCl<sub>4</sub>(dma)(PPh<sub>3</sub>)] (**C2**)

Sólido amarillo intenso, (64%).  $\delta$ H (300,13 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 7,94 (m, 6H, H<sub>orto</sub>), 7,50 (m, 3H, H<sub>para</sub>), 7,41 (m, 6H, H<sub>meta</sub>), 2,70 (sept, 6H, CH<sub>3(dma)</sub>,  $J_{H-H}=6,4$  Hz), 4,34 (sa, 2H, NH<sub>(dma)</sub>).  **$\delta$ C** (75,47 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 138,5 (d, C<sub>orto</sub>,  $J_{C-P}=9,5$  Hz), 127,6 (d, C<sub>meta</sub>,  $J_{C-P}=13,0$  Hz), 132,1 (d, C<sub>para</sub>,  $J_{C-P}=3,5$  Hz), 41,2 (s, CH<sub>3(ipa)</sub>).  **$\delta$ P** (121,5 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 2,11 ( $J_{P-Pt}=2121,15$  Hz).  **$\delta$ Pt** (64,53 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) -1528,55 (d,  $J_{Pt-P}=2122,3$  Hz). **MS (ESI)**: 608,01 uma [M-Cl]<sup>+</sup>. **Análisis elemental CHN**, encontrado: C:36,71%, H:3,78%, N:2,37%. Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>NCl<sub>4</sub>PPt: C:37,28%, H:3,44%, N: 2,17%.

$$\textit{trans}\text{-}[\text{PtCl}_4(\text{ma})(\text{PPh}_3)] \text{ (C3)}$$


Sólido amarillo intenso, (50%).  $\delta\text{H}$  (300,13 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) 7,93 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{orto}}$ ), 7,60 (m, 9H), 2,72 (3H,  $\text{CH}_3(\text{ma})$ ,  $J_{\text{H-H}}=6.0$  Hz), 4,31 (sa, 2H,  $\text{NH}_2(\text{ma})$ ).  $\delta\text{C}$  (75,47 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) 135,8 (d,  $\text{C}_{\text{orto}}$ ,  $J_{\text{C-P}}=10,0$  Hz), 127,9 (d,  $\text{C}_{\text{meta}}$ ,  $J_{\text{C-P}}=11,4$  Hz), 132,1 (d,  $\text{C}_{\text{para}}$ ,  $J_{\text{C-P}}=2,7$  Hz), 28,8 (s,  $\text{CH}_3(\text{ma})$ ).  $\delta\text{P}$  (121,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) 2,07 ( $J_{\text{P-Pt}}=2153,23$  Hz).  $\delta\text{Pt}$  (64,53 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ;  $\text{Na}_2\text{PtCl}_6$ ) -1583 (d,  $J_{\text{Pt-P}}=2155,16$  Hz). **MS (ESI)**: 629,98 uma  $[\text{M}+\text{H}]$ . **Análisis elemental CHN**, encontrado: C:38,39, H:3,86, N:1,78. Calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{NCl}_4\text{PPt}\cdot 1,4 \text{CH}_3\text{COCH}_3\cdot 0,3\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : C:38,30%, H:3,97%, N: 1,90%.

#### 4.3.3.1 Estructuras de rayos X

##### Complejo *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (C1)

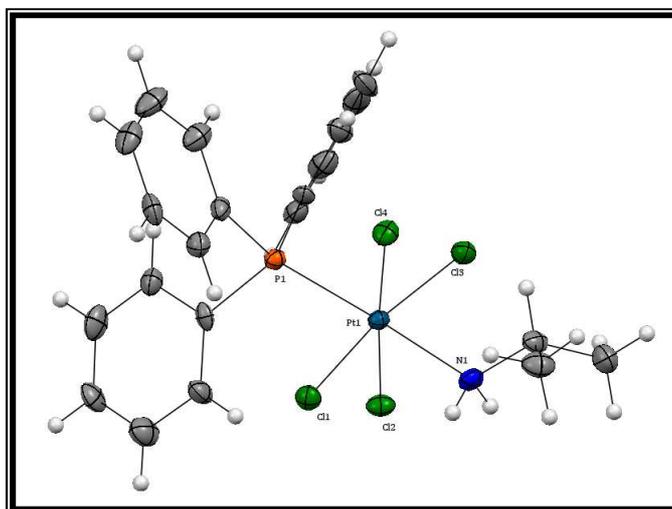


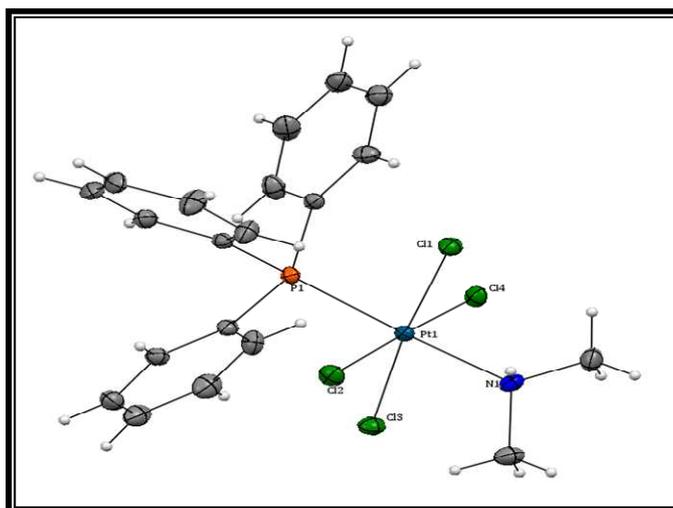
Figura 4.18. Estructura cristalina del complejo **C1**.

Tabla 4.D. Longitudes de enlace seleccionadas para el complejo **C1**.

Longitudes de enlace seleccionadas (Å)			
Pt1-Cl1	2,332(2)	Pt1-Cl3	2,315(2)
Pt1-Cl2	2,328(2)	Pt1-Cl4	2,319(2)
Pt1-N1	2,148(5)	Pt1-P1	2,350(2)

Tabla 4.E. Datos cristalográficos del complejo **C1**.

Fórmula química	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>4</sub> NPt
Peso molecular	656,26
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Tamaño del cristal	0,10 x 0,19 x 0,22 mm
Apariencia del cristal	Amarillo pálido prismático
Sistema cristalino	Triclinico
Grupo espacial	P-1
Dimensiones de la celda unidad	$a = 9,0349(8) \text{ \AA}$ $\alpha = 72,771(5)^\circ$ $b = 9,8658(9) \text{ \AA}$ $\beta = 75,680(4)^\circ$ $c = 4,1981(13) \text{ \AA}$ $\gamma = 71,733(4)^\circ$
Volumen	1131,09(18) Å <sup>3</sup>
Z	2
Densidad calculada	1,927 mg/cm <sup>3</sup>
Coefficiente de absorción	6,754 mm <sup>-1</sup>
F(000)	632

**Complejo *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(dma)(PPh<sub>3</sub>)] (C2)**Figura 4.19. Estructura cristalina del complejo **C2**.Tabla 4.F. Longitudes de enlace seleccionadas para el complejo **C2**.

Longitudes de enlace seleccionadas (Å)			
Pt1-Cl1	2,3274(8)	Pt1-Cl2	2,3267(9)
Pt1-Cl3	2,3098(8)	Pt1-Cl4	2,3138(8)
Pt1-N1	2,197(3)	Pt1-P1	2,3429(9)

Tabla 4.G. Datos cristalográficos del complejo **C2**.

Fórmula química	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>4</sub> NPt
Peso molecular	644,25
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Tamaño del cristal	0,20 x 0,24 x 0,32 mm
Apariencia del cristal	Amarillo pálido prismático
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P-1
Dimensiones de la celda unidad	a = 8,6761(7) Å      α = 73,172(3)° b = 9,8525(8) Å      β = 75,434(3)° c = 14,2672(11) Å    γ = 69,505(4)°
Volumen	1078,02(15) Å <sup>3</sup>
Z	2
Densidad calculada	1,985 mg/cm <sup>3</sup>
Coefficiente de absorción	7,0084 mm <sup>-1</sup>
F(000)	620

#### 4.3.4 Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]

Los complejos de Pt(IV) fueron evaluados en el laboratorio del Dr. Amancio Carnero, en IBIS-HUVR-CSIC-Universidad de Sevilla, en las siguientes líneas celulares: A375 (melanoma metastásico humano) y NCI-H460 (células de cáncer de pulmón), líneas que se adquirieron de ATCC. Líneas celulares de carcinoma colorrectal HCT116 y HCT116-p53 deficiente (-/-), fueron cedidas por el laboratorio de Bert Vogelstein (John Hopkins University, Baltimore, MD). Estas líneas celulares se cultivaron con DMEM (A375 y NCI-H460) o medio RPMI (HCT116) (Sigma) con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomycin en aire humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Para la evaluación de la citotoxicidad, todas las pruebas se repitieron por triplicado. Las células que crecen en un matraz, fueron distribuidas justo antes de que se hicieran confluentes, se contaron usando un hemocitómetro y se diluyeron con los medios de cultivo, para ajustar la concentración al número de células requerido para 0,2 ml (de volumen para cada pocillo). Después, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, a una densidad entre 1000 y 4000 células/pocillo, se dejaron crecer durante 24 horas, para la posterior adición de los fármacos.

Los compuestos se pesaron, se disolvieron en DMSO y se diluyeron con PBS para alcanzar disoluciones de 10 mM. A partir de esta disolución, se prepararon las diluciones deseadas. Cada placa madre se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

El volumen apropiado de la solución del compuesto (por lo general 2 µl) se añadió de forma automática (utilizando una pipeta Beckman FX 96 puntas), en los medios de cultivo hasta la concentración final deseada para cada fármaco. El medio se eliminó de las células y se reemplazó con 0,2 ml de los medios dosificados con fármaco. Cada concentración se ensayó por triplicado. Un conjunto de pocillos de control se dejan en cada plato, que contiene los medios de cultivo y sin drogas. Un segundo conjunto de pocillos de control, se dejaron en cada plato, que contiene los medios de comunicación con la misma concentración de PBS. Otro conjunto de control se obtuvo con las células no tratadas justo antes de la adición de los fármacos.

Las células se expusieron a los fármacos durante 96 horas y después se lavaron dos veces con disolución salina tamponada con fosfato, antes de ser fijadas con glutaraldehído al 10%. Las células se lavaron dos veces más y se fijaron con cristal violeta al 0,5% durante 30 minutos, se lavaron extensivamente y se midió la absorbancia a 595 nm.

#### **4.3.5 Estudio del potencial de reducción de los complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)]**

Los potenciales de reducción fueron determinados para los complejos *trans*-Pt(IV) **C1** y **C2**. Los valores  $E_p$  reportados son potenciales catódicos de semionda y se miden en el pico de la ola hacia adelante. El VC obtenido para los complejos **C1** y **C2**, se muestra en la figura 4.13 así como los potenciales de reducción obtenidos.

#### **4.3.6 Electroforesis en gel de agarosa de los complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amina)(PPh<sub>3</sub>)] en presencia de agentes reductores**

Se prepararon disoluciones stock de los complejos de concentración 5 mM en DMSO y luego diluciones con agua a 5  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 500  $\mu$ M. Se prepararon también disoluciones stock de los agentes reductores GSH y ácido ascórbico y las respectivas diluciones necesarias para preparar las muestras con plásmido en las proporciones deseadas.

Se determinó el volumen necesario de cada una de las diluciones, para tener las diferentes relaciones de  $r_i$  (donde  $r_i = [\text{complejo}]/(\text{número de pares de bases-ADN})$ ), con un número de bases de 120 pb. A diferencia de una electroforesis común, en este caso se prepararon diluciones con agentes reductores presentes, como GSH y ácido ascórbico con una relación complejo: agente reductor de 1:2, por lo que al final todas las mezclas contenían: complejo, plásmido, disolución acuosa del agente reductor, buffer y agua en un volumen total de 20  $\mu$ l.

Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 24 h, luego se añadieron 2  $\mu$ l del colorante o buffer de carga, que contiene 50% de glicerol, 0,25% azul de bromofenol y 0,25% cianol xileno. El total de la muestra (20  $\mu$ l), se cargó en los pocillos de un gel de agarosa al 0,8%. La electroforesis se llevó a cabo durante un período de 1,5 h a 70 V. Después de la electroforesis, el gel se sumergió en 800 ml de agua Millipore, que contiene 64  $\mu$ l de una solución madre de 10 mg/ml de bromuro de etidio, durante 30 minutos para teñir el ADN.

Finalmente, se tomó la fotografía en un equipo UVITEC Cambridge y se realizó la adquisición de la imagen con tratamiento por UVIDOC HD2.

#### **4.4 Bibliografía**

- <sup>1</sup> N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 8113.
- <sup>2</sup> Y. Jung, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 1387.
- <sup>3</sup> B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, **1965**, 205, 698.
- <sup>4</sup> B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature*, **1969**, 222, 385.
- <sup>5</sup> M. D. Hall, R. D. Dolman, T. W. Hambley in *Metal complexes in tumor diagnosis and as anticancer agents*, Vol. 42 Eds.: A. Sigel and H. Sigel, Dekker, New York, **2004**, pp. 298.
- <sup>6</sup> Y. Shi, S.-A. Liu, D. J. Kerwood, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 107, 6.
- <sup>7</sup> R. J. Schilder, F. P. LaCreta, R. P. Perez, S. W. Johnson, J. M. Brennan, A. Rogatko, S. Nash, C. McAleer, T. C. Hamilton, D. Roby, a. et, *Cancer Res*, **1994**, 54, 709.
- <sup>8</sup> M. C. Christian, D. Spriggs, K. D. Tutsch, T. O'Rourke, D. I. D. VonHoff, J. L. Jacob, E. Reed in *Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy*, Vol. (Ed. H. S.B:), New York, **1991**, pp. 453.
- <sup>9</sup> V. H. Bramwell, D. Crowther, S. O'Malley, R. Swindell, R. Johnson, E. H. Cooper, N. Thatcher, A. Howell, *Cancer Treat Rep*, **1985**, 69, 409.
- <sup>10</sup> A. Pawinski, D. Crowther, H. J. Keizer, P. A. Voute, R. Somers, G. M. van, M. A. Lentz, O. A. T. van, *Eur J Cancer*, **1999**, 35, 163.
- <sup>11</sup> L. M. Pasetto, M. R. D'Andrea, A. A. Brandes, E. Rossi, S. Monfardini, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2006**, 60, 59.
- <sup>12</sup> U. Olszewski, F. Ach, E. Ulsperger, G. Baumgartner, R. Zeillinger, P. Bednarski, G. Hamilton, *Met Based Drugs*, **2009**, 2009, 348916.
- <sup>13</sup> H. Choy, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **2006**, 6, 973.
- <sup>14</sup> W. D. Figg, C. H. Chau, R. A. Madan, J. L. Gulley, R. Gao, T. M. Sissung, S. Spencer, M. Beatson, J. Aragon-Ching, S. M. Steinberg, W. L. Dahut, *Clin Genitourin Cancer*, **2014**, 11, 229.
- <sup>15</sup> A. Kozubik, A. Vaculova, K. Soucek, J. Vondracek, J. Turanek, J. Hofmanova, *Met Based Drugs*, **2008**, 2008, 417897.
- <sup>16</sup> L. R. Kelland, C. F. J. Barnard, K. J. Mellish, M. Jones, P. M. Goddard, M. Valenti, A. Bryant, B. A. Murrer, K. R. Harrap, *Cancer Res.*, **1994**, 54, 5618.
- <sup>17</sup> L. R. Kelland, F. J. Barnard, I. G. Evans, B. A. Murrer, B. R. C. Theobald, S. B. Wyer, P. M. Goddard, M. Jones, M. Valenti, a. et, *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 3016.
- <sup>18</sup> Z. Cheng, Y. Dai, X. Kang, C. Li, S. Huang, H. Lian, Z. Hou, P. Ma, J. Lin, *Biomaterials*, **2014**, 35, 6359.
- <sup>19</sup> M. Galanski, B. K. Keppler, *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 1709.

- 20 C. M. Giandomenico, M. J. Abrams, B. A. Murrer, J. F. Vollano, M. I. Rheinheimer, S. B. Wyer, G. E. Bossard, J. D. Higgins, *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 1015.
- 21 M. Reithofer, M. Galanski, A. Roller, B. K. Keppler, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 2612.
- 22 T. C. Johnstone, J. J. Wilson, S. J. Lippard, *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, 52, 12234.
- 23 E. Wexselblatt, D. Gibson, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 117, 220.
- 24 S. O. Dunham, R. D. Larsen, E. H. Abbott, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 2049.
- 25 N. Margiotta, R. Ranaldo, F. P. Intini, G. Natile, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 12877.
- 26 M. M. Jones, K. A. Morgan, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1972**, 34, 259.
- 27 G. Tamasi, R. Cini, F. P. Intini, M. F. Sivo, G. Natile, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, 43, 5081.
- 28 Y.-A. Lee, K. H. Yoo, O.-S. Jung, *Inorg. Chem. Commun.*, **2003**, 6, 249.
- 29 V. Pichler, P. Heffeter, S. M. Valiahdi, C. R. Kowol, A. Egger, W. Berger, M. A. Jakupec, M. Galanski, B. K. Keppler, *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 11052.
- 30 M. D. Hall, H. R. Mellor, R. Callaghan, T. W. Hambley, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 3403.
- 31 L. Kelland, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2007**, 16, 1009.
- 32 X. Liu, B. Testa, A. Fahr, *Pharm. Res.* **2011**, 28, 962.
- 33 P. Gramatica, E. Papa, M. Luini, E. Monti, M. B. Gariboldi, M. Ravera, E. Gabano, L. Gaviglio, D. Osella, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2010**, 15, 1157.
- 34 G. Doshi, G. Sonpavde, C. N. Sternberg, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2012**, 8, 103.
- 35 A. M. Montana, C. Batalla, *Curr. Med. Chem.*, **2009**, 16, 2235.
- 36 L. T. Ellis, H. M. Er, T. W. Hambley, *Aust. J. Chem.*, **1995**, 48, 793.
- 37 S. Choi, C. Filotto, M. Bisanzo, S. Delaney, D. Lagasee, J. L. Whitworth, A. Jusko, C. Li, N. A. Wood, J. Willingham, A. Schwenker, K. Spaulding, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 2500.
- 38 T. W. Hambley, A. R. Battle, G. B. Deacon, E. T. Lawrenz, G. D. Fallon, B. M. Gatehouse, L. K. Webster, S. Rainone, *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, 77, 3.
- 39 D. J. Evans, M. Green, *Inorg. Chim. Acta*, **1987**, 130, 183.
- 40 M. J. Cleare, J. D. Hoeschele, *Bioinorg. Chem.*, **1973**, 2, 187.
- 41 M. L. Tobe, A. R. Khokhar, *J. Clin. Hematol. Oncol.*, **1977**, 7, 114.
- 42 L. Pendyala, J. W. Cowens, G. B. Chheda, S. P. Dutta, P. J. Creaven, *Cancer Res.*, **1988**, 48, 3533.
- 43 H. Reiber, M. Ruff, M. Uhr, *Clin. Chim. Acta*, **1993**, 217, 163.
- 44 P. Washko, D. Rotrosen, M. Levine, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1991**, 54, 1221S.
- 45 E. E. Blatter, J. F. Vollano, B. S. Krishnan, J. C. Dabrowiak, *Biochemistry*, **1984**, 23, 4817.
- 46 E. L. Weaver, R. N. Bose, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 95, 231.

- 47 U. S. Mehrotra, M. C. Agrawal, S. P. Mushran, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1970**, 32, 2325.
- 48 R. N. Bose, E. L. Weaver, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1997**, 1797.
- 49 K. Hindmarsh, D. A. House, R. van Eldik, *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 278, 32.
- 50 H. R. Ellison, F. Basolo, R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 3943.
- 51 A. Nemirovski, I. Vinograd, K. Takrouri, A. Mijovilovich, A. Rompel, D. Gibson, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, **2010**, 46, 1842.
- 52 K. Lemma, A. M. Sargeson, L. I. Elding, *Dalton Trans.*, **2000**, 1167.
- 53 M. D. Hall, T. W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 232, 49.
- 54 F. Michelet, R. Gueguen, P. Leroy, M. Wellman, A. Nicolas, G. Siest, *Clin. Chem.*, **1995**, 41, 1509.
- 55 E. Volckova, E. Weaver, R. N. Bose, *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 1081.
- 56 E. Volckova, L. P. Dudones, R. N. Bose, *Pharm. Res.*, **2002**, 19, 124.
- 57 K. Lemma, T. Shi, L. I. Elding, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 1728.
- 58 S. Jovanovic, B. Petrovic, Z. D. Bugarcic, R. van Eldik, *Dalton Trans.* **2013**, 42, 8890.
- 59 M. Sinisi, F. P. Intini, G. Natile, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 9694.
- 60 A. Nemirovski, Y. Kasherman, Y. Tzaraf, D. Gibson, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 5554.
- 61 J. Z. Zhang, E. Wexselblatt, T. W. Hambley, D. Gibson, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 847.
- 62 L. Chen, P. F. Lee, J. D. Ranford, J. J. Vittal, S. Y. Wong, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1999**, 1209.
- 63 M. A. Bennett, S. K. Bhargava, J. Messelhaeuser, S. H. Priver, L. L. Welling, A. C. Willis, *Dalton Trans.*, **2007**, 3158.
- 64 D. Y. Q. Wong, J. Y. Lau, W. H. Ang, *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 6104.
- 65 C. Gracia, G. Marco, R. Navarro, P. Romero, T. Soler, E. P. Urriolabeitia, *Organometallics*, **2003**, 22, 4910.
- 66 P. B. Hitchcock, B. Jacobson, A. Pidcock, *J. Organomet. Chem.*, **1977**, 136, 397.
- 67 P. B. Hitchcock, J. F. Nixon, N. Sakarya, *Chem. Commun.*, **2000**, 1745.
- 68 A. K. Cheetham, R. J. Puddephatt, A. Zalkin, D. H. Templeton, L. K. Templeton, *Inorg. Chem.*, **1976**, 15, 2997.
- 69 M. D. Hall, S. Amjadi, M. Zhang, P. J. Beale, T. W. Hambley, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 1614.
- 70 F. J. Ramos-Lima, A. G. Quiroga, J. M. Perez, M. Font-Bardia, X. Solans, C. Navarro-Ranninger, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2003**, 1591.



**Capítulo 5.**  
**Complejos de platino con péptidos**



En este capítulo se presenta la síntesis, caracterización y estudio de la actividad citotóxica de nuevos complejos de Pt(II) y Pt(IV) funcionalizados con el péptido cíclico de secuencia RGD (Arginina (R), Glicina (G) y Ácido Aspártico (D)) (Figura 5.1).

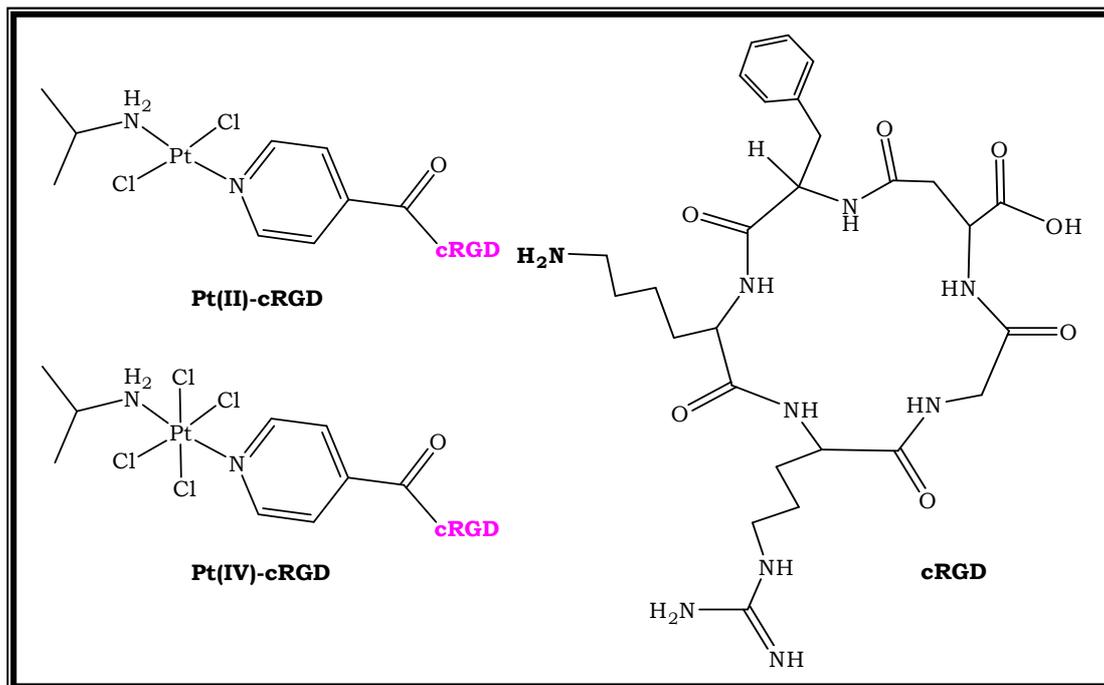


Figura 5.1. Estructura de los complejos **Pt(II)-cRGD**, **Pt(IV)-cRGD** y del péptido cRGD.

## **5.1 Introducción y antecedentes**

### **5.1.1 Las integrinas**

Las integrinas son receptores de adhesión que unen las células a la matriz extracelular a través de proteínas y que también participan en las vías de transducción de señales mecánicas que, son transmitidas desde la superficie celular para ser convertidas en cambios bioquímicos intracelulares.<sup>1-2</sup> Están compuestas por glicoproteínas heterodiméricas, constituidas por dos subunidades no covalentes,  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales están involucradas en las interacciones célula/célula y célula/matriz y poseen dominios extracelulares y citoplasmáticos cortos (Figura 5.2). La subunidad  $\beta$ , posee un C-terminal que está conectado a través de proteínas

citoplasmáticas como talina, vinculina, paxilina y  $\alpha$ -actinina, las cuales juegan un papel importante en los procesos de anclaje<sup>3</sup>.

La integrina  $\alpha_v\beta_3$ , está implicada en varios procesos patológicos tales como osteoporosis,<sup>4</sup> restenosis,<sup>5</sup> artritis reumatoide,<sup>6</sup> inflamaciones,<sup>7</sup> procesos metastásicos<sup>8</sup> y angiogénesis inducida por el tumor.<sup>9</sup> En consecuencia, es lógico que exista un gran interés y esfuerzo en desarrollar antagonistas de las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  para utilizarlos en diferentes enfoques terapéuticos.<sup>10</sup>

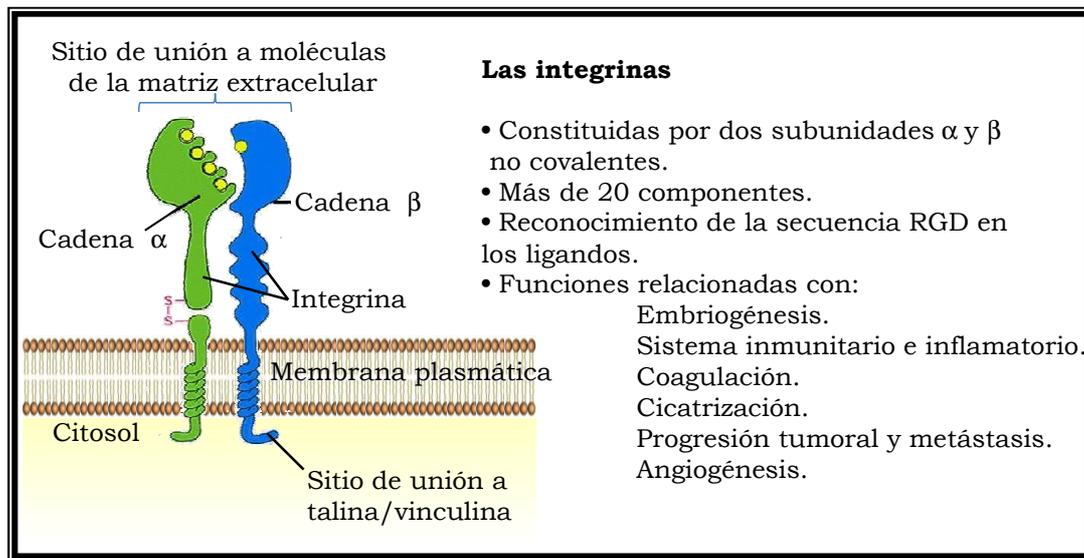


Figura 5.2. Visión rápida y general de las integrinas, sus características y funciones.

Tanto el bloqueo de integrinas (utilizando anticuerpos, péptidos que contienen la secuencia específica correspondiente a RGD, etc.) como las modificaciones inducidas en la expresión de moléculas asociadas a integrinas pueden inhibir la metástasis. Por lo que, su importancia está basada en el descubrimiento y caracterización de nuevas moléculas que regulen la capacidad adherente de las células tumorales, para el desarrollo de nuevas terapias antimetastásicas.<sup>1,11</sup>

#### 5.1.1.1 Las integrinas y el cáncer

En la metástasis tumoral, las integrinas facilitan que cualquier célula tumoral primaria se libere y pueda ser transportada por el sistema circulatorio o linfático a otros lugares, permitiendo que estas células

neoplásicas se adhieran al tejido blando o que se unan a las plaquetas pasando inadvertidas por el sistema inmune.<sup>3</sup>

El melanoma humano, representa uno de los cánceres con mayor capacidad de invadir una gran variedad de tejidos y matrices extracelulares, esto se debe en parte, a que expresa múltiples receptores de integrinas, entre ellos el receptor de vitronectina ( $\alpha_v\beta_3$ ), éste se une a una variedad de componentes de la matriz extracelular que contienen la secuencia RGD.<sup>12</sup> Algunos trabajos realizados con células de melanoma, a las que se les suprimió la expresión del gen (que codifica la subunidad  $\alpha_v$ ), mostraron que se producía una reducción dramática del carácter cancerígeno de las células, lo que provocaba rápidamente la apoptosis, por lo que se concluyó, que esta subunidad podría estar directamente comprometida con la proliferación de las células de melanoma *in vivo*.<sup>13</sup>

#### **5.1.1.2 Antagonistas de las integrinas en el tratamiento y pronóstico del cáncer**

Uno de los primeros antagonistas de las integrinas usados con fines terapéuticos, es el péptido RGD (de secuencia arginina-glicina-ácido aspártico) ya que este puede unirse a una variedad de integrinas, incluyendo  $\alpha_v\beta_3$ , que suelen estar sobreexpresadas en varios tipos de cáncer.<sup>14-15</sup>

Por otro lado, la utilización de péptidos radiomarcados de RGD pueden proporcionar algunas ventajas, para documentar la expresión de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  en tumores y pueden ser de gran utilidad para la adecuada selección de los pacientes que entran en ensayos clínicos y determinar la dosis óptima de antagonistas de  $\alpha_v\beta_3$ . Además, la expresión o sobreexpresión  $\alpha_v\beta_3$  da información importante sobre el factor que determina la invasividad y el potencial metastásico en modelos experimentales de tumores malignos, así como en pacientes.<sup>16</sup>

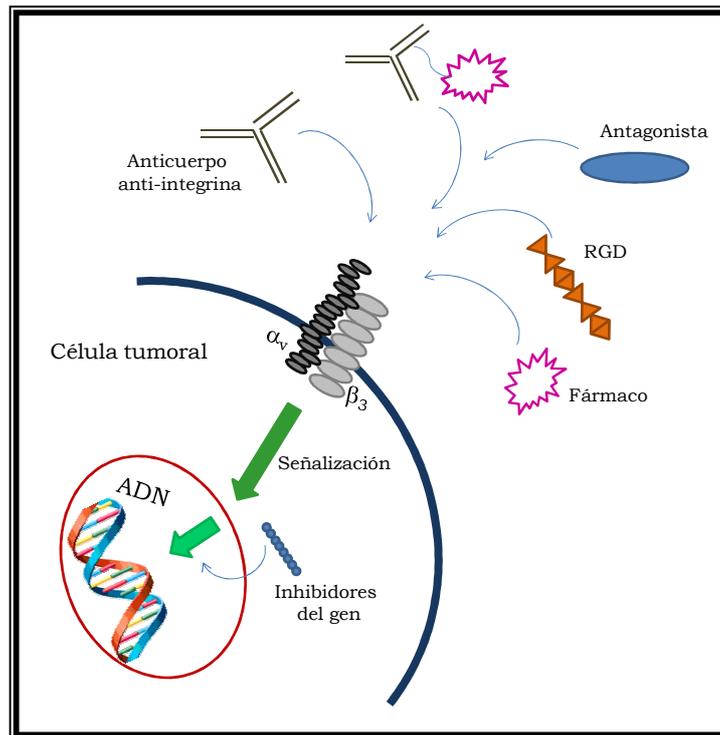


Figura 5.3. Estrategias para inhibir la expresión de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  (incluyendo la inhibición de señalización directa y la terapia dirigida).

Diferentes ensayos clínicos han evaluado el uso de otras secuencias peptídicas como terapia en pacientes con diversos tipos de tumores malignos<sup>17</sup> por ejemplo, la cilengtida, un derivado de cíclico (Arg-Gly-Asp-D-Phe-N-MeVal) que ha demostrado ser un péptido selectivo a la subunidad  $\alpha_v$  y que se encuentra actualmente en ensayos clínicos (fase I/II en glioma anaplásico y fase I en sarcoma de Kaposi) mostrando efectos secundarios leves.<sup>18-20</sup>

Otro ejemplo interesante es la secuencia de aminoácidos Asn-Gly-Arg (NGR), que es uno de los ejemplos de péptido que ha mostrado ser muy útil para referenciar de forma única y específica tumores sólidos en modelos murinos y de carcinoma de mama.<sup>21</sup> Además de la secuencia NGR, la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), también se ha utilizado para detectar receptores específicos, encontrados principalmente en ciertas células tumorales.<sup>22-23</sup>

### 5.1.2 Síntesis de péptidos

Gracias a los avances alcanzados en la síntesis de péptidos en fase sólida se pueden diseñar secuencias peptídicas que, se asemejen a las estructuras básicas del sistema inmune más relevantes. Desde hace años, los péptidos sintéticos que mimetizan importantes moléculas como las proteínas, se vienen utilizando tanto, en el diseño molecular de vacunas, como en el desarrollo de sistemas de diagnóstico, en la determinación de enfermedades infecciosas (de origen parasitario o bacteriano). La metodología de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS del inglés solid-phase peptide synthesis) fue descrita por primera vez por Merrifield en 1963,<sup>24</sup> y hoy en día es la manera más habitual y sencilla de obtener péptidos. Este método se basa en la unión del aminoácido carboxi-terminal (C-terminal) a un soporte insoluble y la posterior elongación secuencial, aminoácido tras aminoácido, de la cadena peptídica. Este método de síntesis en fase sólida, presenta numerosas ventajas con respecto a la síntesis de péptidos en disolución como son:

- 1) Los buenos rendimientos obtenidos, debido a que al trabajar con el péptido unido a un soporte sólido, se pueden emplear excesos de reactivos que se eliminan fácilmente tras sencillos procesos de lavado y filtrado.
- 2) No se producen pérdidas mecánicas de péptido puesto que, el soporte sólido al que está unido permanece en el mismo recipiente durante todo el proceso.
- 3) Las operaciones de lavado y filtrado son sencillas y susceptibles de automatización.

El crecimiento de la cadena peptídica tiene lugar siempre por el extremo carboxilo, mediante la adición sucesiva de los aminoácidos que tienen tanto extremo  $\alpha$ -amino como, cadenas laterales de aminoácidos convenientemente protegidas. Existen dos estrategias distintas para la síntesis de péptidos en fase sólida, la estrategia Boc/Bzl y la estrategia Fmoc/tBu. La primera utiliza el grupo tert-butoxicarbonil (Boc) como protector de los grupos  $\alpha$ -amino y grupos del tipo benzil (Bzl) como protector de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. La

estrategia Fmoc/tBu emplea el grupo 9-fluorometoxicarbonil (Fmoc) como protector temporal del grupo  $\alpha$ -amino y grupos del tipo tert-butil (tBu) para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. En la figura 5.4 se muestra un esquema general de la síntesis.

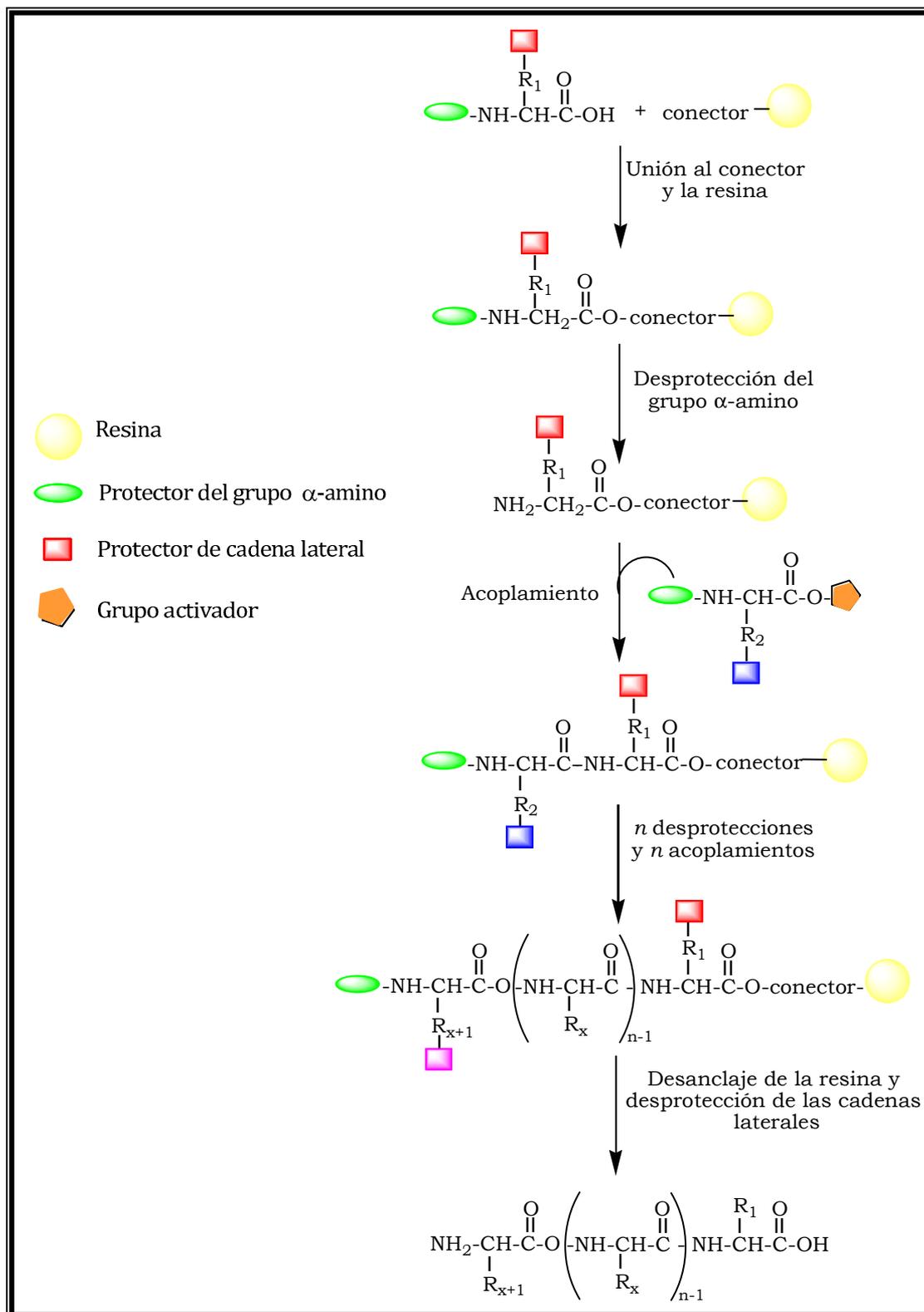


Figura 5.4. Esquema de síntesis de péptidos en fase sólida.

La cadena peptídica se sintetiza sobre un soporte polimérico insoluble o resina, por la unión del aminoácido C-terminal o por un conector al que se le unirá el primer aminoácido. El crecimiento de la cadena tiene lugar desde el extremo carboxilo hacia el extremo amino del péptido. El conector entre el soporte polimérico y el primer aminoácido variará dependiendo del tipo de péptido que se desee obtener (carboxilo, amida, aldehído, etc) En el caso de los aminoácidos trifuncionales, la cadena lateral está protegida para evitar polimerizaciones o reacciones no deseadas con dichas cadenas. Estos grupos protectores dependen del tipo de grupo funcional del aminoácido y del tipo de estrategia que se emplee para la síntesis.

### 5.1.3 Complejos de platino funcionalizados con péptidos

Un método para el diseño de fármacos más eficaces, consiste en la incorporación de un grupo de focalización específica hacia la célula, como por ejemplo secuencias de péptidos, que son capaces de ayudar en la llegada del fármaco terapéutico al sitio deseado o de contribuir en la formación de imágenes.<sup>25</sup> Los aminoácidos y péptidos conjugados a centros metálicos, como posibles moduladores para la interacción de este tipo de compuestos con el ADN, han despertado el interés de la comunidad científica, por el diseño de nuevos fármacos más específicos.<sup>26</sup>

Murray y colaboradores,<sup>27</sup> estudiaron la especificidad y la magnitud del daño en el ADN, inducido por seis complejos *cis* de platino coordinados a diferentes péptidos y lo compararon con el daño producido por los modelos: cisplatino y Pt(en)Cl<sub>2</sub>. Los resultados mostraron que la especificidad de los complejos platino-péptido era muy similar a la de los modelos, aunque la reactividad de los complejos Pt-péptido frente al plásmido pUC19 resultó menor. Estos estudios revelaron la fuerte influencia que ejerce el aminoácido directamente enlazado al platino, mostrando que el complejo de platino unido a lisina produce mayor daño en las células estudiadas (HeLa), seguido por los complejos con platino directamente enlazado a arginina, serina, glicina, fenilalanina y glutamato.

En esta misma línea, Reedijk y colaboradores<sup>28</sup> llegaron a construir una biblioteca de complejos dicloroplatino(II) tripéptido, mediante una síntesis en fase sólida automatizada. Los complejos dicloroplatino(II) con tripéptidos fueron diseñados sobre la base de que la combinación Pt-péptido, no sólo mejoraría la orientación del fármaco hacia el ADN sino que, también proporcionarían interacciones adicionales específicas, que posiblemente favorecerían la platinación del ADN. Los resultados descritos en este trabajo presentan un método para la síntesis en bloque, de complejos de platino-quelantes a partir de aminoácidos. La funcionalidad de la parte quelante, así como la naturaleza del péptido, demostró tener gran influencia en la actividad anticancerígena, aunque desafortunadamente, la actividad antitumoral no resultó tan buena como la del cisplatino, ni en células no resistentes, ni resistentes a este fármaco.<sup>29</sup>

Lippard y su grupo de investigación,<sup>30</sup> diseñaron, sintetizaron y caracterizaron una serie de complejos de platino(IV) mono y difuncionalizados con péptidos, utilizando RGD y NGR lineales, pentapéptidos con puente disulfuro (cRGDC)c, (RGDfK)c, para dirigirlos selectivamente a células endoteliales tumorales sobre las células sanas. En este estudio los complejos platino(IV)-péptido derivados del cisplatino (Figura 5.5) se evaluaron frente a células tanto con sobreexpresión de integrina como en células normales, ya que el complejo de Pt(IV) se reduce a cisplatino liberando RGD, los resultados obtenidos fueron más positivos que los alcanzados usando tan sólo CDDP.

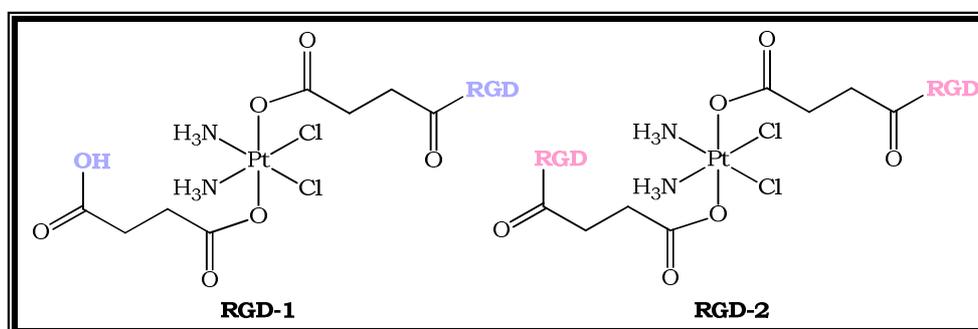


Figura 5.5. Complejos estudiados por Lippard y colaboradores.

Estos complejos conjugados Pt(IV)-RGD mostraron ser altamente citotóxicos en todas la líneas celulares evaluadas, incluso en aquellas

donde no había sobreexpresión de las integrina  $\alpha_v\beta_3$ , mostrando valores de citotoxicidad en el mismo orden de magnitud que el cisplatino.

En esta misma línea Ravera y colaboradores,<sup>31</sup> sintetizaron y caracterizaron complejos de Pt(IV) conjugados a los péptidos (Tate (octreotato) y PNT (pseudo-neurotensina)), con uno o dos péptidos en la posición axial, diseñados con el propósito de ser empleados en la administración dirigida de fármacos a células tumorales. En general, todos los complejos conjugados con el péptido, son buenos inhibidores de la proliferación celular (en MCF-7, Panc1, HepG2 y Pt45), en comparación con el complejos de platino(IV) de partida, de modo que su relativamente baja citotoxicidad, se mejora en gran medida mediante la funcionalización con los péptidos.

## **5.2 Discusión de resultados**

### **5.2.1 Síntesis de los compuestos de partida**

#### **5.2.1.1 Síntesis de complejos de platino**

Los complejos de partida de platino(II) y (IV) se prepararon de acuerdo a la metodología previamente publicada en nuestro grupo de investigación,<sup>32-33</sup> con algunas modificaciones. Cada complejo fue purificado y caracterizado por las técnicas espectroscópicas comunes de: RMN, análisis elemental, MS-ESI.

#### **5.2.1.2 Síntesis del péptido**

##### **Síntesis del péptido RGD lineal**

Inicialmente se intentó realizar la síntesis del péptido lineal de forma manual, pero este proceso resultó bastante complicado, requirió muchos días de trabajo, la repetición de varios pasos de lavado y desprotección, lo que finalmente afectó el rendimiento. Debido a que el método manual lleva a mayores probabilidades de error, más gasto de reactivos y rendimientos muy bajos, se procedió a la síntesis automatizada que resultó ser la mejor opción, para llevar a cabo con éxito la síntesis del péptido.

El péptido lineal RGD se preparó de forma automatizada, utilizando como material de partida una resina funcionalizada con el primer aminoácido, (glicina en este caso). El proceso automatizado permite ir acoplado de forma sistemática y secuencial los aminoácidos deseados, además facilita enormemente los procesos de lavado y desprotección, necesarios para permitir un acoplamiento ordenado. Del sintetizador se obtuvo el péptido RGD unido a la resina con la siguiente secuencia de aminoácidos (Figura 5.6):

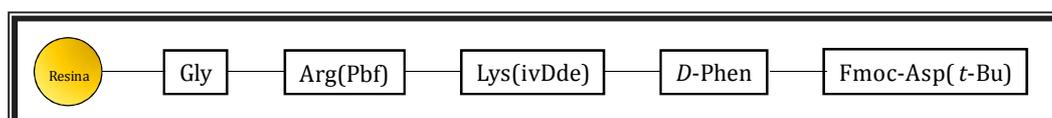


Figura 5.6. Secuencia del péptido RGD lineal unido a la resina.

Los siguientes pasos, fueron la separación del péptido de la resina, la desprotección del último aminoácido y la purificación del péptido lineal por HPLC. En este último paso, se empleó una mezcla de eluyentes H<sub>2</sub>O-0,1%TFA (A) y CH<sub>3</sub>CN-0,1%TFA (B), con un gradiente de disolventes de 45% a 100% de B en 35,0 min. El cromatograma mostró una señal mayoritaria, con un tiempo de retención de 10,4 min, que se atribuye al péptido lineal, cuya estructura (con los grupos protectores de las cadenas laterales) se muestra a continuación (Figura 5.7):

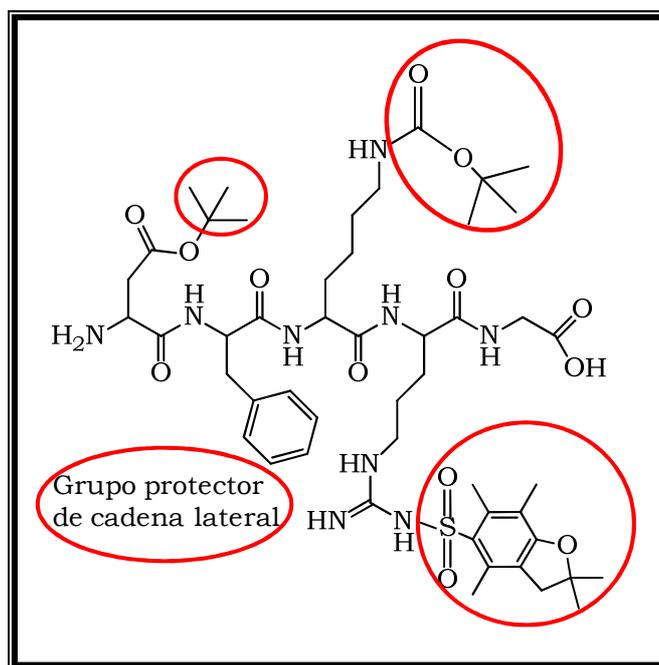


Figura 5.7. Estructura del péptido lineal RGD con los grupos protectores de las cadenas laterales.

Una vez purificado el péptido lineal, éste se utiliza como material de partida para la ciclación.

### Síntesis del péptido cíclico RGD (cRGD)

La ciclación del péptido lineal RGD se realizó usando como activante HATU (hexafluorofosfato de N-[óxido de N-(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-(4,5*b*)piridino-1-ilmetilén]-*N*-metilmetanamino), que es una sal ampliamente usada en la síntesis de péptidos en fase sólida, debido a su alta reactividad en las etapas de activación y acoplamiento.<sup>34</sup> Una vez terminado el acoplamiento, el péptido cíclico se purificó por HPLC, siendo mayoritario el producto deseado, con un tiempo de retención de 19,3 a

20,0 min. Finalmente se llevó a cabo la desprotección de los grupos restantes y se obtuvo el péptido cíclico puro, **cRGD** (Figura 5.8), que fue caracterizado por MS-ESI mostrando el pico correspondiente al ion molecular  $[M+H]$  a 604,4 uma.

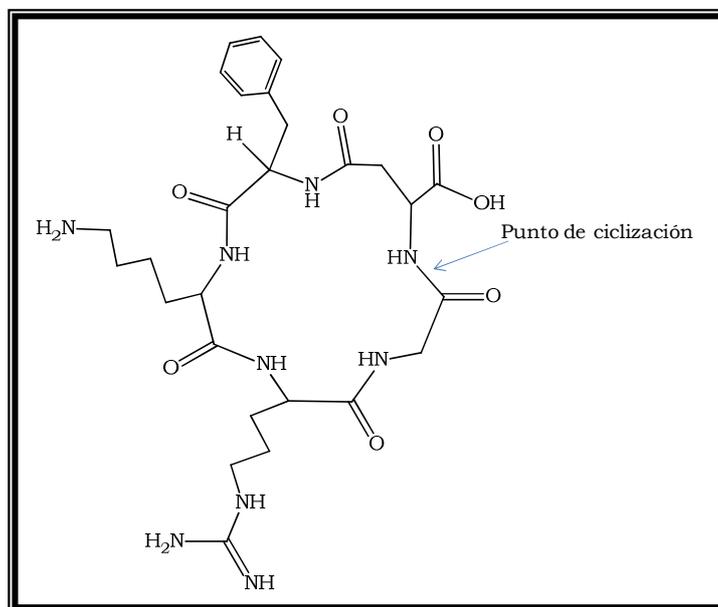


Figura 5.8. Estructura del péptido **cRGD**.

## 5.2.2 Síntesis y caracterización de complejos *trans* de Pt-cRGD

### 5.2.2.1 Síntesis del complejo *trans*-[Pt(II)-cRGD]

Para la síntesis del complejo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(4-pic-cRGD)] (**Pt(II)-cRGD**), fue necesario inicialmente activar el grupo carboxilato del ácido 4-picolínico coordinado al platino(II), con EDC (1-etil-3-(3-dimetilamino propil)carbodiimida), que funciona como un agente deshidratante. Seguidamente, se hizo reaccionar con el grupo amino libre de la lisina del péptido cRGD en medio básico, propiciando la formación de un nuevo enlace amida. Tal como se muestra en la figura 5.9.

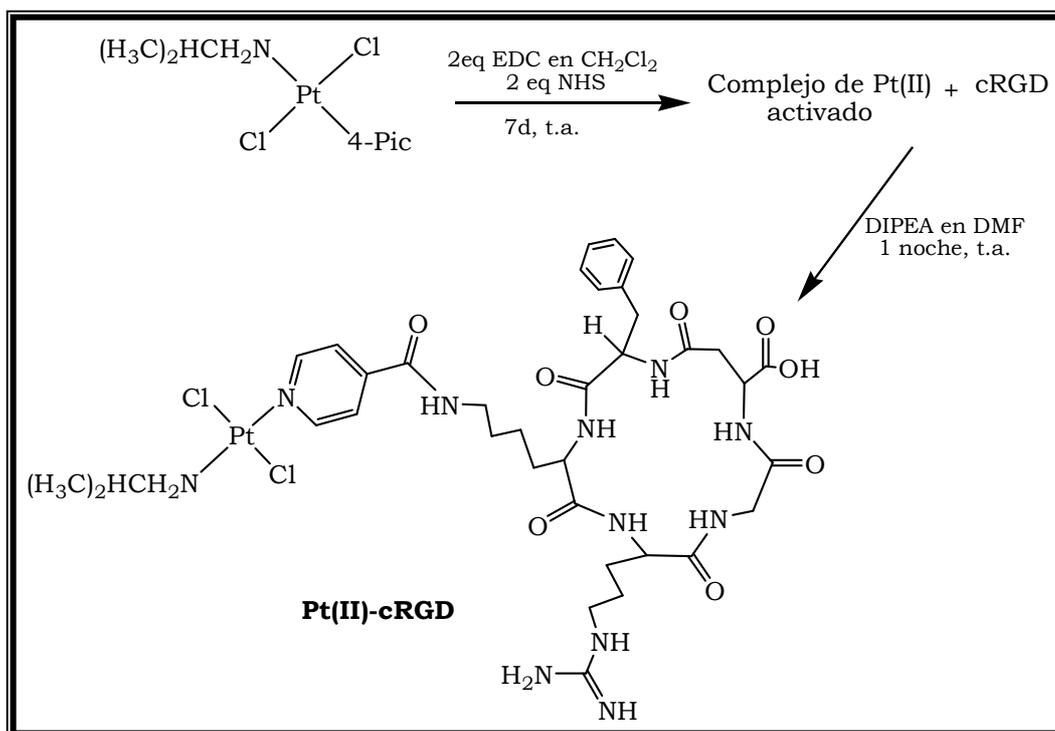


Figura 5.9. Esquema de síntesis del complejo **Pt(II)-cRGD**.

El crudo obtenido de la reacción se purifica por HPLC y finalmente se caracteriza por MS-ESI. La distribución isotópica del producto de reacción se corresponde, con la esperada para un complejo de platino(II) acoplado al péptido cRGD (Figura 5.10).

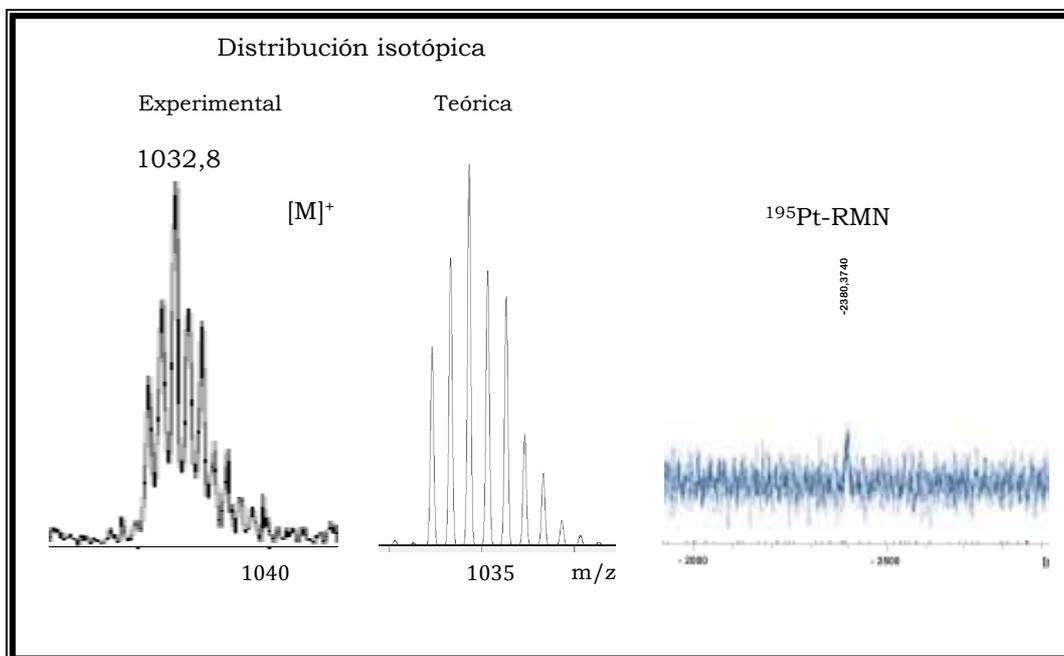


Figura 5.10. Espectro de ESI-MS para el complejo **Pt(II)-cRGD**.

Adicionalmente y gracias al  $^{195}\text{Pt}$ -RMN en microtubos de 200  $\mu\text{l}$ , se pudo confirmar la presencia del complejo **Pt(II)-cRGD**, ya que únicamente se observó una señal a un desplazamiento químico típico para complejos de Pt(II) con un entorno *trans*-[PtCl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>] en -2250 ppm.<sup>35</sup>

### 5.2.2.2 Intentos de síntesis del complejo *trans*-[Pt(IV)-cRGD]

Se intentó la síntesis del complejo *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(ipa)(4-pic-cRGD)] (Figura 5.11), empleando como material de partida el complejo de platino(IV), *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(ipa)(4-pic)], y utilizando las mismas condiciones de reacción, que se emplearon para el complejo **Pt(II)-cRGD**. Sin embargo, la caracterización fue muy problemática, ya que el complejo tiende a reducirse en disolución, lo que es común en algunos complejos de platino(IV) que poseen cuatro ligandos cloruro, por su bajo potencial de oxidación (como se ha discutido previamente en el capítulo de complejos de platino(IV)).

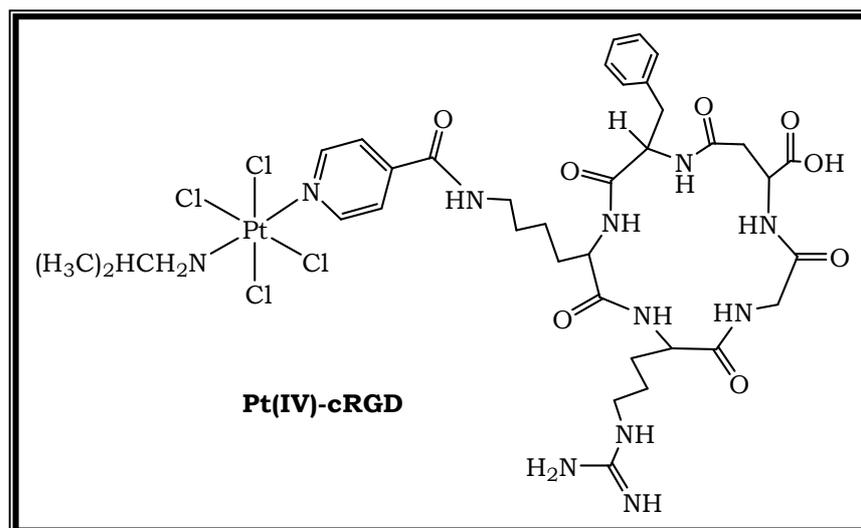


Figura 5.11. Estructura del complejo **Pt(IV)-cRGD**.

La estructura del complejo *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(ipa)(4-pic-cRGD)] (**Pt-IV**), se caracterizó por MS-ESI, pero no por  $^{195}\text{Pt}$ -RMN ya que, la poca abundancia isotópica de  $^{195}\text{Pt}$  (33,83%), la baja concentración de complejo y su inestabilidad en disolución, dio lugar a la reducción del complejo, por lo que no se llegó a observar la señal del complejo **Pt(IV)-cRGD**, pero sí la del análogo de Pt(II) (Figura 5.12).

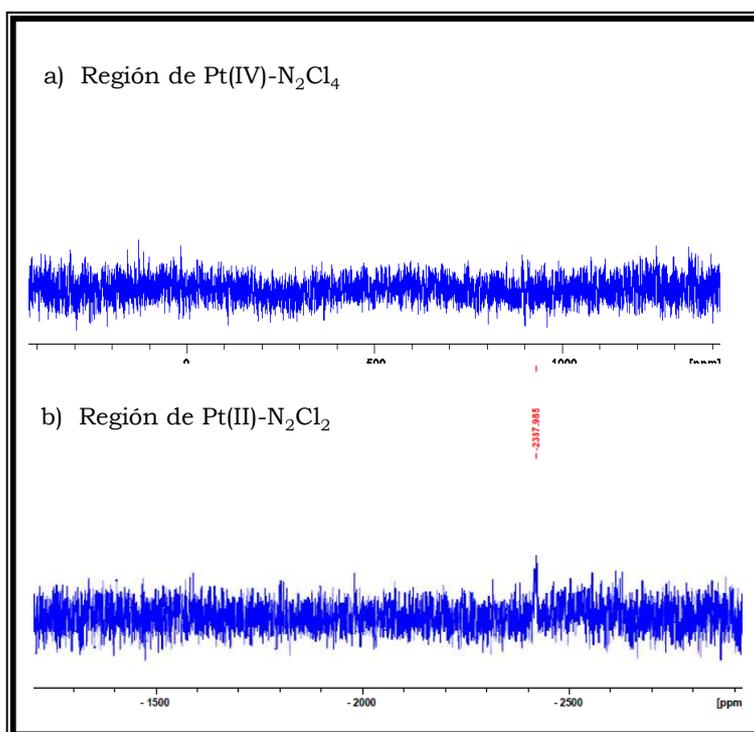


Figura 5.12. Espectro final de  $^{195}\text{Pt}$ -RMN de una muestra fresca de complejo **Pt(IV)-cRGD** a) en la zona de Pt(IV) y b) en la zona de Pt(II).

### 5.2.3 Estudio de la actividad citotóxica de los complejos *trans* de platino con cRGD

Se evaluó la actividad citotóxica de los complejos **Pt(II)-cRGD** y del precursor (*trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(4-pic)] (**Pt-II**)) en células de cáncer de mama (MDAMB231 y MCF7), carcinoma de ovario (A2780 y SKOV3) y adenocarcinoma humano (A549). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla 5.A:

Tabla 5.A. Resultados de la actividad citotóxica para los complejos **Pt(II)-cRGD** y su precursor.

Complejo	Valores de IC <sub>50</sub> (μM) en las células tumorales				
	MDAMB231	MCF7	A2780	SKOV3	A549
<b>Pt-II</b>	51,80	60,31	62,31	>100	>100
<b>Pt(II)-cRGD</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>CDDP</b>	8,5	38,2	-	-	-

El nuevo complejo de platino(II) acoplado al péptido cRGD, no mostró actividad antitumoral en la células ensayadas, aunque sus

precursores si mostraron ser efectivos en algunas de ellas. La razón de esta falta de actividad, se puede atribuir a que las células tumorales estudiadas, no presentan sobreexpresión de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , que en principio se consideró indispensable para reconocer la secuencia del péptido RGD y conllevar a la focalización del fármaco para potenciar su actividad antitumoral.

Debido a que en nuestro grupo de investigación, estamos dando nuestros primeros pasos en la funcionalización de complejos de platino con péptidos, y ya que no hay ejemplos en la bibliografía de complejos *trans* funcionalizados con un péptido cíclico a través de un conector aromático (ácido 4-picolínico), consideramos que era necesario probar otras líneas celulares en las que hubiera una especial sobreexpresión de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  como por ejemplo: HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) y/ o C8161 (melanoma metastásico humano)<sup>36</sup>.

A pesar de que la línea celular HUVEC no es un modelo carcinogénico, muestra una alta sobreexpresión en las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , este fenómeno es de gran importancia para nuestro complejo funcionalizado **Pt(II)-cRGD**. Así los complejos **Pt(II)-cRGD** y su precursor fueron evaluados en células HUVEC y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.B.

Tabla 5.B. Resultados de la actividad citotóxica para los complejos **Pt(II)-cRGD** y su precursor.

Complejo	Valores de IC <sub>50</sub> (μM)
	HUVEC
<b>Pt-II</b>	60±11
<b>Pt(II)-cRGD</b>	85±15

Desafortunadamente, no se ha llegado a los resultados esperados, posiblemente debido a que estos complejos no son capaces de atravesar la membrana celular, problema original de los complejos de partida de Pt(II).<sup>32</sup> Pero también es verdad, que observamos un pequeño aumento de la citotoxicidad en la línea celular HUVEC, por lo que sería necesario evaluar

la actividad antitumoral en un modelo cancerígeno que tenga sobreexpresión en la integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

Con una muestra fresca del **Pt(IV)-cRGD**, se realizó un ensayo de citotoxicidad (Tabla 5.C). El objetivo era comprobar si este complejo podía mostrar algún tipo de actividad a pesar de su demostrada baja estabilidad en disolución. En el caso del complejo precursor de Pt(IV), que sí era citotóxico y sí acumulaba en la célula,<sup>33</sup> no ha sido posible estabilizar el **Pt(IV)-cRGD** como corroboran los resultados de citotoxicidad de las muestras frescas (Tabla 5.C).

Tabla 5.C. Resultados de la actividad citotóxica para los complejos Pt(IV).

Complejo	Valores de IC <sub>50</sub> (μM)		
	MDAMB231	MCF7	A2780
<b>Pt-IV</b>	64,21	71,0	38,02
<b>Pt(IV)-cRGD</b>	>200	>200	-

En esta línea, el grupo del ITN-Lisboa logró la síntesis de una muestra cuyo espectro de masas se ajustaba a  $[M+AcN+H]^+$  usando condiciones especiales que parecen estabilizar el complejo, pero este procedimiento aún está en vías de perfeccionamiento.

### 5.3 Parte experimental

#### 5.3.1 Disolventes, reactivos y equipos empleados

Los disolventes orgánicos utilizados en la síntesis y purificación fueron grado HPLC y se emplearon sin tratamiento previo, salvo algún caso en que se empleó disolvente seco. En la tabla 5.D, se recogen los reactivos comerciales empleados.

Tabla 5.D. Tabla de reactivos comerciales empleados.

Reactivo	Casa comercial	Reactivo	Casa comercial
Gly-2-Clorotritil	Merck (Novabiochem)	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Merck (Novabiochem)
Boc-Lys-OH	Merck (Novabiochem)	Fmoc-D-Phen-OH	Merck (Novabiochem)
Fmoc-Asp-(OtBut)	Merck (Novabiochem)	HBTU	Sigma-Aldrich
HOBT	Sigma-Aldrich	DIPEA	Sigma-Aldrich
Piperidina	Aldrich	Ácido trifluoroacético	Sigma-Aldrich
Piridina	Sigma-Aldrich	Bicarbonato de sodio	Sigma-Aldrich
Bisulfato de potasio	Sigma-Aldrich	HATU	Aldrich
Hidrazina	Sigma-Aldrich	TIS	Aldrich
EDC	Aldrich	NHS	Aldrich

Los espectros de  $^{195}\text{Pt}$ -RMN se llevaron a cabo en el SIDI-UAM.

Los espectros de masas se realizaron por espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS), utilizando un equipo modelo Bruker Esquire 3000 plus en el ITN (Instituto Tecnológico e Nuclear de Lisboa).

La purificación de los compuestos por HPLC se realizó en el ITN, en un cromatógrafo equipado con una bomba Perkin-Elmer LC 200 con un

detector UV (LC 290) y una columna semipreparativa Supelco, Discovery Bio, wide pore C18 (25 cm x 10 nm, 10  $\mu$ m).

### 5.3.2 Síntesis de los compuestos de partida

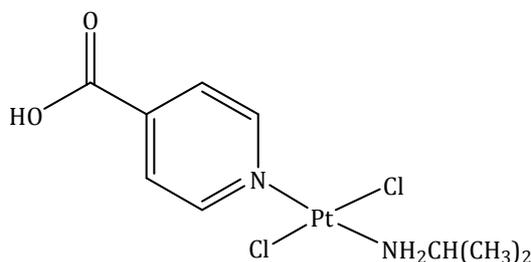
#### 5.3.2.1 Síntesis de complejos de platino

##### Síntesis del complejo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(4-pic)]

La síntesis de los complejos de partida se realizó siguiendo el procedimiento previamente publicado<sup>32</sup> en nuestro grupo con algunas modificaciones, que se indican a continuación:

A una suspensión del complejo *cis*-[PtCl<sub>2</sub>((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHNH<sub>2</sub>)] (0,140 g, 0,364 mmol) en agua (10 ml), se añadió ácido 4-picolínico (0,134 g, 1,09 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 90°C durante 3 h con agitación, hasta que se observó una disolución transparente, que luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró hasta la mitad de su volumen. Después se añadió, ácido clorhídrico concentrado (0,35 ml, 3,96 mmol) y se puso a reflujo durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente, hasta que precipitó un sólido amarillo pálido, que se filtró, y se lavó con agua fría. Finalmente el producto se secó bajo vacío.

*trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(4-pic)] (**Pt-II**)



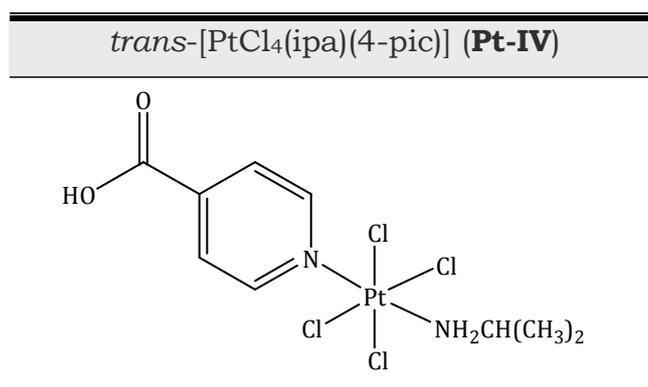
Sólido amarillo pálido, (62%).  $\delta$ H (300,13 MHz; acetona-d<sub>6</sub>): 9,06 (d, 2H, CH<sub>(Ar)</sub>, *J*=6,9 Hz); 7,93 (d, 2H, CH<sub>(Ar)</sub>, *J*=6,7 Hz); 4,29 (s, NH<sub>2</sub>(ipa)); 3,35 (sept, 1H, CH<sub>(ipa)</sub>, *J*=6,2 Hz); 1,40 (d, 6H, 2CH<sub>3</sub>(ipa), *J*=6,5 Hz).  $\delta$ C (75,47 MHz; acetona-d<sub>6</sub>): 165,6 (C=O), 154,8 (C<sub>(Ar)</sub>), 141,8 (C<sub>(Ar)</sub>), 125,4 (C<sub>(Ar)</sub>), 49,4 (CH<sub>(ipa)</sub>), 23,7 (CH<sub>3</sub>(ipa)).  $\delta$ Pt (64,53 MHz; acetona-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>): -2288,2. **MS**

**(ESI):** 447,03 uma  $[M]^+$ . **Análisis elemental** CHN, encontrado: C: 24,08%, H: 3,16%, N: 6,29%. Calculado para  $C_9H_{14}Cl_2N_2O_2Pt$ : C: 24,12%, H: 3,15%, N: 6,25%.

### Síntesis del complejo *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(ipa)(4-pic)]

La síntesis de este complejo se puede realizar siguiendo el procedimiento publicado por nuestro grupo de investigación,<sup>33</sup> pero en este caso se empleó un método de oxidación diferente.

En este caso se utilizó una reacción de oxidación con cloro gas. A una disolución del complejo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(4-pic)] en diclorometano, se le hace pasar una corriente de cloro gas durante 1½ h. Posteriormente, la disolución se concentra a presión reducida, hasta el mínimo volumen y se deja a -20 °C durante una noche, con lo que se obtiene un sólido de apariencia cristalina, correspondiente al producto deseado.



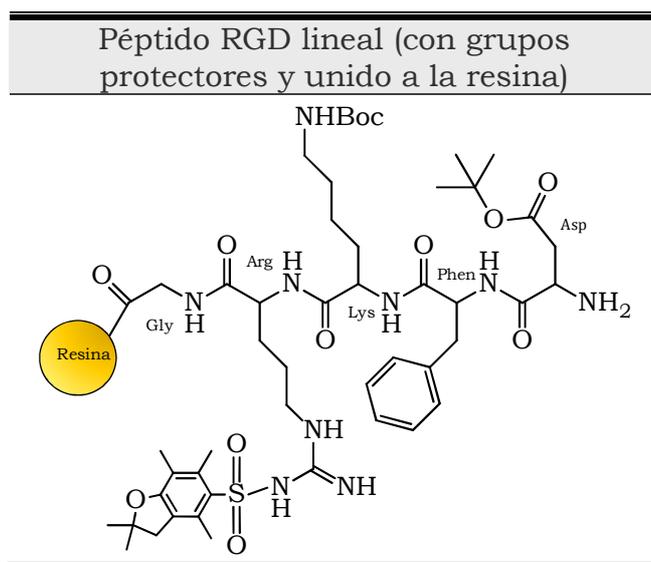
Sólido amarillo intenso (57%).  **$\delta H$**  (300,13 MHz; acetona-d<sub>6</sub>): 9,36 (d, 2H, CH<sub>(Ar)</sub>),  $J=6,8$  Hz); 8,30 (d, 2H, CH<sub>(Ar)</sub>),  $J=6,9$  Hz); 4,60 (sa, NH<sub>2(ipa)</sub>); 3,68 (sept, 1H, CH<sub>(ipa)</sub>),  $J=6,5$  Hz); 1,56 (d, 6H, 2CH<sub>3(ipa)</sub>),  $J=6,5$  Hz).  **$\delta C$**  (75,47 MHz; acetona-d<sub>6</sub>): 166,3 (C=O), 154,8 (C<sub>(Ar)</sub>), 142,8 (C<sub>(Ar)</sub>), 126,2 (C<sub>(Ar)</sub>), 49,4 (CH<sub>(ipa)</sub>), 23,9 (CH<sub>3(ipa)</sub>).  **$\delta Pt$**  (64,53 MHz; acetona-d<sub>6</sub>; Na<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>): -246,7. **Análisis elemental** CHN, encontrado: C:20,08%, H:2,70% N:5,39%. Calculado para  $C_9H_{14}Cl_4N_2O_2Pt$ : C: 20,82%, H: 2,72%, N:5,40%.

### 5.3.2.2 Síntesis del péptido

#### Síntesis del péptido RGD lineal

La síntesis del péptido lineal RGD se realizó de forma automatizada en un equipo Automated 12-Channel Microwave Peptide Synthesizer.

En el equipo esta secuencia de aminoácidos ya viene especificada en un método (RGD\_CITrtResin). Se confirma la secuencia de aminoácidos (Asp-Phen-Lys-Arg-Gly). En este caso se empleó una resina comercial que ya viene funcionalizada con glicina (CITrt-Gly). El equipo calcula automáticamente las cantidades de cada uno de los aminoácidos y el volumen de las diferentes disoluciones necesarias para la preparación del péptido deseado. Se prepararon todas las disoluciones y reactivos indicados por el equipo y se inició la síntesis. Finalmente, se obtuvo la siguiente secuencia de aminoácidos unidos a la resina:



#### Desprotección y separación del péptido de la resina

Se pesaron 120 mg de resina-péptido obtenido del sintetizador, se suspendieron en DMF y la mezcla se colocó en el montaje de síntesis de péptidos manual, se agitó y se lavó varias veces con DMF, luego con DCM y nuevamente con DMF. Después, se eliminó la DMF.

Se prepararon 10 ml de una disolución de piperidina al 20% en DMF. Se adicionaron 5 ml de esta disolución sobre la resina y se agitó

durante 10 minutos, se drenó y se agregaron los otros 5 ml restantes, se dejó reaccionar 10 minutos y luego se drenó y finalmente se lavó varias veces con DMF. Con este procedimiento se desprotegió, el último aminoácido del péptido lineal pero, el péptido aún está unido a la resina.

Para desanclar el péptido lineal de la resina, se prepararon las siguientes disoluciones:

- 10 ml de TFA al 1% en DCM.
- 10 ml de piridina al 10% en MeOH.

El sólido resina-péptido se lavó varias veces con DCM, luego se dejó secar y se cambió el matraz recolector, por uno nuevo que contiene 500 µl de disolución de piridina. A la resina se añadieron 2,5 ml de disolución de TFA y se agitó durante 2 minutos. Al adicionar el TFA, la suspensión con la resina, se tornó de color vinotinto. La disolución de TFA se drenó, se mezcló con la disolución de piridina y se reservó esta mezcla. Este procedimiento se realizó hasta terminar los 10 ml de TFA (siempre colocando disolución de piridina nueva en el matraz de recolección). Finalmente, se lavó la resina con DCM y todas las fracciones (TFA-Piridina) recolectadas, se llevaron a sequedad. En el matraz quedó un sólido blanco.

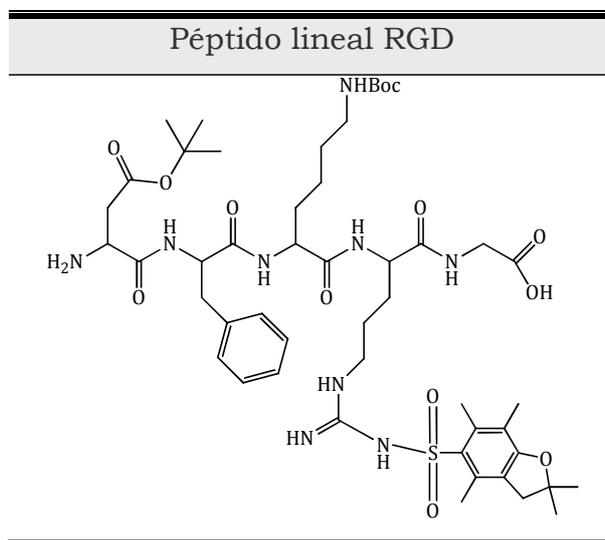
El sólido obtenido se lavó, con la siguiente secuencia: con agua fría (3 veces), 4 ml de una disolución de NaHCO<sub>3</sub> al 5%, con agua fría (3 veces), con una disolución de KHSO<sub>4</sub> 0,5 M y finalmente con agua fría (3 veces) luego se centrifugó y se separó la disolución sobrenadante por decantación.

El sólido se secó en el liofilizador durante una noche y el producto obtenido se disolvió en una mezcla de agua:acetonitrilo (1:1), para su purificación por HPLC.

- **Purificación del péptido lineal RGD por HPLC**

La purificación por HPLC se realizó, en un cromatógrafo equipado con una bomba Perkin-Elmer LC 200 con un detector UV (LC 290) y una columna semipreparativa Supelco, Discovery Bio, wide pore C18 (25 cm x 10 nm, 10 µm). El gradiente utilizado fue el siguiente: 55% de eluyente A a

100% de eluyente B, en 35 min a una longitud de onda de 220 nm, donde el eluyente A es 0,1% de TFA en agua y el eluyente B es 0,1% de TFA en acetonitrilo.



Sólido blanco (87%). **Tiempo de retención:** 10,5 min.

### Síntesis del péptido cRGD

Se preparó una disolución del péptido lineal RGD y HATU (1,5 mmol) en diclorometano. Esta disolución se adicionó gota a gota, sobre una disolución de DIPEA (12 mmol) en 1 ml de diclorometano. Luego la mezcla de reacción se llevó a sequedad y el crudo obtenido se purificó por HPLC (TFA(ac) 0,1% (A) y CH<sub>3</sub>CN/TFA 0,1% (B). Método: 45%B a 100%B en 35 min, a  $\lambda=220$  nm), para obtener el péptido cíclico, donde aún algunos de los aminoácidos tienen grupos protectores (Pbf, *t*-but, ivDde, etc.).

Para eliminar los grupos protectores restantes, se empleó una disolución de hidracina al 2% en DMF durante 1 h, esta disolución se llevó a sequedad bajo presión reducida. Al crudo obtenido se añadió una mezcla de TFA al 95% + 2,5% H<sub>2</sub>O + 2,5% TIS y se dejó reaccionar durante 1½ h a temperatura ambiente. Después se concentró al mínimo volumen bajo corriente de nitrógeno y por último se produjo la precipitación con éter frío.

El sólido obtenido se purificó por HPLC, usando las mismas condiciones empleadas para la purificación del péptido lineal.

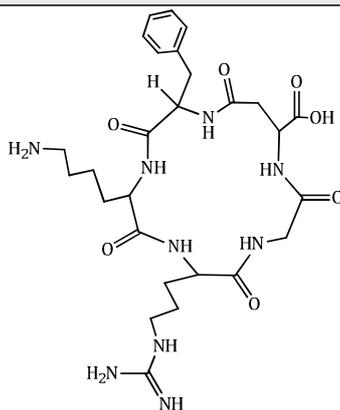
---



---

Péptido cíclico RGD (**cRGD**)

---



Sólido blanco (40%). **Tiempo de retención:** 19,2 min. **MS (ESI):** 604,6 [M+H]<sup>+</sup>uma.

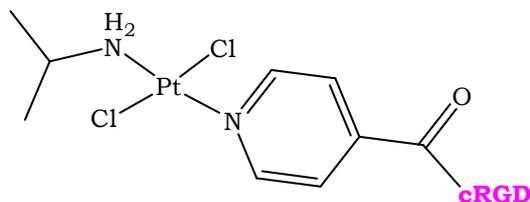
### 5.3.3 Síntesis de complejos *trans*-(Pt-cRGD)

#### 5.3.3.1 Síntesis de complejos *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(cRGD)] (Pt(II)-cRGD)

Se agregó gota a gota una disolución de EDC (1,2 equivalentes) en diclorometano, a un matraz con una disolución del complejo de platino (2 mg, 0,0045 mmol) y N-hidroxisuccinimida (NHS, 1,0 mg, 0,0089 mmol) en DCM. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación durante 7 días. Luego la mezcla de reacción se llevó a sequedad, el crudo obtenido se lavó con agua y se secó a vacío. El crudo se disolvió en DMF y se reservó para más adelante (complejo de Pt(II) activado).

En otro matraz se disolvió el péptido cíclico en DMF y se añadió DIPEA, seguidamente, sobre esta mezcla se agregó la disolución del complejo activado, gota a gota y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se llevó a sequedad y el crudo se purificó por HPLC.

La purificación por HPLC se llevó a cabo, empleando como eluyentes, H<sub>2</sub>O(A) y ACN(B), de 10%B a 50%B en 30 min, a  $\lambda=220$  nm.

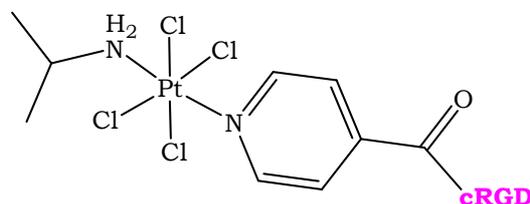
*trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(cRGD)] (**Pt(II)-cRGD**)

Sólido blanco (22%). **MS (ESI)**:1033,5 uma [M+H]<sup>+</sup>.

### 5.3.3.2 Síntesis de complejos *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(ipa)(cRGD)] (**Pt(IV)-cRGD**)

Se disolvió el complejo de partida de platino(IV) (0,01 mmol) en diclorometano y se activó el grupo carboxílico (1,2 eq. de EDC.HCl y NHS) dejándolo reaccionar a temperatura ambiente, durante 16 h en atmósfera inerte. Luego se evaporó el disolvente y se obtuvo un sólido amarillo, que se lavó con agua, para eliminar la urea. El sólido se disolvió en acetonitrilo y posteriormente se añadió gota a gota una disolución de DMF que contiene, el péptido cíclico (0,003 g, 0,005 mmol) y 10 equivalentes de NaHCO<sub>3</sub> y se dejó reaccionar 3 h. Transcurrido este tiempo la reacción se llevó a sequedad y el crudo se purificó por HPLC.

El crudo de la reacción se disolvió en agua y se purificó por RP-HPLC, usando como eluyentes agua (A) y ACN (B) con un gradiente de 55% a 100% de B en 35 min ( $\lambda=220$  nm).

*trans*-[PtCl<sub>4</sub>(ipa)(cRGD)] (**Pt(IV)-cRGD**)

Sólido blanco (10%). **Tiempo de retención:** 25,0 min. **MS (ESI)**: 1146,8 [M+ACN+H]<sup>+</sup>.

### **5.3.4 Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos *trans*-Pt(II)-cRGD y *trans*-Pt(IV)-cRGD**

La actividad citotóxica fue estudiada con células de cáncer de mama (MDAMB231 y MCF7), carcinoma de ovario (A2780 y SKOV3), adenocarcinoma humano (A549) y células de vena umbilical humana endotelial (HUVEC)

La línea celular de cáncer de ovario humano A2780 se obtuvo del Centro Europeo de Cultivos Celulares ECACC (Salisbury, Reino Unido) y se cultivaron en medio RPMI que contiene GlutaMaxI suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina (todos de Invitrogen), a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> (Heraeus, Alemania). Para la evaluación de la inhibición del crecimiento, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (Costar, Integra Biosciences, Cambridge, MA) a una concentración de 15.000 células/pocillo y se cultivaron durante 24 h en medio completo. Las disoluciones de los compuestos se prepararon por dilución de una muestra recién preparada del complejo (10<sup>-2</sup> M en DMSO) del compuesto correspondiente en medios acuosos (RPMI o DMEM para la A2780 y SKOV-3, respectivamente). Después, se añadieron las diluciones de los compuestos a los pocillos (100 µl) para obtener una concentración final que oscila entre 0 y 200 µM, y las células se incubaron durante 72h. Después de la exposición al fármaco, se añadió 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a las células para una concentración final de 0,25 mg ml<sup>-1</sup> se incubaron durante 2 h, a continuación, el medio de cultivo se retiró y los cristales de color violeta se disolvieron en DMSO. La densidad óptica de cada pocillo (placas de 96 pocillos) se cuantificó tres veces a  $\lambda=540$  nm usando un lector de placas de múltiples pocillos, y el porcentaje de células supervivientes se calcularon a partir de la relación de la absorbancia de las células tratados con las células no tratadas. El valor de IC<sub>50</sub> se calculó como la concentración de la reducción de la proliferación de las células en un 50% y se presenta como una media ( $\pm$  E) de al menos tres experimentos independientes.

## **5.4 Bibliografía**

- <sup>1</sup> R. O. Hynes, *Cell*, **1992**, 69, 11.
- <sup>2</sup> A. P. Gilmore, *Cell Death Differ.*, **2005**, 12, 1473.
- <sup>3</sup> D. Cox, T. Aoki, J. Seki, Y. Motoyama, K. Yoshida, *Med. Res. Rev.*, **1994**, 14, 195.
- <sup>4</sup> S. L. Teitelbaum, *Science*, **2000**, 289, 1504.
- <sup>5</sup> G. G. Bishop, J. A. McPherson, J. M. Sanders, S. E. Hesselbacher, M. J. Feldman, C. A. McNamara, L. W. Gimple, E. P. Powers, S. A. Mousa, I. J. Sarembock, *Circulation*, **2001**, 103, 1906.
- <sup>6</sup> C. M. Storgard, D. G. Stupack, A. Jonczyk, S. L. Goodman, R. I. Fox, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.*, **1999**, 103, 47.
- <sup>7</sup> S. M. Albelda, C. W. Smith, P. A. Ward, *FASEB J.*, **1994**, 8, 504.
- <sup>8</sup> P. Clezardin, *Cell. Mol. Life Sci.*, **1998**, 54, 541.
- <sup>9</sup> B. P. Eliceiri, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.*, **1999**, 103, 1227.
- <sup>10</sup> J. S. Kerr, A. M. Slee, S. A. Mousa, *Expert Opin. Invest. Drugs*, **2002**, 11, 1765.
- <sup>11</sup> S. E. LaFlamme, K. L. Auer, *Semin. Cancer Biol.*, **1996**, 7, 111.
- <sup>12</sup> D. Cheresh, *Cancer Metast Rev*, **1991**, 10, 3.
- <sup>13</sup> B. Felding-Habermann, B. M. Mueller, C. A. Romerdahl, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.*, **1992**, 89, 2018.
- <sup>14</sup> M. Gurrath, G. Mueller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 210, 911.
- <sup>15</sup> E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science*, **1987**, 238, 491.
- <sup>16</sup> G. Gasparini, P. C. Brooks, E. Biganzoli, P. B. Vermeulen, E. Bonoldi, L. Y. Dirix, G. Ranieri, R. Miceli, D. A. Cheresh, *Clin. Cancer Res.*, **1998**, 4, 2625.
- <sup>17</sup> V. Brower, *Nat. Biotechnol.*, **1999**, 17, 963.
- <sup>18</sup> P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell*, **1994**, 79, 1157.
- <sup>19</sup> M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathae, E. Lohof, G. Hoelzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3033.
- <sup>20</sup> P. A. Burke, S. J. DeNardo, L. A. Miers, K. R. Lamborn, S. Matzku, G. L. DeNardo, *Cancer Res.*, **2002**, 62, 4263.
- <sup>21</sup> S. V. Bhagwat, J. Lahdenranta, R. Giordano, W. Arap, R. Pasqualini, L. H. Shapiro, *Blood*, **2001**, 97, 652.
- <sup>22</sup> W. Hansel, F. Enright, C. Leuschner, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2007**, 260-262, 183.
- <sup>23</sup> A. V. Schally, A. Nagy, *Life Sci.*, **2003**, 72, 2305.
- <sup>24</sup> R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149.
- <sup>25</sup> M. Galanski, B. K. Keppler, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2007**, 7, 55.

- <sup>26</sup> P. G. Baraldi, R. Romagnoli, A. Duatti, C. Bolzati, A. Piffanelli, N. Bianchi, C. Mischiati, R. Gambari, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 1397.
- <sup>27</sup> M. S. Robillard, N. P. Davies, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, J. Reedijk, V. Murray, *J. Inorg. Biochem.*, **2003**, *96*, 331.
- <sup>28</sup> M. S. Robillard, M. Bacac, H. van den Elst, A. Flamigni, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, J. Reedijk, *J. Comb. Chem.*, **2003**, *5*, 821.
- <sup>29</sup> M. S. Robillard, S. van Alphen, N. J. Meeuwenoord, B. A. J. Jansen, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, J. Reedijk, *New J. Chem.*, **2005**, *29*, 220.
- <sup>30</sup> S. Mukhopadhyay, C. M. Barnes, A. Haskel, S. M. Short, K. R. Barnes, S. J. Lippard, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 39.
- <sup>31</sup> L. Gaviglio, A. Gross, N. Metzler-Nolte, M. Ravera, *Metallomics*, **2012**, *4*, 260.
- <sup>32</sup> R. M. Medina, J. Rodriguez, A. G. Quiroga, F. J. Ramos-Lima, V. Moneo, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, M. J. Macazaga, *Chem. Biodiversity*, **2008**, *5*, 2090.
- <sup>33</sup> M. J. Macazaga, J. Rodriguez, A. G. Quiroga, S. Peregina, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger, R. M. Medina, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 4762.
- <sup>34</sup> K. Irie, Y. Yanai, H. Ohigashi, P. A. Wender, B. L. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 353.
- <sup>35</sup> J. R. L. Priqueler, I. S. Butler, F. D. Rochon, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **2006**, *41*, 185.
- <sup>36</sup> S. L. Goodman, H. J. Grote, C. Wilm, *Biol. Open*, **2012**, *1*, 329.

**Capítulo 6.**  
**Complejos heterobimetálicos**



Este capítulo recoge la descripción de la síntesis y caracterización de nuevos complejos heterobimetálicos de Pt-Re y Pt- $^{99m}\text{Tc}$ , con el propósito de que, a través de la combinación de estos centros metálicos, podamos tener un efecto sinérgico, entre las propiedades quimioterapéuticas de los complejos de Pt(II) y los efectos radiotóxicos del  $^{99m}\text{Tc}$ . Además de poder utilizar estos complejos, para estudiar su distribución en la célula cancerígena (Figura 6.1).

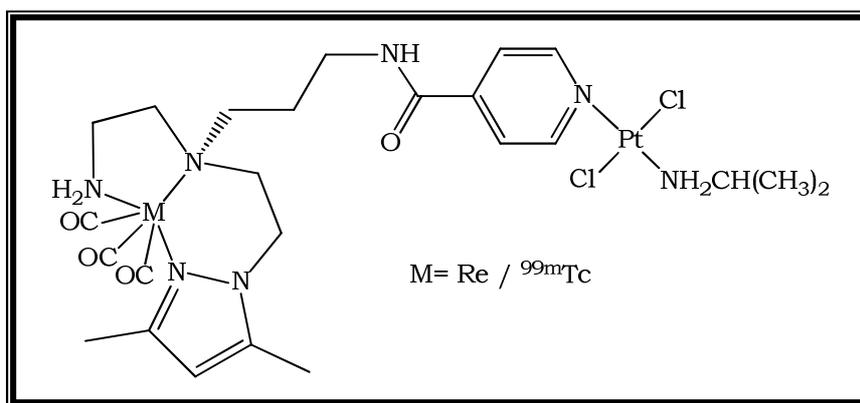


Figura 6.1. Estructura de los complejos Pt-Re y Pt- $^{99m}\text{Tc}$

## 6.1 Introducción

El tratamiento del cáncer con radiometales, está ganando relevancia como terapia alternativa a las metodologías convencionales, tales como cirugía, radioterapia externa y quimioterapia.<sup>1</sup> De hecho, varios metales radioactivos se aplican rutinariamente en medicina nuclear de diagnóstico, en particular los que emiten rayos gamma, tales como  $^{99m}\text{Tc}$  o  $^{111}\text{In}$ . Por tanto, sus complejos con ligandos transportadores biológicamente activos, también podrían utilizarse en terapia específica para tumores. Se han publicado algunos resultados prometedores con complejos de  $^{111}\text{In}$  que contienen péptidos bioactivos.<sup>2-3</sup>

El objetivo del diseño de complejos multifuncionales con estos metales radioactivos, es que incluyan una parte capaz de unirse al ADN, un transportador del complejo al núcleo celular, y/o un vector de búsqueda que permita localizar el tumor.<sup>4-5</sup> La combinación de estas propiedades, puede proporcionar un reconocimiento específico de las

células neoplásicas y promover la internalización de los complejos, mientras que se espera también, aumentar la unión al ADN.

Los radiofármacos, son medicamentos que contienen un radionúcleido en su composición, y se utilizan en medicina nuclear para diagnóstico y terapia. Para el diagnóstico, por ejemplo, la radiación gamma ( $\gamma$ ) o radionucleidos emisores de positrones, son adecuados para la recogida de imágenes gracias a la emisión de un fotón único en tomografías SPECT (Single-photon emission computed tomography)<sup>6</sup> o en la tomografía PET (photon emission tomography)<sup>7</sup>, respectivamente (Figura 6.2). Los radiofármacos en uso clínico para SPECT son complejos de  $^{99m}\text{Tc}$  mayoritariamente, debido a sus propiedades químicas ideales, su bajo coste y su conveniente disponibilidad gracias a los generadores comerciales de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ . Para la terapia, los radiofármacos deben contener radionucleidos, emisores de partículas ionizantes (Electrones Auger, partículas  $\beta$  o  $\alpha$ ), para ser transportados y producir daño en las células tumorales.

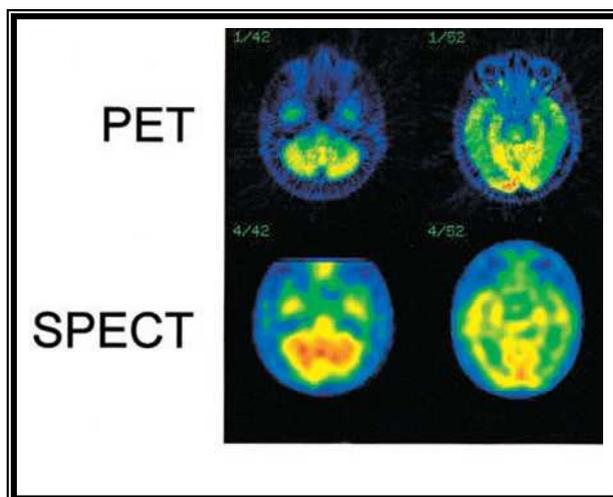


Figura 6.2. Imágenes tomadas a un paciente de Alzheimer con PET y SPECT.

Los compuestos organometálicos tienen un enorme potencial, en la química radiofarmacéutica, es un campo importante en el que los metales empleados son mayormente: galio, indio, cobre y algunos de la familia de los lantánidos, cuyos compuestos más relevantes son complejos de coordinación.<sup>8-9</sup> Sin embargo, los complejos organometálicos de  $^{99m}\text{Tc}$  y Re, han adquirido una creciente importancia, impulsada por la facilidad de

poder preparar precursores del tipo *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M= Re, <sup>99m</sup>Tc) en disolución acuosa.<sup>10</sup>

### 6.1.1 Re y <sup>99m</sup>Tc en radiofarmacia

Durante décadas el único compuesto organometálico en uso clínico, fue el sestamibi, un catión lipófilo de Tc(I) estabilizado por seis ligandos isonitrilo: [<sup>99m</sup>Tc(CNR)<sub>6</sub>]<sup>+</sup> (R = CH<sub>2</sub>C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>). Este radiofármaco se comercializa bajo la marca Cardiolite y se utiliza como un agente de perfusión para la formación de imágenes del miocardio (Figura 6.3).<sup>11</sup> Junto con cisplatino, el sestamibi se considera el complejo sintético con más éxito de uso médico ya que, también se utiliza para la monitorización no invasiva, en la detección precoz de algunos tipos de cáncer y como fármaco transportador. Sin embargo, el sestamibi no era un buen precursor para entrar en la química de Tc(I) en medio acuoso.<sup>12</sup>

Alberto y colaboradores, llevaron a cabo en la década de 1990, algunos estudios de la química en disolución acuosa de complejos de <sup>99m</sup>Tc, y lograron la síntesis del complejo organometálico *fac*-[<sup>99m</sup>Tc-(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, que a diferencia del sestamibi, es un excelente precursor para el desarrollo de radiofármacos en disolución acuosa.<sup>13</sup> Este complejo ha suscitado un gran interés, abriendo el diseño de radiofármacos organometálicos basados en Tc(I), como una alternativa a las estrategias clásicas sobre la base de los núcleos [<sup>99m</sup>Tc(O)]<sup>3+</sup>, *trans*-[<sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, [<sup>99m</sup>TcN<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, entre otros.

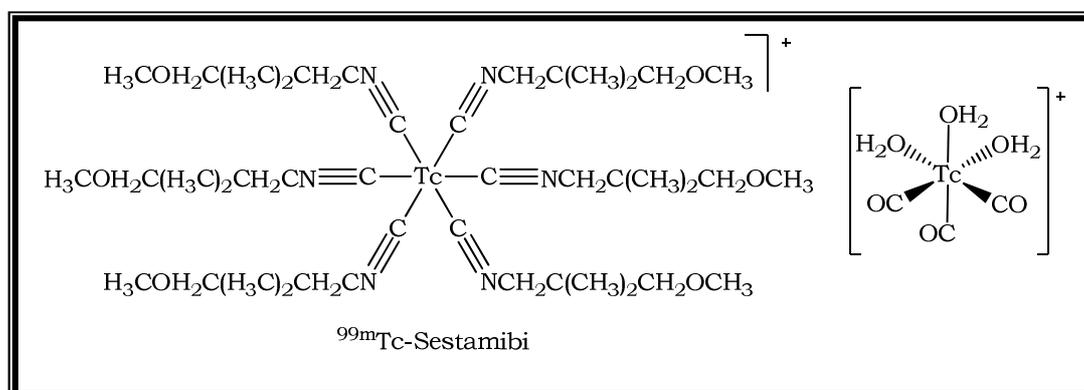


Figura 6.3. Estructura de sestamibi y *fac*- [<sup>99m</sup>Tc-(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>.

Los complejos de renio, se utilizan normalmente como congéneres sustitutos del  $^{99m}\text{Tc}$ . Las similitudes fisico-químicas de estos dos elementos, evita el uso excesivo del  $^{99m}\text{Tc}$  y sus emisiones  $\beta$ , y se beneficia del uso sencillo e inocuo del renio. Tc y Re también pueden considerarse, una "pareja" adecuada para la obtención de compuestos radiomarcados, para imágenes nucleares o en la terapia con radionucleidos, que debe realizarse en solución acuosa.

A pesar de sus diferencias en términos cinéticos en reacciones de intercambio y reacciones redox, Re y Tc presentan propiedades fisicoquímicas parecidas, dando en la mayoría de los casos complejos isoestructurales.<sup>14</sup> Sobre esta base "isoestructural" de los compuestos de Re y Tc, se pueden lograr los llamados agentes teranósticos, que pueden suministrar partículas ionizantes ( $^{186}\text{Re}/^{188}\text{Re}$ ) para el tratamiento de tumores y al mismo tiempo, obtener imágenes ( $^{99m}\text{Tc}$ ) para hacer un diagnóstico, y así superar las diferencias en la biodistribución y la selectividad que existe actualmente entre las distintas imágenes y las herramientas terapéuticas.

### 6.1.2 Síntesis de precursores Re y $^{99m}\text{Tc}$

Como se mencionó anteriormente para el tecnecio, el renio tiene también como producto de partida, el  $\text{fac-}[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ . La síntesis del  $\text{fac-}[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ , sólo es posible mediante la reducción de  $[\text{}^{188}\text{ReO}_4]^-$  con una combinación de  $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$  y amina borano ( $\text{BH}_3\text{-NH}_3$ ) (Figura 6.4).<sup>15</sup>

El precursor de tecnecio,  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ , se puede obtener mediante el tratamiento de  $\text{Na}[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]$  con  $\text{NaBH}_4$  en presencia de CO en disolución acuosa, aunque, el CO es un gas muy tóxico, y difícil de manejar. Este inconveniente se elimina con el uso de boranocarbonato de potasio ( $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$ ), ya que este compuesto reduce el Tc(VII) y al mismo tiempo actúa como fuente de CO, a través de unos mecanismos que no se conocen totalmente (Figura 6.4).<sup>16-17</sup>

Las diferencias entre los métodos de síntesis de los complejos de partida de Re y  $^{99m}\text{Tc}$ , no constituyen un impedimento para aprovechar las analogías entre ellos y obtener nuevos compuestos.

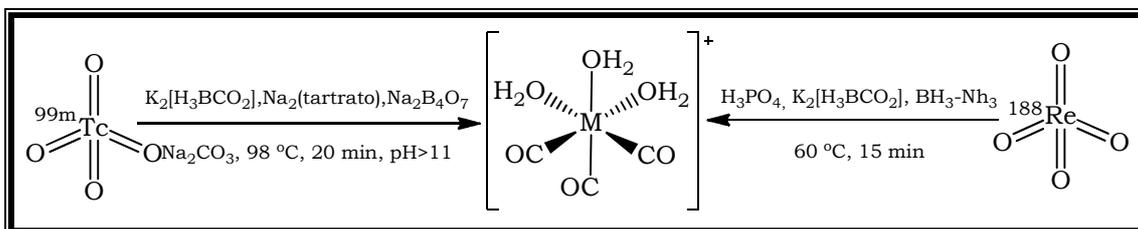


Figura 6.4. Esquema de síntesis de los complejos de partida de  $^{188}\text{Re}$  y  $^{99m}\text{Tc}$ .

Una de las ventajas más destacadas, de los complejos *fac*- $[\text{M}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  ( $\text{M} = \text{Re}$  o  $^{99m}\text{Tc}$ ), es la alta estabilidad de los grupos CO y la labilidad de las moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , frente a reacciones de sustitución, por lo que los quelantes tridentados, son muy buenos candidatos para la coordinación.

La naturaleza diluida de las soluciones de los complejos de  $^{99m}\text{Tc}$  ( $10^{-8}$ – $10^{-10}\text{M}$ ), hace que su caracterización estructural sea imposible por los métodos analíticos convencionales (como, análisis elemental, RMN y espectroscopia IR). Una de las formas más sencillas de superar este problema, es comparar el comportamiento cromatográfico de los complejos de  $^{99m}\text{Tc}$  con los correspondientes compuestos preparados en escala "macroscópica" con Re natural.<sup>14</sup>

### 6.1.3 Complejos de Re y Tc con ligandos pirazolilo

Los ligandos coordinantes basados en pirazolilo, presentan una amplia gama de características como: alta estabilidad, solubilidad en agua, diferentes posibilidades de coordinación y fácil funcionalización. Este conjunto de características, le confieren un alto grado de versatilidad como quelantes, haciéndolos bastante adecuados para la estabilización con complejos *fac*- $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$  ( $\text{M} = \text{Re}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ), para la conjugación con biomoléculas de diferente naturaleza, y para la modulación de la farmacocinética de los complejos finales.

Una ventaja de estos sistemas es su versatilidad química, que permite un fácil control del tamaño y la lipofilia de los complejos, mediante la variación de los sustituyentes en el anillo aromático, y diferentes posibilidades de acoplamiento de biomoléculas, con retención de la esfera de coordinación. Tal acoplamiento puede realizarse, ya sea mediante el anillo pirazolilo o con una cadena lateral alifática unida al ligando, mediante el uso de los grupos funcionales adecuados.<sup>18</sup>

Santos y colaboradores,<sup>19-20</sup> han sintetizado y caracterizado algunos ligandos pirazolilo, que combinan un conjunto de átomos N, N, N dadores capaces de coordinarse al centro metálico y que además contienen un brazo colgante con un grupo funcional, que se puede conjugar con biomoléculas o funcionalizar en otro tipo de derivados. Estos quelantes pueden reaccionar con precursores adecuados, para formar complejos del tipo *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>(κ<sup>3</sup>-L)]<sup>+</sup> (M= <sup>99m</sup>Tc y Re), en los que el ligando actúa como tridentado, a través de los átomos de nitrógeno (Figura 6.5).

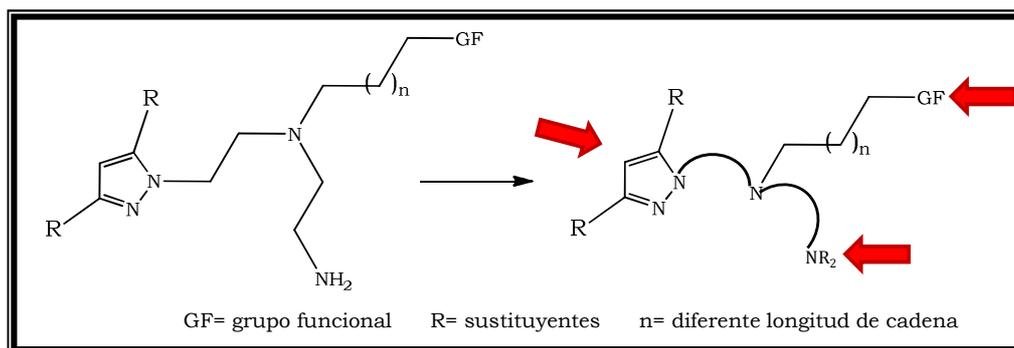


Figura 6.5. Sitios de coordinación o de posible funcionalización del ligando pirazol.

## 6.2 Discusión de resultados

### 6.2.1 Síntesis de los compuestos de partida

#### 6.2.1.1 Síntesis del complejo de trans-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(4-pic)]

El complejo de platino utilizado para acoplarse posteriormente a los complejos de M-pirazolilo (M=Re o <sup>99m</sup>Tc), fue sintetizado por el procedimiento descrito en el del capítulo 5 (sección 5.3.2.1).

#### 6.2.1.2 Síntesis del ligando pirazolilo

La síntesis del ligando pirazolilo se realizó empleando como material de partida el 3,5-dimetilpirazol y siguiendo el esquema que se muestra a continuación (Figura 6.6):

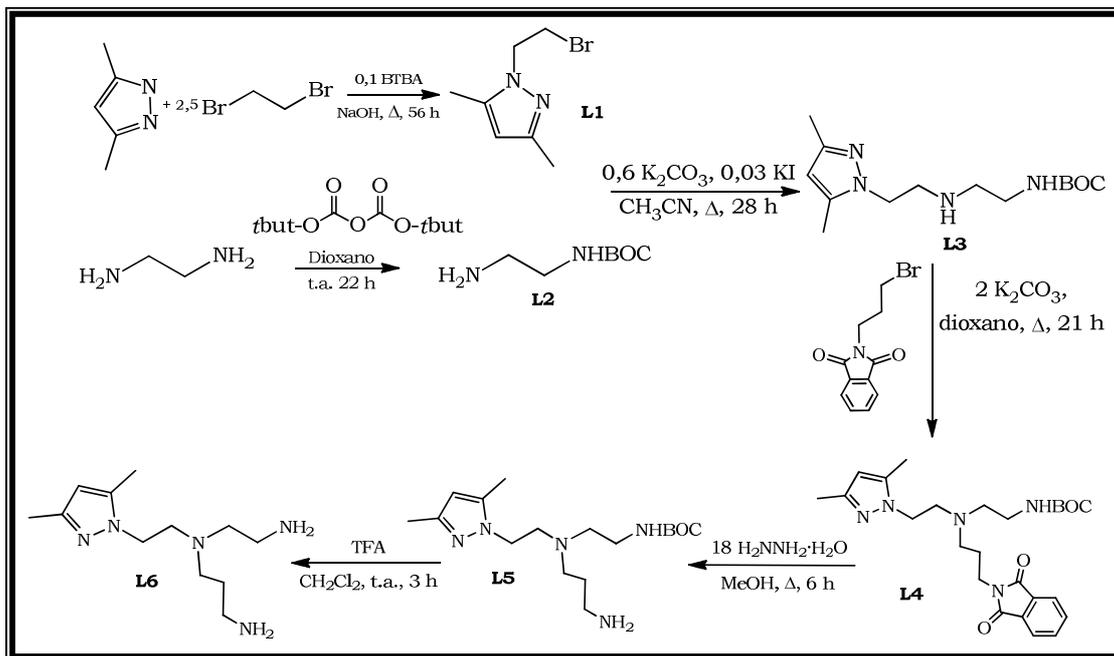


Figura 6.6. Esquema de síntesis del ligando pirazolilo.

Cada uno de los pasos de síntesis se describe con más detalle a continuación:

- **Síntesis del N-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazol (L1)**

La síntesis del sustrato pirazol N-sustituido, se realizó siguiendo el método descrito en la bibliografía,<sup>21-22</sup> mediante la alquilación del 3,5-dimetilpirazol, en presencia de un exceso de 1,2-dibromoetano y usando bromuro de tetrabutil amonio, como catalizador de transferencia de fase (Figura 6.7), lo que facilita la migración de uno de los reactivos, de una fase a otra, donde se produce la reacción.

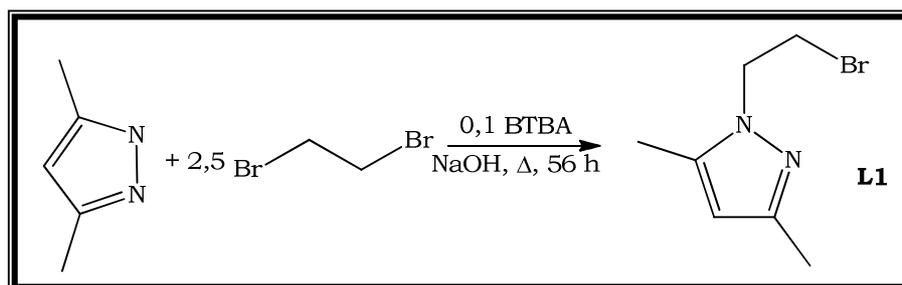


Figura 6.7. N-alquilación del 3,5-dimetilpirazol.

El producto **L1**, se purificó por cromatografía de columna usando como eluyente acetato de etilo. Se caracterizó por <sup>1</sup>H-RMN y se obtuvo con un buen rendimiento, en comparación a los rendimientos publicados anteriormente.

- **Síntesis de N-ter-butil-2-aminoetil carbamato (L2)**

La protección del grupo amino del 1,2-diaminoetano, se llevó a cabo empleando *ter*-butildicarbamato, con el propósito de proteger sólo un grupo NH<sub>2</sub>, mediante la conversión a un grupo amida (Figura 6.8), para hacer ese nitrógeno menos nucleofílico.

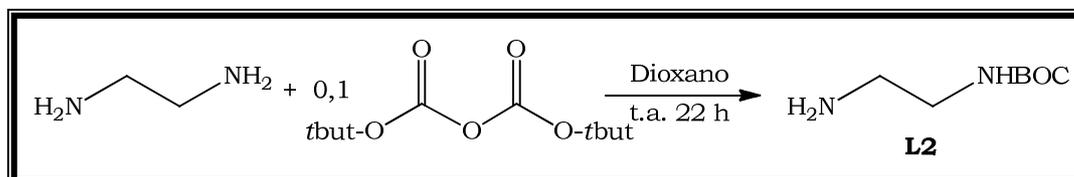


Figura 6.8. Protección de uno de los grupos NH<sub>2</sub> del 1,2-diaminotano con un grupo BOC.

Se eligió BOC, ya que este grupo protector, es ampliamente utilizado con grupos amino, aunque luego la desprotección tiene un inconveniente, debido a que las amidas son poco reactivas y la hidrólisis de este grupo

hay que efectuarla en condiciones de alta basicidad (o acidez), que pueden afectar a otros grupos funcionales presentes en la estructura del complejo.

Así el ligando monoprottegido, sólo se consiguió por adición lenta y a baja temperatura de una disolución de la diamina sobre una disolución de *ter*-butildicarbamato, y luego la reacción continuó a temperatura ambiente. El producto **L2** se caracterizó por <sup>1</sup>H-RMN y se obtuvo con un buen rendimiento (70%).

- **Síntesis de *ter*-butil-(2-{2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil}amino) etil) carbamato (L3)**

El ligando **L3** se obtuvo, por medio de una reacción de N-alquilación de la amina primaria (**L2**), con el haluro de alquilo **L1** en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y KI (Figura 6.9). La presencia de KI en cantidades catalíticas favorece la reacción, probablemente debido al hecho de que el KI sustituye al bromuro del N-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazol (**L1**), convirtiéndolo en un derivado de yodo que es capaz de reaccionar más fácilmente con el nucleófilo (**L2**).

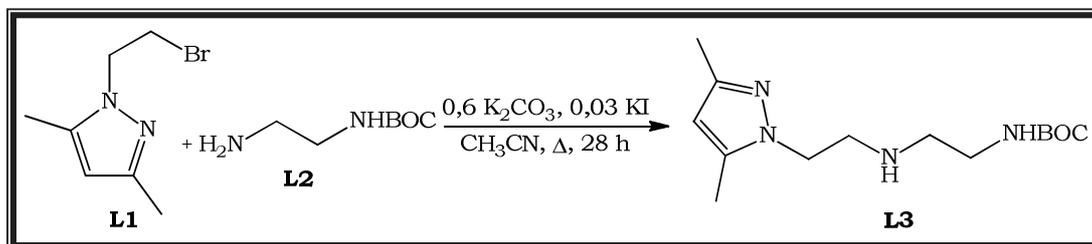


Figura 6.9. Reacción de alquilación de **L2** con el ligando **L1**.

La reacción se purificó por cromatografía de columna, con una mezcla de eluyentes CHCl<sub>3</sub>:MeOH: 9:1 y el producto final se caracterizó por <sup>1</sup>H-RMN en CDCl<sub>3</sub> (Figura 6.10).

La identificación de las señales correspondientes a los protones del ligando pirazol, fácilmente detectables como el protón H<sub>b</sub> y los dos grupos CH<sub>3</sub> (a,c) junto a la señal del grupo BOC a 1,33 ppm y el ligero desplazamiento a campo alto del protón del grupo NH (de 5,38 ppm en **L2** a 5,21 ppm en **L3**), confirma la presencia del producto de alquilación.

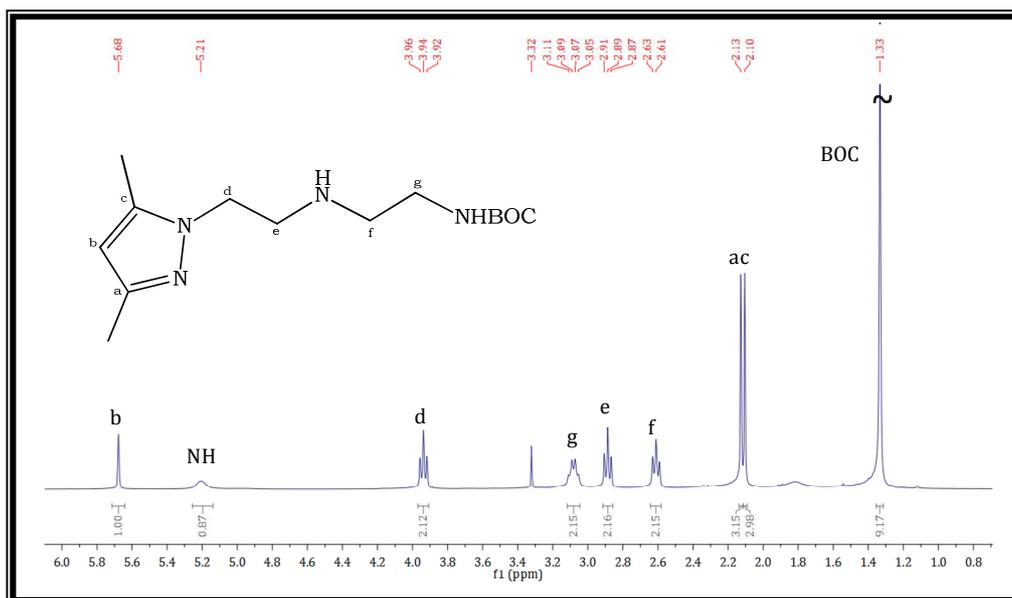


Figura 6.10. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para el ligando **L3** en  $\text{CDCl}_3$ .

- **Síntesis de *ter*-butil-(2-{[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil] (3-(1,3-dioxo-2,3-dihidro-1Hinden-2-il)propil)amino}etil) (L4)**

La síntesis del ligando **L4** se realizó, mediante la reacción del ligando **L3** con la *N*-(3-bromopropil)-ftalimida, en presencia de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  como base débil (Figura 6.11). Esta reacción es análoga a la de la síntesis de **L3** y su purificación por cromatografía de columna con acetato de etilo, da el producto deseado con un rendimiento del 64%.

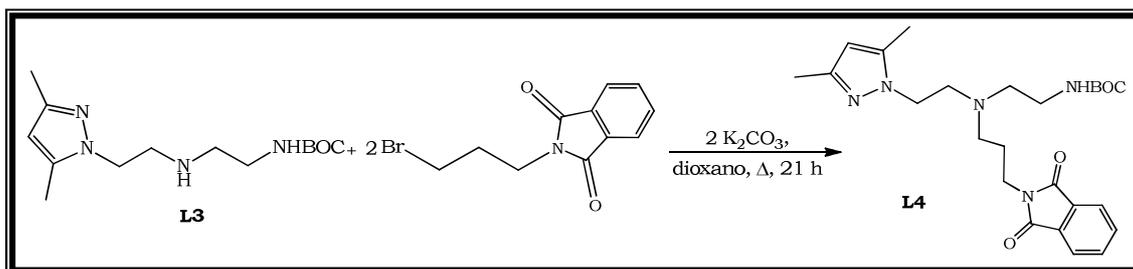


Figura 6.11. Síntesis del ligando **L4**.

La caracterización de **L4**, confirmó el enlace de la nueva cadena alquílica *n*-propil al grupo protector ftalimida, siendo una de las señales más significativas las observadas por  $^1\text{H}$ -RMN, en la zona aromática en torno a 7,6-7,8 ppm (Figura 6.12).

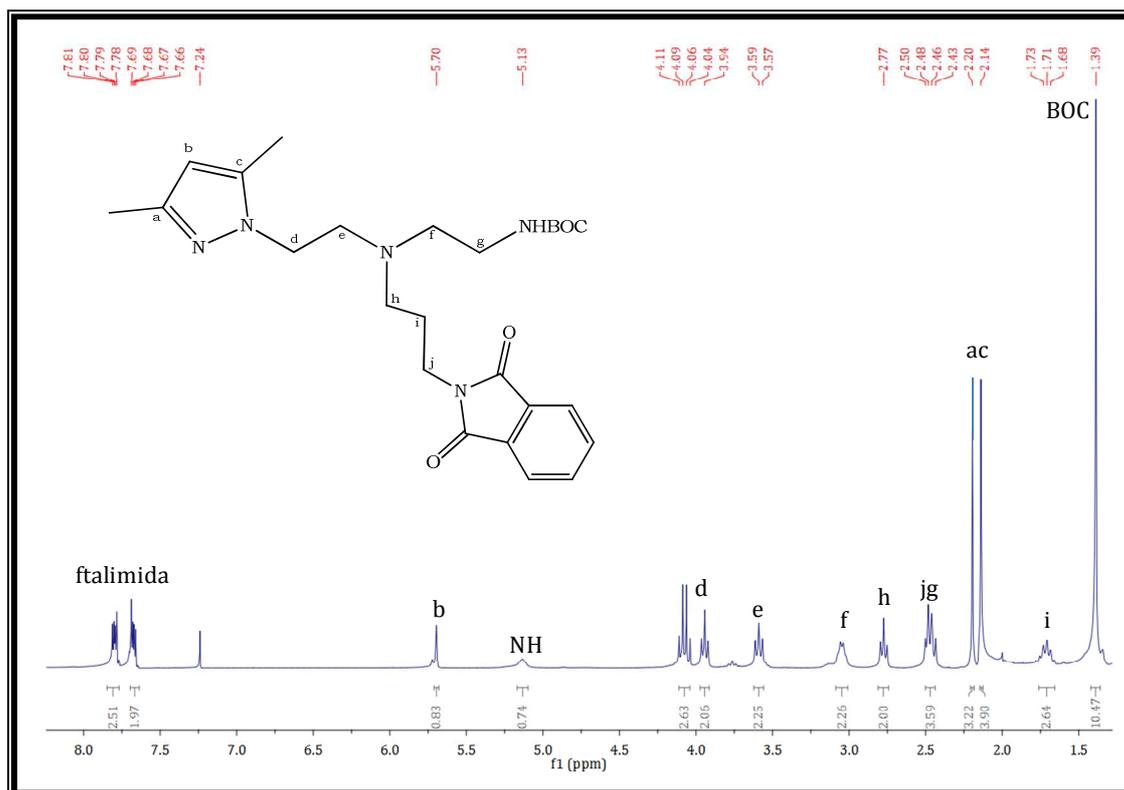


Figura 6.12. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del ligando **L4**.

## Reacciones de desprotección de grupo amina

### Síntesis de *ter*-butil-2-(3-aminopropil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil] amino}etil)carbamato (**L5**)

La ftalimida es un grupo protector clásico para aminas, cuya desprotección no siempre es sencilla. La hidrazina se utiliza comúnmente para eliminar el grupo ftalimida, y da lugar a la formación de subproductos insolubles, que permiten una fácil separación.

La síntesis del ligando **L5** se realizó utilizando un exceso de hidrato de hidracina, en metanol. El crudo de reacción obtenido fue acidificado y posteriormente neutralizado para eliminar los subproductos no deseados y finalmente obtener el ligando desprotegido con buen rendimiento (Figura 6.13).

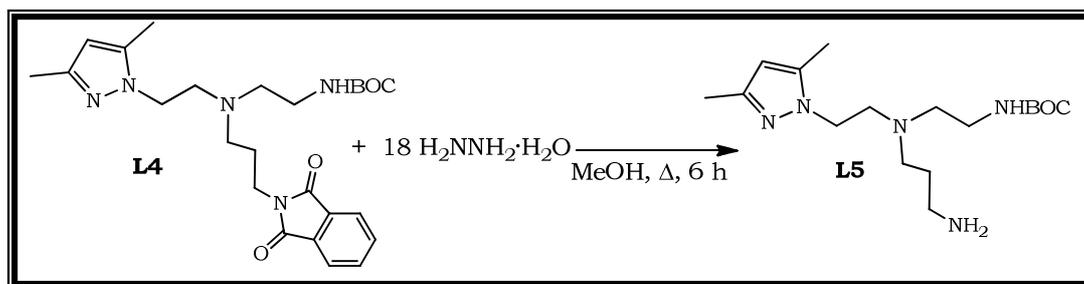


Figura 6.13. Reacción de desprotección del grupo ftalimida para obtener el ligando **L5**.

El compuesto **L5**, es el ligando que se utiliza para coordinar posteriormente al complejo de platino, mediante la formación de un enlace amida con el ácido 4-picolínico. Con este procedimiento y gracias a la presencia del grupo protector BOC, en la otra cadena alifática, garantizamos que la coordinación al platino, tenga lugar por el nitrógeno de la cadena *n*-propil.

#### Síntesis de **N<sup>1</sup>-(2-aminoetil)-N<sup>1</sup>-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil] propano-1,3-diamina (L6)**

El ligando **L6** se obtiene por la desprotección de la amina unida al grupo BOC, para lo cual se utilizó exceso de ácido trifluoroacético (TFA) concentrado (Figura 6.14).

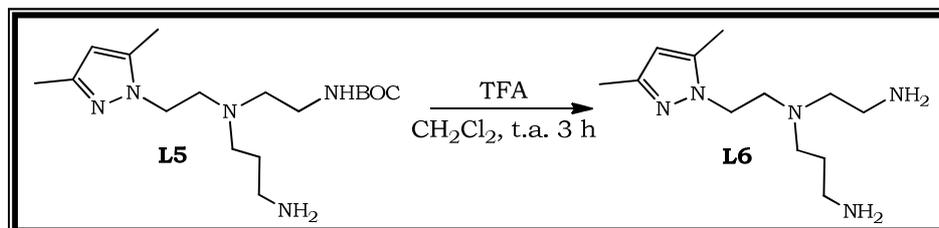
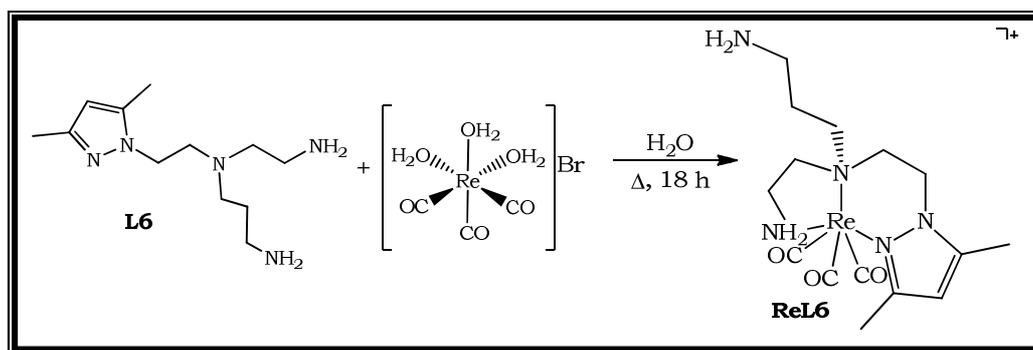


Figura 6.14. Reacción de desprotección del grupo BOC, para obtener el ligando **L6**.

La desprotección se produce con buen rendimiento y el producto se obtiene puro, por lo que la reacción no presenta mayores complicaciones.

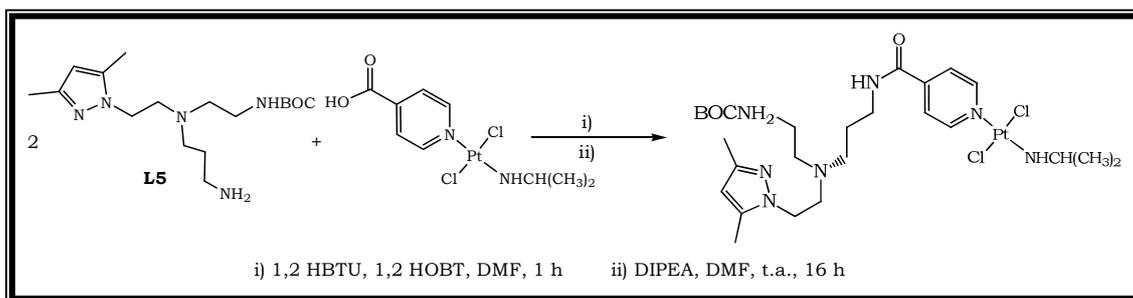
#### 6.2.1.3 Síntesis del complejo **fac-[Re(CO)<sub>3</sub>(κ<sup>3</sup>-Pz(NH<sub>2</sub>))]⁺**

La síntesis de complejo **fac-[Re(CO)<sub>3</sub>(κ<sup>3</sup>-Pz(NH<sub>2</sub>))]⁺ (ReL6)** se realizó, siguiendo el procedimiento ampliamente utilizado por Santos y colaboradores,<sup>23</sup> durante una estancia en su grupo de investigación (Figura 6.15).

Figura 6.15. Síntesis del complejo **ReL6**.

#### 6.2.1.4 Síntesis del complejo **PtL5**

La síntesis del complejo **PtL5** se llevó a cabo usando el complejo inicial de Pt(II) con el carboxilato y el ligando **L5**. Para ello fue necesario la presencia de los activadores HBTU (hexafluorofosfato de *N*-óxido de *N*-[(1*H*-benzotriazolil)-(dimetilamino)metilen]-*N*-metilaminio) y HOBT (1-hidroxibenzotriazol) (Figura 6.16).

Figura 6.16. Síntesis del complejo **PtL5**.

Estos activadores fueron seleccionados, después de intentar el acoplamiento con DCC y DIPEA, que o bien no daban el acoplamiento o se detectaban mezclas en las que el producto era minoritario y difícil de purificar. Sin embargo la activación del grupo carboxilo con HBTU, HOBT y DIPEA incrementa los rendimientos ya que forman especies cargadas, y así se resuelven los problemas de solubilidad de los intermedios en los casos anteriores. El mecanismo de acción de la activación del grupo carbonilo con estos agentes de acoplamiento se muestra en la figura 6.17.<sup>24</sup>

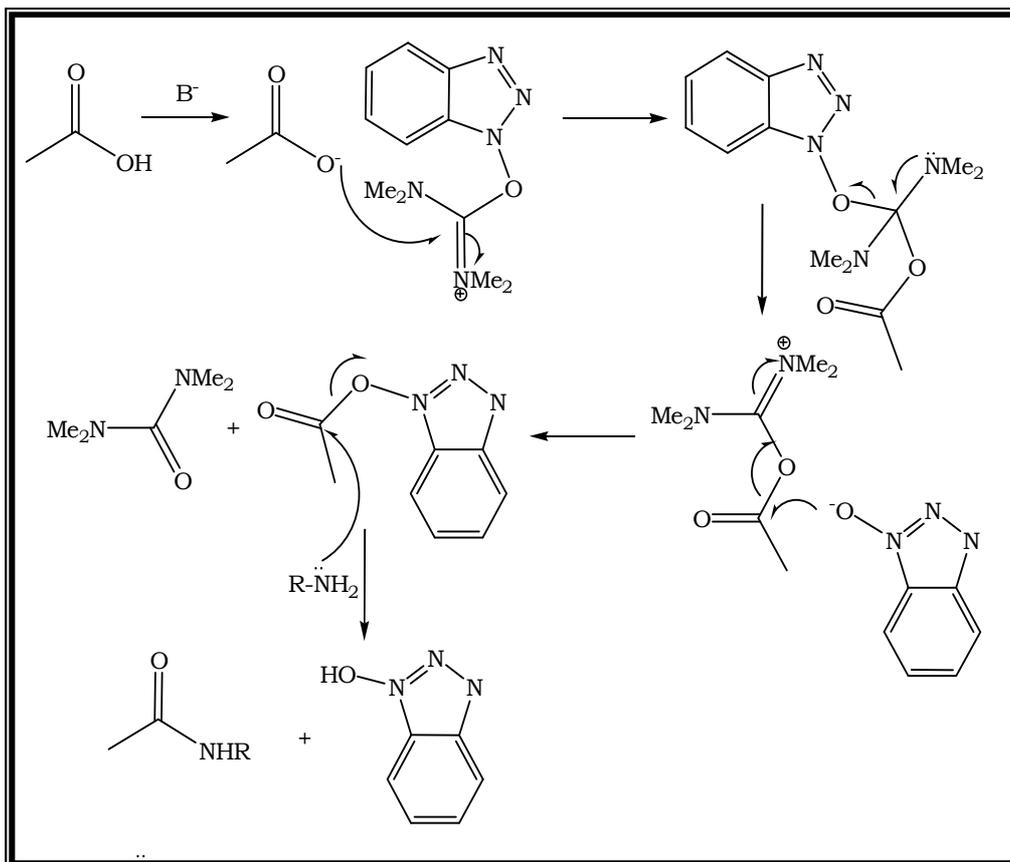


Figura 6.17. Mecanismo de activación de grupo carbonilo con HBTU y HOBT.

El complejo obtenido se purifica por cromatografía de columna, el producto se caracteriza por <sup>1</sup>H-RMN y aunque está bastante puro se observan algunas trazas de los compuestos de partida (alrededor de 2%) (Figura 6.18).

La presencia de platino se confirmó por <sup>195</sup>Pt-RMN, cuyo desplazamiento no se ve muy afectado por la coordinación del ligando **L5** ( $\delta_{\text{Pt}}(t\text{-PtCl}_2(\text{ipa})(4\text{pic})) = -2288,2$  ppm y  $\delta_{\text{Pt}}(\text{PtL5}) = -2079,7$  ppm). Por ESI-MS se observó el pico correspondiente al ion molecular [M-H]<sup>+</sup> en 770,4 uma, que confirma la estructura de la figura 6.18.

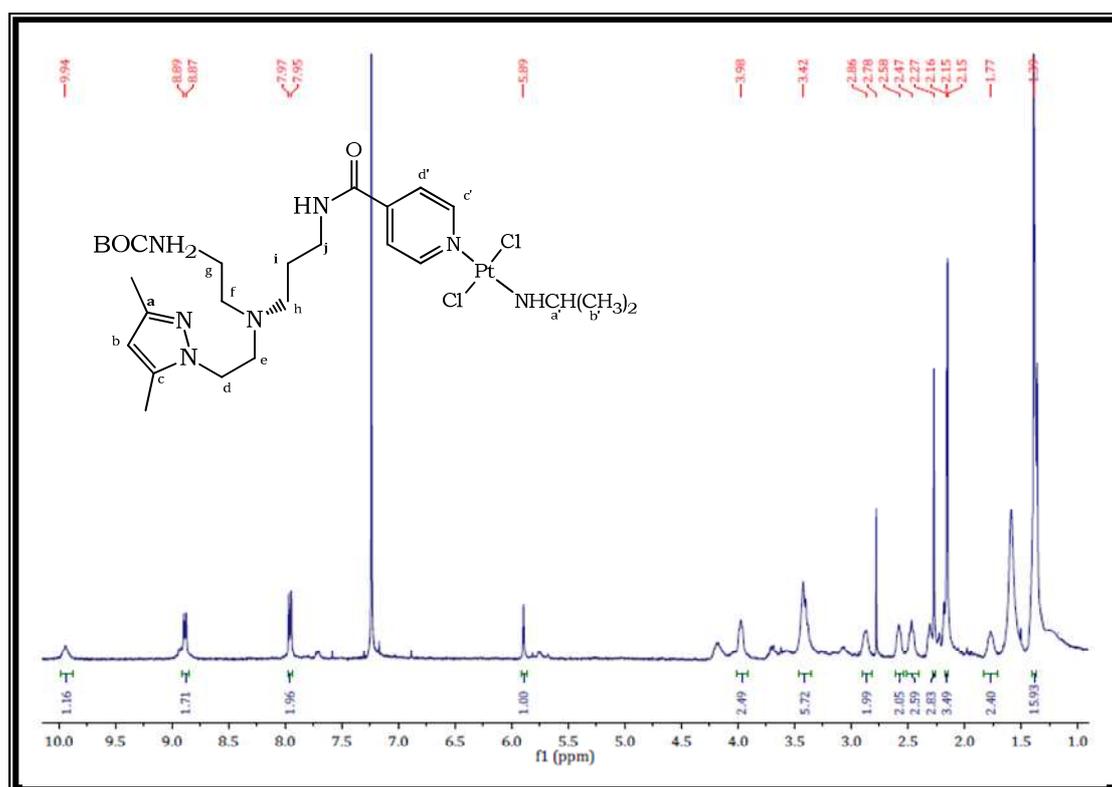


Figura 6.18. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del complejo **PtL5**.

### 6.2.1.5 Desprotección del complejo **PtL5**

La eliminación del grupo BOC protector del grupo  $\text{NH}_2$  del ligando **L5**, ha sido uno de los pasos más difíciles de esta síntesis, ya que para la desprotección de este grupo se necesitan condiciones ácidas. La desprotección se intentó con diferentes ácidos, como TFA, HCl en dioxano, HCl en metanol, ácido sulfúrico, etc., pero en casi todos los intentos se obtenía la sal de Magnus,<sup>25</sup>  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_4][\text{PtCl}_4]$  de color verde.

A continuación, se intentó la desprotección empleando HCl en éter a baja temperatura y en distintas proporciones, pero el resultado siempre era la transformación de **PtL5** en la sal de Magnus. Después de muchos intentos encontramos una forma de desprotección, empleando una adición muy lenta de HCl en metanol, con ayuda de un perfusor y bajo atmósfera inerte. La adición lenta, es el paso crucial para obtener el complejo desprotegido, una vez superado este paso, lo siguiente es la coordinación al  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

No obstante, la desprotección no es una reacción limpia, porque con las condiciones encontradas, siempre queda algo de producto protegido y para la separación de esta mezcla, aún se están probando diferentes condiciones.

### 6.2.2 Síntesis de los complejos heterobimetálicos

El complejo heterobimetálico (RePz(NH<sub>2</sub>)-PtCl<sub>2</sub>(ipa)(4-pic)), que contiene los centros metálicos de Pt(II) y *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> se obtuvo por acoplamiento del complejo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(ácido 4-picolínico)], a un extremo de la amina libre del complejo pirazolidiamina de renio tricarbonilo (Figura 6.19).

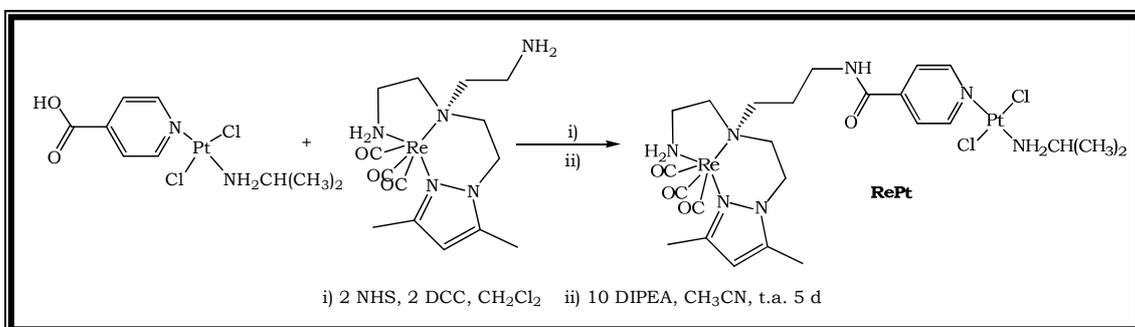


Figura 6.19. Reacción de acoplamiento del complejo de Pt(II) con **ReL6**.

Para llevar a cabo esta reacción fue necesaria la activación del ácido 4-picolínico del complejo de platino, con N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) siguiendo el procedimiento encontrado en la bibliografía.<sup>26-27</sup> La activación con DCC hace al carbono carboxílico, más susceptible al ataque nucleofílico de la amina libre del complejo de renio, (Figura 6.19) y la presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) contribuye a mejorar el rendimiento del complejo activado.

El crudo obtenido de la reacción del complejo **ReL6** y el complejo *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(4pic)], se purificó primero utilizando un cartucho Sep-Pak C18, que contiene una fase inversa e hidrófoba útil para separar compuestos polares y no polares. El producto obtenido no está totalmente puro, pero se pueden identificar tanto las señales correspondientes al ligando pirazol unido a Re, como la de los ligandos coordinados al platino (Figura 6.20).

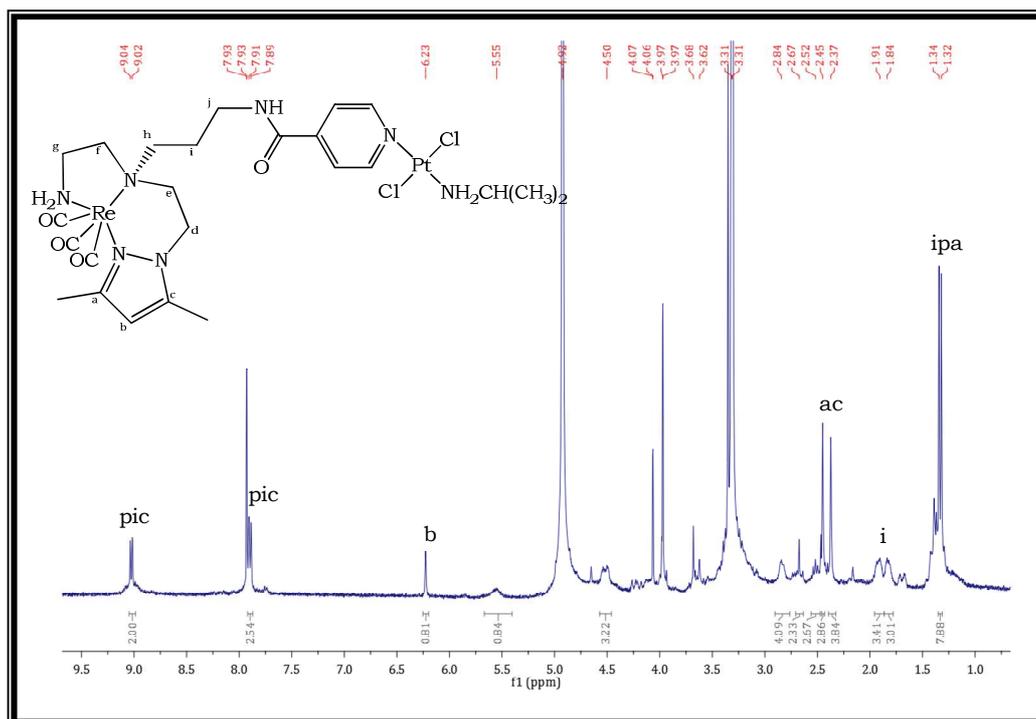


Figura 6.20. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del complejo **RePt**.

La purificación total del complejo **RePt**, ha resultado más complicada de lo esperado, se intentó purificar por HPLC, pero el complejo quedó retenido en la columna y no se pudo recuperar. Debido a la naturaleza de los complejos de platino(II), no es conveniente el uso de eluyentes acidificados con TFA, que se usan normalmente en la purificación de complejos de renio. Por lo que encontrar las condiciones ideales para la total purificación del complejo **RePt** no se ha logrado hasta ahora. El  $^{195}\text{Pt}$ -RMN, confirmó la presencia de una única especie de platino mostrando una señal a  $-2079,7$  ppm (Figura 6.21).

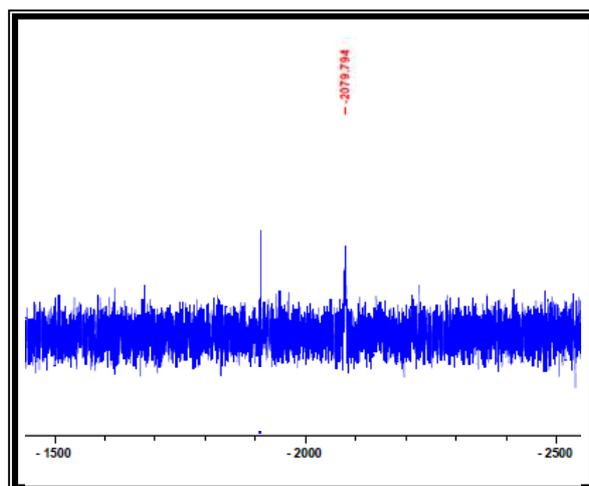


Figura 6.21. Espectro de  $^{195}\text{Pt}$ -RMN del complejo **RePt**.

### 6.3 Parte experimental

#### 6.3.1 Disolventes, reactivos y equipos empleados

En la mayoría de los casos, los disolventes empleados para la síntesis y purificación de los compuestos preparados en este capítulo, fueron utilizados sin tratamiento previo, excepto en los casos en los que fue necesario el uso de disolventes secos para el trabajo en atmosfera inerte. Los reactivos empleados y las casas comerciales donde fueron adquiridos se muestran en la tabla 6.A.

Tabla 6.A. Reactivos y casas comerciales.

Reactivo	Casa comercial	Reactivo	Casa comercial
3,5-dimetilpirazol	Sigma-Aldrich	TBAB	Fluka
1,2-dibromoetano	Aldrich	NaOH	Sigma-Aldrich
NaSO <sub>4</sub> (anhidro)	Sigma-Aldrich	dicarbonato de di-ter-butilo	Merck
1,2-diaminoetano	Fluka	MgSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich	N-(3-bromopropil)-ftalimida	Merck
Hidrato de hidrazina	Sigma-Aldrich	HCl	Fluka
TFA	Sigma-Aldrich	[Re(CO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ]Br	Aldrich
HBTU	Sigma-Aldrich	HOBT	Sigma-Aldrich
DIPEA	Sigma-Aldrich	HCl-MeOH	Aldrich
NHS	Aldrich	DCC	Sigma-Aldrich

Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN se registraron en un espectrómetro Varian Unity 200 MHz. Los desplazamientos químicos <sup>1</sup>H fueron referenciados con la señal residual del disolvente deuterado y en relación a tetrametilsilano (TMS) en el Instituto Tecnológico e Nuclear (ITN) de Lisboa. Y los espectros de <sup>195</sup>Pt-RMN se llevaron a cabo en el SIDI- UAM.

## 6.3.2 Síntesis de los compuestos de partida

### 6.3.2.1 Síntesis del complejo de platino

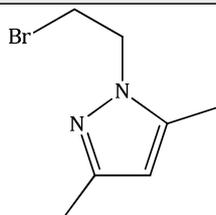
El complejo de partida de platino(II) fue preparado según el procedimiento descrito en el capítulo 5, sección 5.3.2.1.

### 6.3.2.2 Síntesis de los ligandos

- **Síntesis del N-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazol (L1)**

A un matraz que contiene 2,50 g de 3,5-dimetilpirazol (26 mmol), 840 mg de TBAB (bromuro de tetrabutilamonio, 2,60 mmol) y 55,5 ml de 1,2-dibromoetano (650 mmol), se añadieron 8 ml de una disolución acuosa de NaOH al 40%, y se puso a reflujo durante 56 h. Después, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se procedió a la separación de fases. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó bajo presión reducida. El producto se purificó por cromatografía de columna, empleando como eluyente: acetato de etilo.

N-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazol (L1)



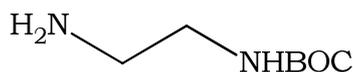
Aceite amarillo, (58%).  $\delta$ H (200,13 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 5,78 (1H, s, CH<sub>b</sub>-pz), 4,30 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 3,67 (2H, t, CH<sub>2</sub>-Br), 2,25 (3H, s, CH<sub>3</sub>(pz)), 2,10 (3H, s, CH<sub>3</sub>(pz)).  $R_f$  (silica-gel, acetato de etilo) = 0,8

- **Síntesis de N-ter-butil-2-aminoetil carbamato (L2)**

A una disolución de dicarbonato de di-ter-butilo (BOC) (20 g, 91,638 mmol) en dioxano seco (100 ml), se añadió gota a gota a temperatura ambiente una disolución de 1,2-diaminoetano (49 ml, 44,06 g, 733,104 mmol) en dioxano seco (100 ml). La mezcla se dejó en agitación durante 22

h, se eliminó el disolvente a presión reducida y al residuo obtenido se añadió agua (150 ml) y se filtró. El filtrado se extrajo con  $\text{CHCl}_3$  (4 x 50 ml) y después la capa orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se llevó a sequedad.

**N-ter-butoxicarbonilo-1,2-etanodiamina (L2)**

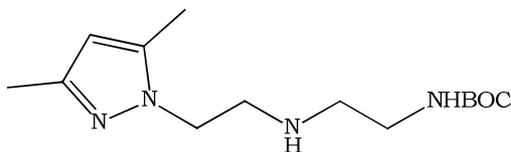


Aceite amarillo, (70%).  $\delta\text{H}$  (200,13 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 5,42 (sa, 1H, NH), 2,94 (q, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}_{(\text{BOC})}$ ), 2,57 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ), 1,23 (s, 9H,  $3\text{CH}_3_{(\text{BOC})}$ ).  $\delta\text{C}$  (200,13 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 28,03 ( $3\text{CH}_3_{(\text{BOC})}$ ); 41,49 ( $\text{CH}_2$ ); 43,06 ( $\text{CH}_2$ ); 78,51 ( $\text{C}_{(\text{BOC})}$ ); 156,00 ( $\text{C=O}_{(\text{BOC})}$ )

- **Síntesis de ter-butil-(2-[[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil] amino} etil) carbamato (L3)**

Se preparó una disolución de 710 mg de **L2** (4,43 mmol) con 12 ml de acetonitrilo seco y se agregaron 399 mg de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2,97 mmol) y 26,6 mg de KI (0,161 mmol). Después, se adicionó lentamente una disolución de **L1** en acetonitrilo seco (10 ml) bajo atmósfera inerte. Una vez finalizada la adición se dejó la reacción a reflujo durante 28 h, se filtró y el filtrado se llevó a sequedad. El crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna, usando como eluyente una mezcla de MeOH 10% en  $\text{CHCl}_3$ .

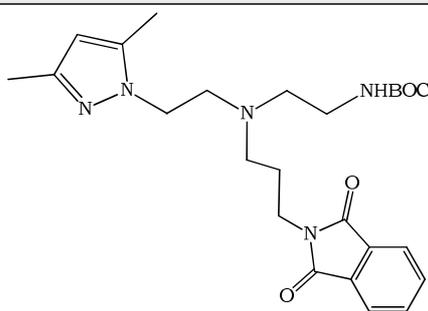
**pz\*(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHBOC (L3)**



Aceite amarillo, (88%).  $\delta\text{H}$  (200,13 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 5,68 (s, 1H,  $\text{CH}_b$ ), 5,21 (sa, 1H, NH), 3,94 (t, 2H,  $\text{CH}_{2d}$ ), 3,07 (t, 2H,  $\text{CH}_{2g}$ ), 2,89 (m, 2H,  $\text{CH}_{2e}$ ), 2,61 (m, 2H,  $\text{CH}_{2f}$ ), 2,13 (s, 3H,  $\text{CH}_{3a}$ ), 2,10 (s, 3H,  $\text{CH}_{3c}$ ).

- **Síntesis de *ter*-butil-(2-[[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil] (3-(1,3-dioxo-2,3-dihidro-1Hinden-2-il)propil) amino} etil) (L4)**

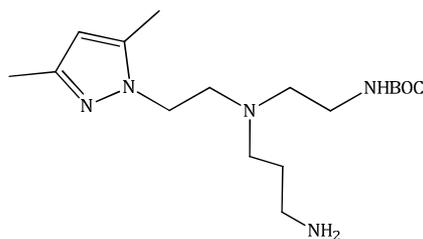
Se preparó una mezcla de N-(3-bromopropil)-ftalimida (7,15 g, 26,6 mmol), ligando **L3** (3,67 g, 13,0 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,68 g, 26,6 mmol) en dioxano (60 ml) y se dejó a reflujo durante 21 h. Luego la mezcla de reacción se filtró, el filtrado se llevó a sequedad y el crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna con acetato de etilo.



Aceite amarillo (64%). **δH** (200,13 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 7,70 (m, phthalimida, 2H), 7,68 (m, phthalimida, 2H), 5,70 (s, CH<sub>b</sub>, 1H), 5,13 (sa, NH(BOC), 1H), 4,04 (t, CH<sub>2d</sub>, 2H), 3,58 (t, CH<sub>2e</sub>, 2H), 3,07 (m, CH<sub>2f</sub>, 2H), 2,50 (t, CH<sub>2h</sub>, 2H), 2,46 (m, CH<sub>2g</sub>/CH<sub>2j</sub>, 4H), 2,20 (s, CH<sub>3a</sub>, 3H), 2,15 (s, CH<sub>3c</sub>, 3H), 1,71 (m, CH<sub>2i</sub>, 2H), 1,39 (s, CH<sub>3(BOC)</sub>, 9H).

- **Síntesis de *ter*-butil-2-(3-aminopropil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil) amino} etil) carbamato (L5)**

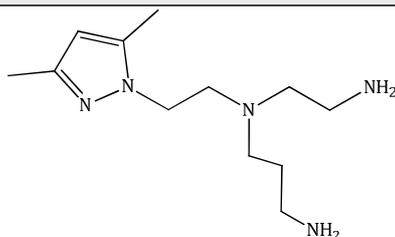
Se disolvieron 1,26 g de **L4** en 8 ml de MeOH, se añadieron 2,68 ml de hidrato de hidrazina (NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 55,22 mmol) y se dejó la reacción a reflujo durante 6 h. Después, la mezcla de reacción se enfrió y se acidificó con HCl 1 M. A pH 4 se formó un sólido blanco insoluble, que se separó por filtración. El filtrado se neutralizó hasta pH 7, con una disolución de NaOH 1 M y después se extrajo con CHCl<sub>3</sub> y la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se llevó a sequedad.



Aceite amarillo, (94%).  **$\delta$ H** (200,13 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 5,75 (s,  $\text{CH}_b$ , 1H), 5,28 (sa,  $\text{NH}_2$ , 2H), 5,10 (sa,  $\text{NH}_{(\text{BOC})}$ ), 1H), 3,96 (t,  $\text{CH}_{2d}$ , 2H), 3,07 (m,  $\text{CH}_{2e}$ , 2H), 2,76 (t,  $\text{CH}_{2f}$ , 2H), 2,60 (t,  $\text{CH}_{2g}$ , 2H), 2,48 (m,  $\text{CH}_{2h}/\text{CH}_{2j}$ , 4H), 2,21 (s,  $\text{CH}_{3(\text{pz})}$ , 3H), 2,19 (s,  $\text{CH}_{3(\text{pz})}$ , 3H), 1,50-1,45 (m,  $\text{CH}_{2i}$ , 2H), 1,42 (s,  $\text{CH}_{3(\text{BOC})}$ , 9H).

- **Síntesis de N<sup>1</sup>-(2-aminoetil)-N<sup>1</sup>-[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il) etil] propano-1,3-diamina (L6)**

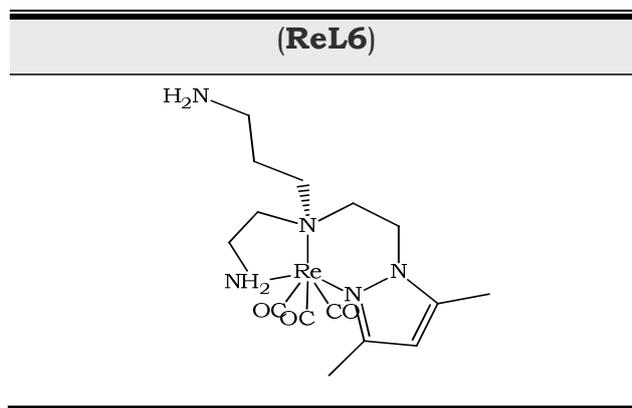
Se disolvió el ligando **L5** (100 mg, 0,295 mmol) en diclorometano y se añadió ácido trifluoroacético (TFA, 200 ml), la reacción transcurrió durante 3 h a temperatura ambiente. Después se filtró y el filtrado se llevó a sequedad, para obtener el producto deseado.



Aceite amarillo, (38%).  **$\delta$ H** (200,13 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ ): 5,83 (s,  $\text{CH}_b$ , 1H), 3,96 (t,  $\text{CH}_{2d}$ , 2H), 2,85 (t,  $\text{CH}_{2e}$ , 2H), 2,76 (m,  $\text{CH}_{2f}/\text{CH}_{2g}$ , 4H), 2,66 (m,  $\text{CH}_{2h}$ , 2H), 2,51 (t,  $\text{CH}_{2j}$ , 2H), 2,11 (s,  $\text{CH}_{3(\text{pz})}$ , 3H), 2,01 (s,  $\text{CH}_{3(\text{pz})}$ , 3H), 1,61 (m,  $\text{CH}_{2i}$ , 2H).

### 6.3.2.3 Síntesis del complejo *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(κ<sup>3</sup>-Pz(NH<sub>2</sub>))]⁺

El ligando pirazol **L6**, (0,03 g, 0,131 mmol), se hizo reaccionar con el precursor organometálico [Re(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]Br (0,05 g, 0,13 mmol) en agua y a reflujo durante 18 h. Después la reacción se llevó a sequedad y el crudo resultante se purificó por RP-HPLC preparativa (220 nm, Gradiente A).

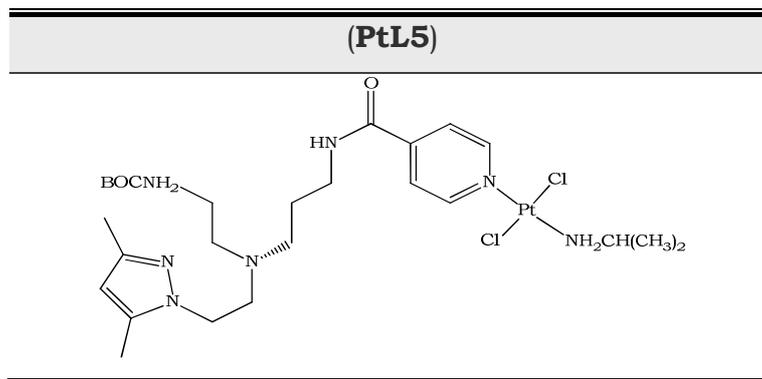


Aceite Amarillo, (70%). **δH** (300,13 MHz; (D<sub>2</sub>O): 6,07 (s, CH<sub>b</sub>, 1H), 5,14 (sa, NH, 1H), 4,35 (dd, CH<sub>d</sub>, 1H), 4,13 (dd, CH<sub>d</sub>, 1H), 3,71-3,59 (m, NH/CH<sub>h</sub>, 2H), 3,44 (dd, CH<sub>h</sub>, 2H), 3,32 (dd, CH<sub>e</sub>, 1H), 3,11 (m, CH<sub>g</sub>, 1H), 2,98 (t, CH<sub>2j</sub>, 2H), 2,77 (m, CH<sub>2f</sub>, 2H), 2,63 (dd, CH<sub>e</sub>, 1H), 2,53-2,41 (m, CH<sub>g</sub>, 1H), 2,30 (s, CH<sub>3pz</sub>, 3H), 2,19 (s, CH<sub>3pz</sub>, 3H) 2,09-2,00 (m, CH<sub>i</sub>/CH<sub>i</sub>, 2H). **δ<sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O) 194,6, 194,0, 192,9 (C≡O); 156,1(C<sub>c</sub>), 147,1 (C<sub>a</sub>), 110,5 (C<sub>b</sub>), 65,7 (C<sub>h</sub>), 63,9 (C<sub>i</sub>), 55,4 (C<sub>e</sub>), 49,7 (C<sub>d</sub>), 44,9 (C<sub>g</sub>), 39,9 (C<sub>j</sub>), 25,2 (C<sub>i</sub>), 18,0(CH<sub>3</sub>(Pz)), 13,6(CH<sub>3</sub>(Pz)). Tiempo de retención =18,2 min.

### 6.3.2.4 Síntesis del complejo PtL5

Se añadieron 33,5 mg de HBTU (0,088 mmol) y 11,9 mg HOBT (0,088 mmol), a una disolución de *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(4pic)] (33 mg, 0,0736 mmol) en DMF (2 ml) y se dejó reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Después se añadió una disolución del ligando **L5** (50 mg, 0,147 mmol) en DMF (3 ml) y 50 μl de DIPEA, esta mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche. Posteriormente, se eliminó el disolvente bajo presión reducida y el crudo obtenido se extrajo con CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se filtró. El filtrado se concentró al mínimo volumen y se precipitó con éter dietílico, para

obtener un sólido acetitoso ligeramente amarillo, este crudo se purificó por columna, usando como eluyentes una mezcla MeOH/CHCl<sub>3</sub> (1:3).



**$\delta$ H** (200,13 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 8,89 (d, CH<sub>c</sub>, 2H), 7,97 (d, CH<sub>d</sub>, 2H), 5,89 (s, CH<sub>b</sub>, 1H), 4,17(sa, NH, 1H), 3,98 (m, CH<sub>2d</sub>, 2H), 3,42 (m, CH<sub>2e</sub>, 2H), 2,86 (t, CH<sub>2f</sub>, 2H), 2,67 (t, CH<sub>2g</sub>, 2H), 2,47(t, CH<sub>2h</sub>, 2H), 2,31 (t, CH<sub>2j</sub>, 2H), 2,27 (s, CH<sub>3(pz)</sub>, 3H), 2,15 (s, CH<sub>3(pz)</sub>, 3H), 1,77 (t, CH<sub>2i</sub>, 2H), 1,36 (s, CH<sub>3(BOC)</sub>, 9H), 1,22(d, CH<sub>3b'</sub>, 6H).

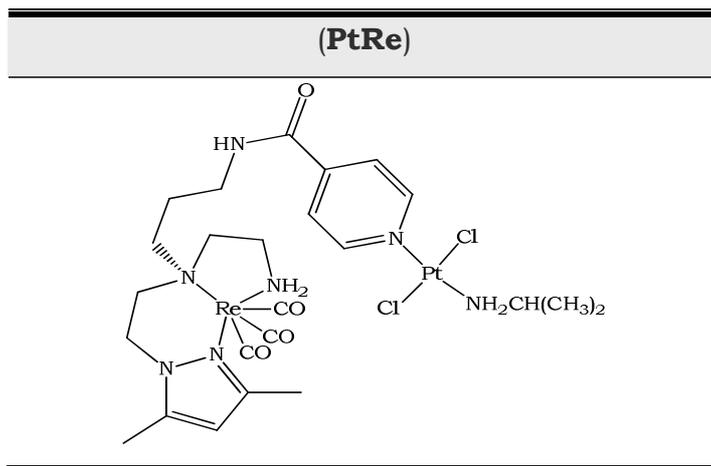
### 6.3.2.5 Desprotección del complejo PtL5

El complejo **PtL5** (20 mg) se disolvió en 2 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco y empleando una bomba de jeringa se adicionaron 50  $\mu$ l de HCl-MeOH (1,25 M) en 5 h, en oscuridad, con agitación y bajo atmósfera inerte. El producto obtenido es una mezcla de complejo **PtL6** y **PtL5** (complejo desprotegido y protegido con BOC).

### 6.3.3 Síntesis del complejo heterobimetálico Pt-Re

A una disolución de *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)(4-pic)] (6 mg, 0,013 mmol) y NHS (N-hidroxisuccinimida, 3,2 mg, 0,026 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (3 ml) se añadió DCC (5,52 mg, 0,026 mmol). Se dejó con agitación una noche a temperatura ambiente, luego se eliminó el disolvente y al crudo obtenido se agregó acetato de etilo (5 ml), la mezcla resultante se filtró y el filtrado se llevó a sequedad. El residuo obtenido se redisolvió en CH<sub>3</sub>CN, y se añadió sobre una disolución de complejo de **ReL6** y DIPEA (50  $\mu$ l, 10 mmol) en CH<sub>3</sub>CN y esta mezcla se dejó reaccionar 5 días a temperatura ambiente. La disolución resultante se secó completamente y el crudo obtenido se

purificó usando cartucho SepPak C18 y empleando como eluyentes mezclas de H<sub>2</sub>O/MeOH. El cartucho de SepPak fue previamente activado con MeOH y luego estabilizado con 10 ml de agua, una vez introducido el crudo de la reacción, se realizaron las eluciones con mezclas H<sub>2</sub>O/MeOH (0% MeOH, 10% MeOH, 20% MeOH, 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH, 90% MeOH, 100% MeOH). El compuesto deseado se aisló con la mezcla de 70% MeOH, aunque no está totalmente puro.



Aceite amarillo, (51%).  $\delta^1\text{H}$  (300,13 MHz; (D<sub>2</sub>O): 8,88 (d, CH<sub>(Ar)</sub>, 2H), 7,96 (d, CH<sub>(Ar)</sub>, 2H), 6,07 (s, CH<sub>b</sub>, 1H), 5,14 (sa, NH, 1H), 4,35 (dd, CH<sub>d'</sub>, 1H), 4,13 (dd, CH<sub>d''</sub>, 1H), 3,71-3,59 (m, NH/CH<sub>h'</sub>, 2H), 3,44 (dd, CH<sub>h''</sub>, 2H), 3,32 (dd, CH<sub>e'</sub>, 1H), 3,11 (m, CH<sub>g'</sub>, 1H), 2,98 (t, CH<sub>2j</sub>, 2H), 2,77 (m, CH<sub>2f</sub>, 2H), 2,63 (dd, CH<sub>e''</sub>, 1H), 2,53-2,41 (m, CH<sub>g''</sub>, 1H), 2,30 (s, CH<sub>3pz</sub>, 3H), 2,19 (s, CH<sub>3pz</sub>, 3H) 2,09-2,00 (m, CH<sub>i'</sub>/CH<sub>i''</sub>, 2H).  $\delta^{13}\text{C}$  (D<sub>2</sub>O) 194,6, 194,0, 192,9 (C≡O); 156,1(C<sub>c</sub>), 147,1 (C<sub>a</sub>), 110,5 (C<sub>b</sub>), 65,7 (C<sub>h</sub>), 63,9 (C<sub>f</sub>), 55,4 (C<sub>e</sub>), 49,7 (C<sub>d</sub>), 44,9 (C<sub>g</sub>), 39,9 (C<sub>j</sub>), 25,2 (C<sub>i</sub>), 18,0(CH<sub>3(Pz)</sub>), 13,6(CH<sub>3(Pz)</sub>).

## 6.4 Bibliografia

- <sup>1</sup> S. Liu, D. S. Edwards, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 7.
- <sup>2</sup> A. I. Kassis, *J. Nucl. Med.*, **2003**, 44, 1479.
- <sup>3</sup> M. Ginja, K. Hinni, S. Tschumi, S. Schulz, H. R. Maecke, *J. Nucl. Med.*, **2005**, 46, 2097.
- <sup>4</sup> P. Haefliger, N. Agorastos, B. Spingler, O. Georgiev, G. Viola, R. Alberto, *ChemBioChem*, **2005**, 6, 414.
- <sup>5</sup> P. Haefliger, N. Agorastos, A. Renard, G. Giambonini-Brugnoli, C. Marty, R. Alberto, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 582.
- <sup>6</sup> K. J. Langen, H. H. Coenen, N. Roosen, P. Kling, O. Muzik, H. Herzog, T. Kuwert, G. Stocklin, L. E. Feinendegen, *J Nucl Med*, **1990**, 31, 281.
- <sup>7</sup> D. Zhou, H. Lee, J. M. Rothfuss, D. L. Chen, D. E. Ponde, M. J. Welch, R. H. Mach, *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 2443.
- <sup>8</sup> R. E. Mewis, S. J. Archibald, *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, 254, 1686.
- <sup>9</sup> T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2858.
- <sup>10</sup> R. Schibli, R. Schwarzbach, R. Alberto, K. Ortner, H. Schmalle, C. Dumas, A. Egli, P. A. Schubiger, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 750.
- <sup>11</sup> M. J. Abrams, A. Davison, A. G. Jones, C. E. Costello, H. Pang, *Inorg. Chem.*, **1983**, 22, 2798.
- <sup>12</sup> F. J. Wackers, D. S. Berman, J. Maddahi, D. D. Watson, G. A. Beller, H. W. Strauss, C. A. Boucher, M. Picard, B. L. Holman, R. Fridrich, a. et, *J Nucl Med*, **1989**, 30, 301.
- <sup>13</sup> R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, A. P. Schubiger, U. Abram, T. A. Kaden, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 7987.
- <sup>14</sup> R. Alberto, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2003**, 30, 1299.
- <sup>15</sup> R. Alberto, *Top. Curr. Chem.*, **2005**, 252, 1.
- <sup>16</sup> R. Alberto in *Organometallic radiopharmaceuticals*, Vol. 32 Springer GmbH, **2010**, pp. 219.
- <sup>17</sup> R. Alberto, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, 21.
- <sup>18</sup> S. Alves, A. Paulo, J. D. G. Correia, A. Domingos, I. Santos, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2002**, 4714.
- <sup>19</sup> S. Alves, A. Paulo, J. D. G. Correia, L. Gano, C. J. Smith, T. J. Hoffman, I. Santos, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 438.
- <sup>20</sup> B. L. Oliveira, P. D. Raposinho, F. Mendes, F. Figueira, I. Santos, A. Ferreira, C. Cordeiro, A. P. Freire, J. D. G. Correia, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 2168.
- <sup>21</sup> S. Khabnadideh, Z. Rezaei, A. Khalafi-Nezhad, R. Bahrinajafi, R. Mohamadi, A. A. Farrokhrooz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 2863.
- <sup>22</sup> C. Neto, M. C. Oliveira, L. Gano, F. Marques, T. Thiemann, I. Santos, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 111, 1.
- <sup>23</sup> E. I. Montero, S. Diaz, A. M. Gonzalez-Vadillo, J. M. Perez, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 4264.
- <sup>24</sup> V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 1269.
- <sup>25</sup> W. Caseri, *Platinum Met. Rev.*, **2004**, 48, 91.
- <sup>26</sup> J. D. G. Correia, A. Domingos, I. Santos, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 1523.
- <sup>27</sup> J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 1067.

**Chapter 7.**  
**Summary and conclusions**



Since Rosenberg discovered the antitumor activity of cisplatin in 1967, cisplatin (CDDP) is the mainstay of treatment for testicular, ovarian, bladder, cervical, small-cell and non-small-cell lung cancers. However, cisplatin has several major drawbacks. Common problems include cumulative toxicities of nephrotoxicity, ototoxicity and peripheral neuropathy. In addition to these serious side effects, the therapeutic efficacy of cisplatin is also limited by inherent or induced resistant tumor. Driven by the impressive impact of cisplatin on cancer chemotherapy, great efforts have been made to develop new derivatives with improved pharmacological properties. Among the over 30 platinum agents which have entered clinical trials after the onset of clinical studies with cisplatin in the early 1970s, only carboplatin and oxaliplatin have received worldwide approval so far, nedaplatin, lobaplatin and heptaplatin have gained regionally limited approval, and a few drugs continue to be evaluated in clinical studies.<sup>1</sup>

For decades, platinum complexes of *trans* isomer were not regarded as potential drugs because *trans*-platinum is an inactive isomer. Over the last ten years, however, *trans*-platinum complexes have been developed as new drugs.<sup>2</sup>

In this chapter, we summarize the results obtained for different *trans* platinum complexes, with systematic variations in the leaving group, in metal oxidation state and in the functionalization of their structure for molecular targeting. The cytotoxicity, reactivity and speciation studies presented in solution are also included.

## **7.1 Chapter 2. *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)L<sub>2</sub>] complexes**

### **7.1.1 Background**

The importance of the leaving group in the design of platinum drugs is quite obvious looking at their development in clinic. For example,

carboplatin differs from cisplatin in the presence of a bidentate dicarboxylate (CBDCA) ligand instead of the two chloride ligands.

The iodido analogues of classical anticancer platinum(II) compounds have not been considered as pharmacological agents because of the greater stability in water solution of Pt-I bonds compared to Pt-Cl bonds.<sup>3-4</sup> In addition, the first studies on *cis*-[PtI<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] reported it to be inactive as an anticancer agent in an animal model.<sup>5</sup> As a result of this, the development of iodidoplatinum complexes as anticancer agents was stopped. However, a few subsequent studies revealed a considerable and peculiar reactivity for iodido Pt(II) and Pt(IV) complexes towards important biomolecular targets (e.g. serum albumin, glutathione).<sup>6</sup>

## 7.1.2 Results

### 7.1.2.1 *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(amine')] complexes

Due to the peculiar reactivity of the first Pt(II) complexes with iodide ligands synthesized in our group, we set the synthesis of a second generation of *trans* complexes with general formula *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(amine')], where amine and amine' are different aliphatic amines. Briefly, these complexes were prepared using the *cis* complex with the appropriate amine as starting material. The final *trans* complex was achieved in one step, without isolating the tetramine [Pt(amine)<sub>2</sub>(amine')<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (Figure 7.1). All complexes were characterized by the usual techniques of <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and <sup>195</sup>Pt NMR spectroscopy and chemical elemental analysis (see Chapter 2, Experimental part.).

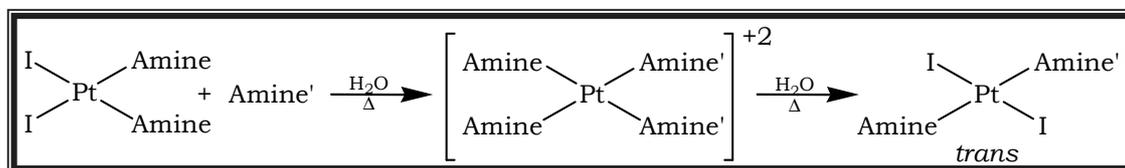


Figure 7.1. Scheme of reaction for the synthesis of the *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(amine')] complexes.

The cytotoxicity of the **A1**, **A2** and **A3** complexes (Figure 7.1), was studied in a large panel of cell lines, SAOS-2 (human osteosarcoma), A375 (melanoma), T-47D (breast cancer), SF-268 (glioblastoma) and NCI-H460

(lung cancer). The complexes showed, in most cases, cytotoxic activity  $IC_{50}$  values (concentration of drug causing 50% of death in cell culture) comparable to cisplatin, except in the SAOS-2 and T-47D cells. These complexes generally showed to be active, but were not better active than cisplatin; except **A2** complex, which was more effective than cisplatin in the lung cancer cell line (NCI-H460). These complexes were also tested in the isogenic pair of cell lines, HCT116+/+ and HCT116-/- (human colon carcinoma), where the difference between the two cell lines is the presence or absence of the p53 protein, respectively. The complexes showed no better cytotoxic activity than cisplatin in normal cell line (HCT116+/+). However, in HCT116-/- cells (in the absence of p53) **A2** complex, which contains more bulky aliphatic amines (ipa-dma), showed greater activity than cisplatin, indicating that it is particularly selective versus this cell line in the absence of p53. The results obtained are shown in Figure 7.1.

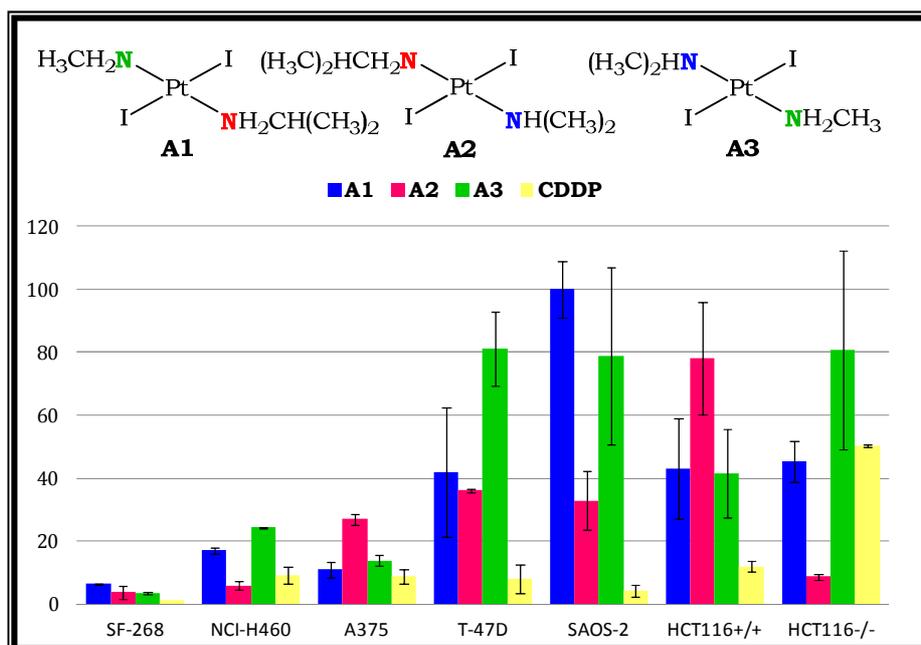


Figure 7.1. Antitumor activity given as the  $IC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) of the *trans*-[Pt<sub>2</sub>(amine)(amine')] complexes.

The interaction of **A1**, **A2** and **A3**, was performed with the plasmid pBR322 and 5'GMP. These additional studies showed that **A3** complex interacts with the supercoiled pBR322 plasmid more easily than the rest of the series (Figure 7.2, lanes 13-17), and this same effect was observed in its interaction with 5'GMP, as the monoadduct and many other species were detected in the early stages of the reaction. **A1** and **A2** complexes showed

interaction with the plasmid and 5'-GMP, but the effect was less pronounced than that observed with **A3**, since these complexes required greater concentration (in electrophoresis) or more reaction time (with 5'GMP) to produce the same effect as **A3**.

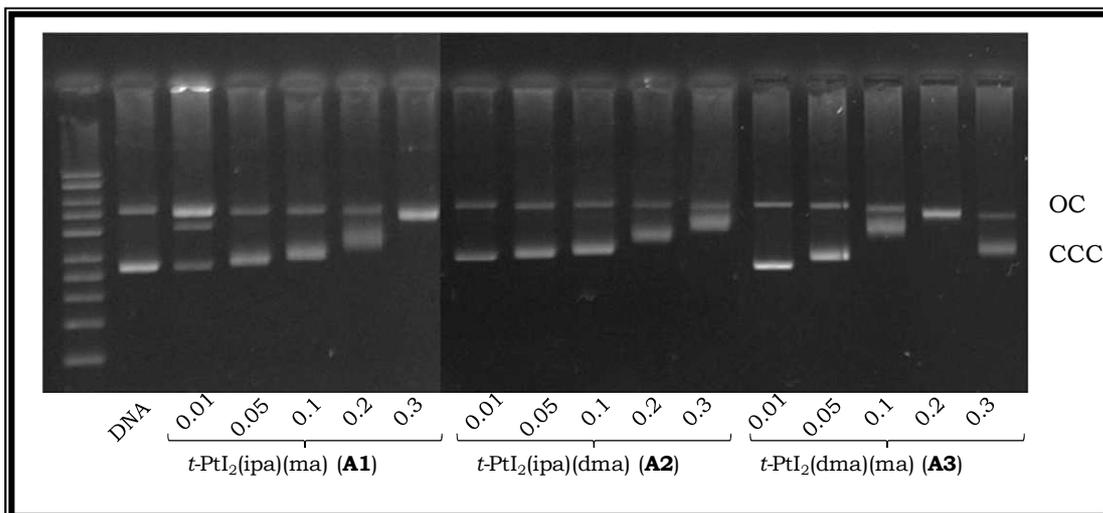


Figure 7.2. Electrophoresis in agarose gel to the *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(amine')] complexes.

The cytotoxicity of these complexes was performed in Prof. Amancio Carnero's laboratory (IBIS, Hospital del Rocío, Sevilla) and the synthesis and characterization of the complexes were performed in collaboration of the student Thalia Parro from our group of research.

### 7.1.2.2 *Trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)] complexes

The synthesis of *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)] complexes was depicted in figure 7.3.

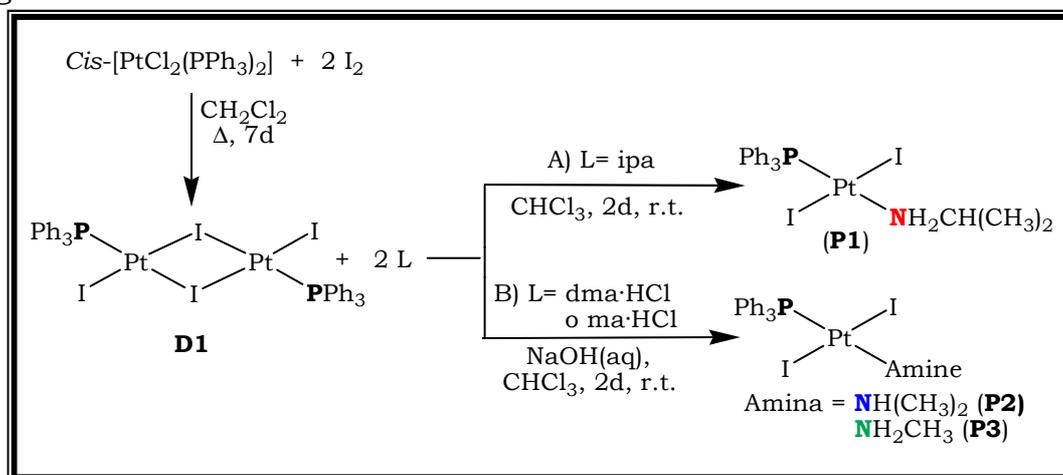


Figure 7.3. Scheme of synthesis of *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)] complexes.

The general procedure for the synthesis of *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)] complexes requires the synthesis of **D1**, *trans*-[Pt<sub>2</sub>I<sub>2</sub>(μ-I)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] dimer. There are several methods published in the literature for the synthesis of this dimer but there are not details of either the synthesis procedure or its characterization.<sup>7-9</sup>

We performed several attempts to achieve **D1**. First, using *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] and iodine, we were able to obtain a mixture of dimers *cis* and *trans*, only detectable in <sup>195</sup>Pt-NMR at -3885.11 ppm (*J*<sub>Pt-P</sub>: 3567.27 Hz) and at -4775.34 ppm (*J*<sub>Pt-P</sub>: 3778.99 Hz). The characterization of this mixture was not easy, since both chemical shifts and coupling constants Pt-P, were not reported in the literature. Purification of the mixture was a quite complicated process, because both species showed a similar solubility. After several attempts varying the reaction conditions, *trans*-[Pt<sub>2</sub>I<sub>2</sub>(μ-I)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**D1**) was isolated pure and characterized by X-ray diffraction.<sup>9</sup> This allowed us to confirm that one of the species of the mixture is the *trans* isomer and could be unequivocally assigned to the <sup>195</sup>Pt-NMR signal (-4775.34 ppm).

The synthesis of the complexes *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)] was performed by the cleavage of **D1** using two procedures (see experimental part, Chapter **2**). Although both methods are very similar, the small differences were essential to obtain good yields in the final products: **P1**, **P2** and **P3** (Figure 8.4).

All these complexes were characterized by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, <sup>31</sup>P-NMR and <sup>195</sup>Pt-NMR spectroscopy, elemental analysis, ESI-MS and in the case of **P1** suitable crystals were obtained to perform the X-ray diffraction (see Chapter **2**, Figure 2.15). The values of the coupling constants (Pt-P) of the complexes *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (3407.3 Hz), *trans*-[PtI<sub>2</sub>(dma)(PPh<sub>3</sub>)] (3262.2 Hz) and *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ma)(PPh<sub>3</sub>)] (3396.0 Hz), are comparable with the values mentioned in the literature for some *trans* compounds with chloride ligands of general formula *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)].<sup>10</sup> In addition our complexes were shown to be stable in solution, including DMSO (required for the biological experiments).

Our complexes were also evaluated in different tumoral cell lines and the results indicate that the complex with methylamine (**P3**) and dimethylamine (**P2**) showed no cytotoxic activity against any of these cells, displaying IC<sub>50</sub> values greater than 100 μM. However, the complex *trans*-[PtI<sub>2</sub>(ipa)(PPh<sub>3</sub>)] (**P1**) showed activity in cells A375, HCT166-/- (resistant to cisplatin) and SKOV-3, where the complex was more active than cisplatin (Figure 7.4).

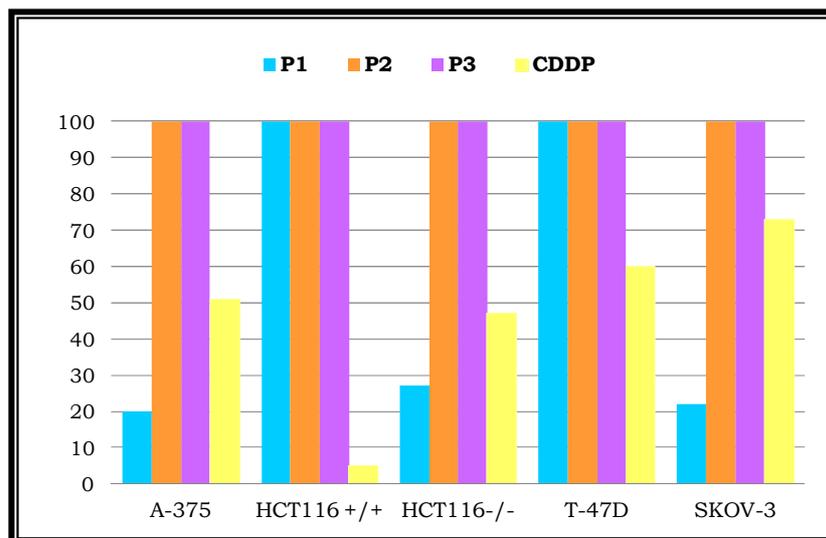


Figure 7.4. Cytotoxic activity given as the IC<sub>50</sub> (μM) of the *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)] complexes.

The interaction with DNA model bases was studied using the plasmid pBR322 and 9-ethyl-guanine. In the electrophoresis studies, **P1** appears to completely relax the supercoils at a  $r_1$  of 0.1, while the other complexes do not result in complete unwinding at these concentrations. This coincides with the toxicity data that follows showing the lack of efficaciousness of complexes **P2** and **P3**. However we must be careful making these kinds of comparisons because the active chloride parent complexes showed lower interaction under the same conditions, yet demonstrated high cytotoxicity (see Chapter 2, Figure 2.18).

The study of interaction with 9-ethyl-guanine, using <sup>1</sup>H-NMR spectra was performed following the changes in the H8 peak of 9-EtG. We could detect a broad signal which arises at ca. 8.00 ppm corresponding to the H8 resonance of a possible new adduct. Unfortunately, the spectra showed low resolution probably caused by speciation (see Chapter 2, Figure 2.19).

Another feature that supports speciation is the new signal at 6.4 ppm, which possibly belongs to the H8 of an additional species. The low concentration of the spectra does not allowed further experiments to be recorded, but it has been reported previously that H8 of 9-EtG can be extremely unshielded when is wedged between bulky groups.<sup>11</sup>

Other studies such as the cell cycle arrest were also carried out (see Chapter 2, Table 2.A for further details). Cytotoxicity and cell cycle arrest studies were performed by the laboratories of Prof. Tracey M. Mason from Stevenson University (Maryland, USA)

## **7.2 Chapter 3. Platinum(II) complexes with an acetate ligand**

### **7.2.1 Background**

Carboplatin,  $[\text{Pt}(\text{cbdca}-\text{O},\text{O}')(\text{NH}_3)_2]$ , where cbdca is cyclobutane-1,1-dicarboxylate and O and O' are the ligand donor atoms, is a so called second generation platinum anticancer drug that is much less oto and nephrotoxic than cisplatin. The key difference between the structures of carboplatin and cisplatin is that the former possesses a six-membered dicarboxylate ring, which, because of the chelate effect, makes it much less chemically reactive than cisplatin. Carboplatin by itself or in combination with other drugs is in worldwide clinical use for the treatment of a variety of different cancers, including head and neck cancer, and ovarian, breast, small lung cell, testicular, bladder and brain tumors.

Carboplatin presents an identical range of action to cisplatin. Both species are believed to exert their cytotoxicity by coordinating bifunctionally to DNA through the **N7** atoms of two adjacent guanines on the same strand (intrastrand cross-links), arresting DNA replication.

Farrell et. al., prepared a series of platinum complexes with general formula  $\text{trans}-[\text{PtX}_2(\text{L})(\text{L}')] ]$  ( $\text{X} = \text{Cl}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) and compared their pharmacological properties in murine keratinocytes transformed by the oncogene H-Ras with its analogues of chloride. With this set of compounds,

we can compare where  $L=L''$  *trans*-[PtX<sub>2</sub>(pyridine)<sub>2</sub>] and where  $L\neq L''$  *trans*-[PtX<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(pyridine)] compounds, as well as evaluate the variations of the planar steric ligand and its electronic effects.<sup>12</sup> Other similar complexes with systematic modification of the steric effects of carrier pyridine groups and, especially, carboxylate leaving groups in *trans*-[Pt(O<sub>2</sub>CR)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(py)] showed to modulate aqueous solubility and hydrolysis to the activated aqua species.<sup>13</sup>

### 7.2.2 Results

**M1**, **M2** and **M3** complexes were synthesized using silver acetate and the chlorido starting materials previously reported by our group of research *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)]. All the different experiments using one equivalent of silver acetate, different solvents, reaction times and temperatures failed. After many attempts varying not only the conditions but also the reagents stoichiometry, we achieved the synthesis of the Pt(II) monoacetate complexes (**M1**, **M2** and **M3**) using 2 equivalents of AgAcO in an acetone/water mixture during 6h at 65°C. We also tried to improve the yield and the reactivity using up to 20 equivalents of AgAcO and coordinating solvents such as DMF, and we obtained neither better yields nor even mixtures with full chloride substitution.

Characterization was performed as usual with all the available techniques: NMR, mass spectra, elemental analysis and X-ray diffraction in the cases where suitable crystals were obtained (compound **M1**, see Chapter **3**). Briefly, in the <sup>1</sup>H-NMR spectra of all the compounds, we could identify the corresponding signal to the CH<sub>3</sub> group of the coordinated acetate ligand around 1.3-1.4 ppm. The <sup>31</sup>P and <sup>195</sup>Pt chemical shift of all the compounds (final products and starting materials) are shown in table 7.A for better comparison and analysis data confirmed also the structure.

Table. 7.A. Chemical shift of the starting complexes and monoacetate products.

Chemical shift (ppm) of starting material			Chemical shift (ppm) of monoacetate complexes		
Complexes	$^{31}\text{P}$	$^{195}\text{Pt}$	Complexes	$^{31}\text{P}$	$^{195}\text{Pt}$
<i>t</i> -[PtCl <sub>2</sub> (ipa)(PPh <sub>3</sub> )] <b>S1</b>	3.89	-3742.9	<i>t</i> -[PtCl(OAc)(ipa)(PPh <sub>3</sub> )] <b>M1</b>	4.00	-3130.0
<i>t</i> -[PtCl <sub>2</sub> (dma)(PPh <sub>3</sub> )] <b>S2</b>	3.83	-3837.7	<i>t</i> -[PtCl(OAc)(dma)(PPh <sub>3</sub> )] <b>M2</b>	3.50	-3195.5
<i>t</i> -[PtCl <sub>2</sub> (ma)(PPh <sub>3</sub> )] <b>S3</b>	3.60	-3597.6	<i>t</i> -[PtCl(OAc)(ma)(PPh <sub>3</sub> )] <b>M3</b>	3.93	-3152.2

ESI-MS spectrometry allows us to identify the molecular ion for **M1** and **M2** (612.11 and 598.10 uma, respectively).

According to the results observed in the antitumoral activity (Figure 7.5) the complex bearing isopropylamine showed the best cytotoxic activity from both series (predecessors and monoacetates). The comparison of our results showed the similar trend that the one observed by Farrell et al.<sup>12</sup> where the dichlorido complexes showed same or better cytotoxicity than their dicarboxylate analogues.

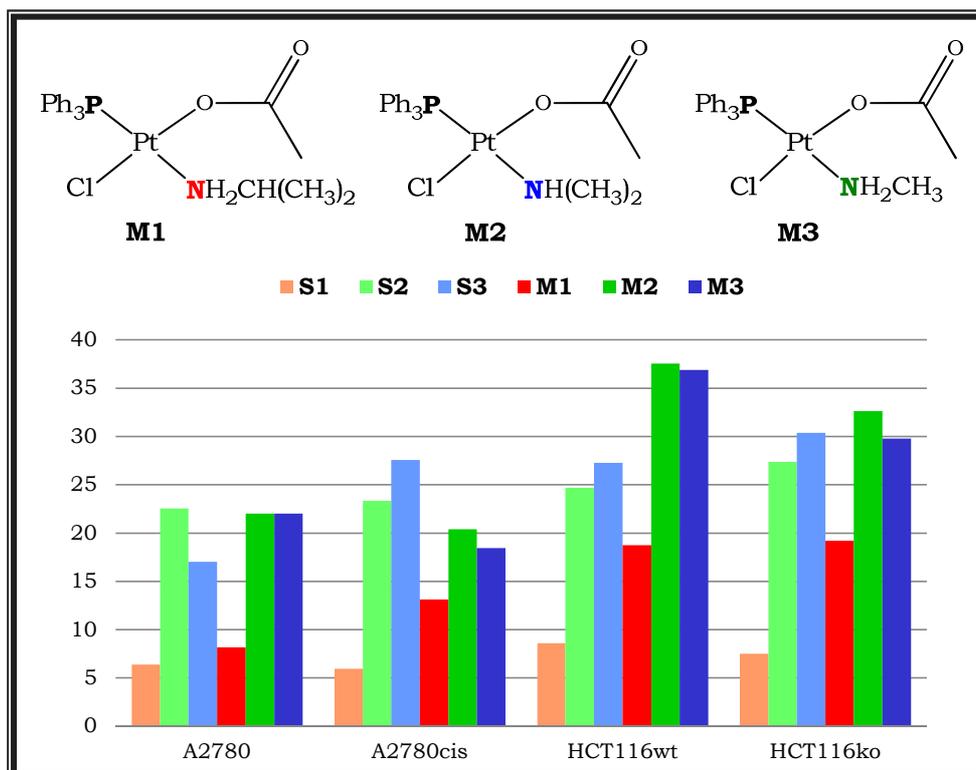


Figure 7.5. Cytotoxic activity given as the IC<sub>50</sub> (μM) of the *trans*-[Pt<sub>2</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)] complexes.

The low improvement in the *in vitro* cytotoxicity of the monoacetate complexes (**M1**, **M2** y **M3**), required a deeper pharmacological analysis. Therefore, we studied the impact in the cytotoxic activity value of the cell number in the culture.

Cells were seeded in several concentrations to study the monoacetates and their chlorido precursors. The results indicated that the number of cells has no influence in the chlorido complexes cytotoxicity. On the hand, the monoacetates **M1**, **M2** y **M3**, showed much better activity in the early stage of the culture growth. More experiments are planned to shed light in this interesting phenomena.

These monoacetate complexes, also showed to be stable in DMSO solution, and showed an interaction with pBR322 plasmid, similar to the starting complexes.

The cytotoxic and cell cycle studies were performed in Prof. Walter Berger's laboratories by Dr. Petra Heffeter from the Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, Austria, to whom we are indebted for her patience and support.

## **7.3 Chapter 4. Platinum(IV) complexes**

### **7.3.1 Background**

Pt(IV) antitumor activity is of great interest as it offers the opportunity to overcome some of the problems faced with cisplatin use; for example, the lower reactivity of Pt(IV) provides a prospect for decreasing its side reactions.<sup>14</sup> The octahedral geometry of the potential Pt(IV) drugs also introduces two extra axial ligands that can be changed to modify their pharmacokinetic parameters, which are: their rate of reduction, lipophilicity and molecular targeting. The modulation of these parameters might reduce the side effects, increase the activity of the complexes or confer additional cytotoxicity.<sup>15</sup>

How Pt(IV) complexes are activated "*in vivo*" to produce their antitumor effects has not been fully elucidated but a lot of evidence

supports the reduction hypothesis. This hypothesis suggests that Pt(IV) complexes may be reduced to Pt(II) complexes in vivo and the latter exert their cytotoxic effects, becoming more effective as the Pt(II) drug would not be eliminated so quickly. Moreover it has been shown that once some Pt(II) is produced in a reaction mixture, the reduction is greatly accelerated by the catalytic ability of Pt(II) species to rapidly reduce Pt(IV) to Pt(II).<sup>16</sup>

This chapter shows the results obtained for new complexes of Pt (IV), of general formula *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)].

### 7.3.2 Results

Three new complexes of Pt(IV), were synthesized by oxidation with chlorine gas of the *trans* Pt(II) complexes. The experimental part describes the procedure in detailed (section 4.3.2, Chapter 4), the most important feature in this procedure turned out to be the reaction time, longer reaction time neither increase the final product formation nor facilitate the purification.

Characterization was performed as usual with all the available techniques: NMR, mass spectra, elemental analysis and X-ray diffraction in the cases where suitable crystals were obtained (compound **C1** and **C2**, see Chapter 4). The <sup>195</sup>Pt-NMR chemical shift, around -1500 ppm for complexes **C1**, **C2** and **C3**, was one of the most appropriate techniques to follow the reaction and to distinguish the different species.

**C1** and **C2** complexes were chosen to be studied more widely, in the figure 7.6 shows the results of the cytotoxic activity of the complex *trans*-Pt(IV).

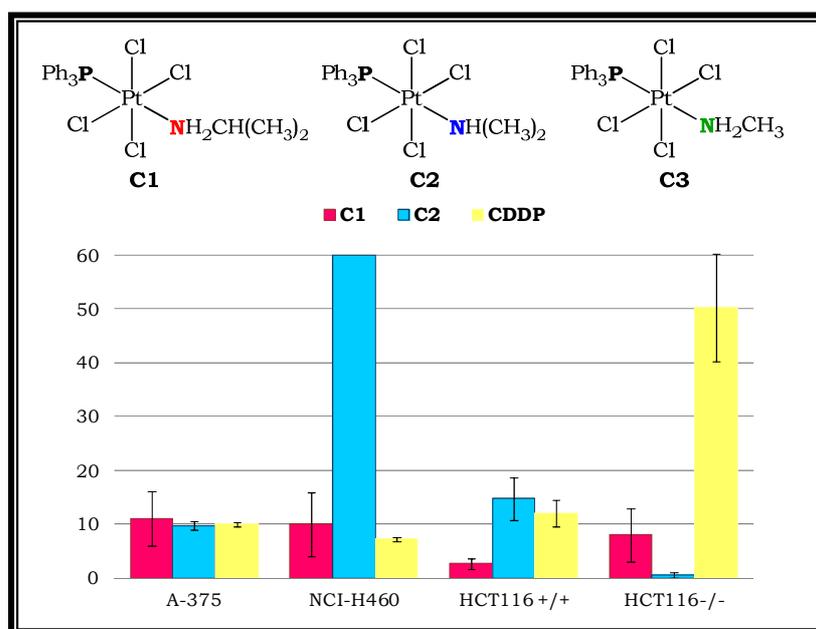


Figure 7.6. Cytotoxic activity given as IC<sub>50</sub> (μM) values of the Pt(IV) complexes.

In general, we observed that IC<sub>50</sub> values for complexes **C1** and **C2** were very similar to those of cisplatin and around 10 μM in the carcinoma cell lines A375 and NCI-H460, with the exception of complex **C2** in the last cell lines. Due to this similarity, we studied the cytotoxic activity of the platinum complexes **C1** and **C2** in HCT116 isogenic cell lines (wt or null for p53). Our intention was to find out the importance of the p53 response to the new trans Pt(IV) derivatives. Cisplatin clearly showed a lower activity in the absence of p53. This is in agreement with the finding that p53 expression enhances the sensitivity of cancer cells towards cisplatin and accumulation of p53 also sensitizes cells to the drug.<sup>17</sup> The IC<sub>50</sub> values of both complexes clearly showed a particularly higher activity in the absence of p53. In fact, the values of **C1** and **C2** are 8.0 and 0.6 μM, respectively, in HCT116(-/-), and these values are much lower than that of cisplatin (50 μM). Moreover both complexes showed cytotoxic activity also in HCT116 wt in the same order as cisplatin.

Table 2 Reduction potential values (vs. Ag/AgCl) of C1 and 2C

Complexes	Ep (mV)
<i>t</i> -[PtCl <sub>4</sub> (ipa)(PPh <sub>3</sub> )] <b>C1</b>	-160
<i>t</i> -[PtCl <sub>4</sub> (dma)(PPh <sub>3</sub> )] <b>C2</b>	-240

We based the design of our platinum(IV) complexes on the activity of their precursors (Pt(II) derivatives), and consequently, we evaluated the reduction potential of our compounds. Complexes **C1** and **C2** bear  $\text{Cl}^-$  atoms at the axial positions, which were reported to show more positive cathodic potential than the complexes with  $\text{OH}^-$ .<sup>14</sup> The potentials of our complexes are in fact lower (see Table 2), in particular the  $E_p$  value of **C1** is the lowest and differs by  $\sim 80$  Mv from that of complex **C2**. As both complexes are quite cytotoxic, it is difficult to establish the importance of the reduction potential required for activity. The significance of the potential is not clear here or in the references, because reduction potentials which are too easy or too difficult to reach may change the reactivity in the biological system.<sup>18</sup>

In an attempt to study some of the questions regarding the reduction of our complexes and their interaction with biomolecules, we have studied the interaction of our complexes versus pBR322 in the presence of reducing agents such as GSH as ASA (ascorbic acid). The electrophoresis results in agarose gel showed that GSH was not able to form the active species of Pt(II). While using ASA as reducing agent, the complexes interact with the pBR322 plasmid in similar form that Pt(II) analogues, so it is clear that reduction has taken place (Figure 7.7). NMR studies performed monitoring the reaction of the complexes with the reducing agents in  $\text{D}_2\text{O}$  (see Chapter 5, in Fig 5.17) showed reduction as well. Our analysis of these experiments was that the reduction with GSH does not take place as expected in the biological media, as in the electrophoresis the reduction is not observed.

The cytotoxicity of these complexes was performed in Prof. Amancio Carnero's laboratory (IBIS, Hospital del Rocío, Seville) and the reduction potential studies by Dr. Julio Lloret-Fillol from Chemistry Department, Universitat de Girona, actually at ICIQ (Institut Català d'Investigació Química).

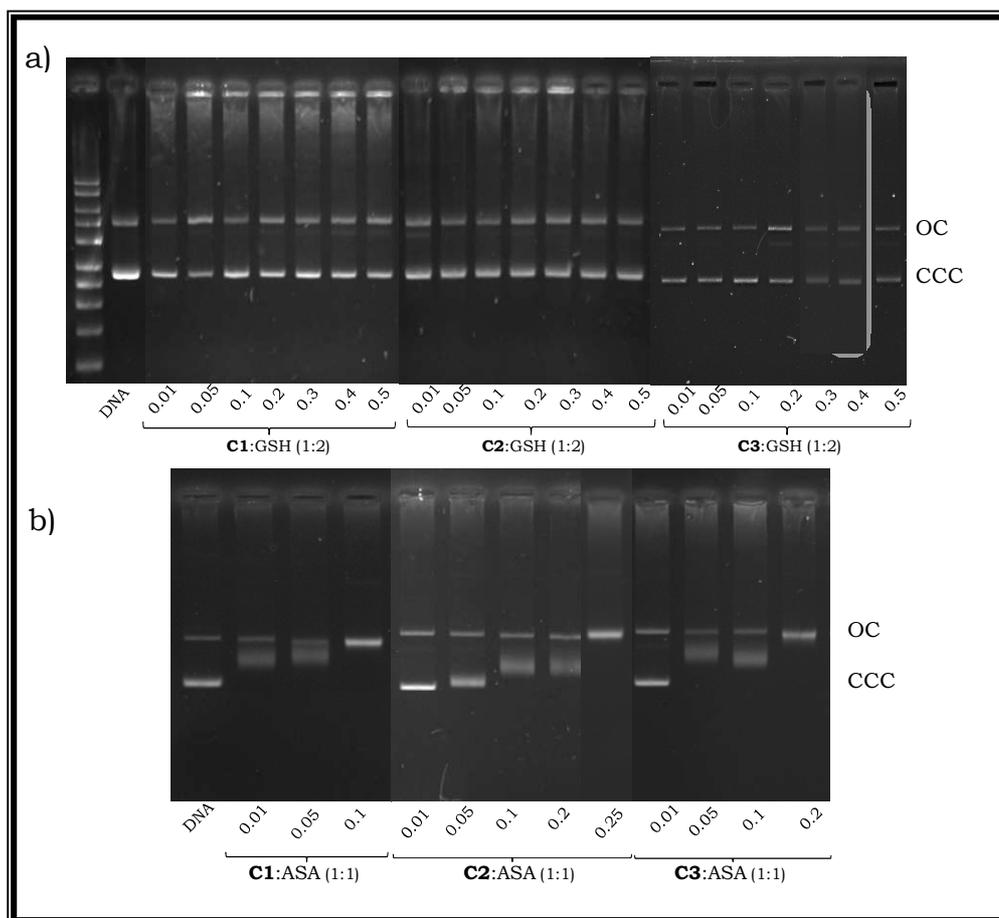


Figure 7.7. Agarose gel electrophoresis of *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)] complexes, in the presence of: a) GSH (1:2) b) ASA (1:1).

## 7.4 Chapter 5. Platinum complexes with peptides

### 7.4.1 Background

Integrins are the major receptors by which cells attach to extracellular matrix, and some integrins also mediate important cell-cell adhesion events. The structural and functional diversity of this family of proteins is based on the pairing of individual  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. The integrins play an important role in development of several human diseases, as diverse as thrombosis, inflammation and cancer.<sup>19-20</sup>

Integrin  $\alpha v \beta_3$  is a very active member of the family, allowing endothelial cells to interact with a wide variety of extracellular matrix components. These adhesive interactions may be critical for angiogenesis

since vascular cells must ultimately be capable of invading virtually all tissues.<sup>21</sup>

### 7.4.2 Results

We performed the automated synthesis of linear RGD peptide in solid-phase and immediately after, the cyclic RGD peptide was synthesized. The peptide was characterized by mass spectrometry, showing the molecular peak 604,6 uma  $[M-H]^+$ .

The synthesis of the **Pt(II)-cRGD**, was carried out by the reaction between the Pt(II) (precursor) activated with EDC and free amine of the cRGD peptide (lysine in Figure 7.8). The crude obtained was purified by HPLC and finally characterized by ESI-MS. The isotopic distribution of the reaction and the  $^{195}\text{Pt}$ -NMR confirmed that the compound contains Pt(II) moiety.

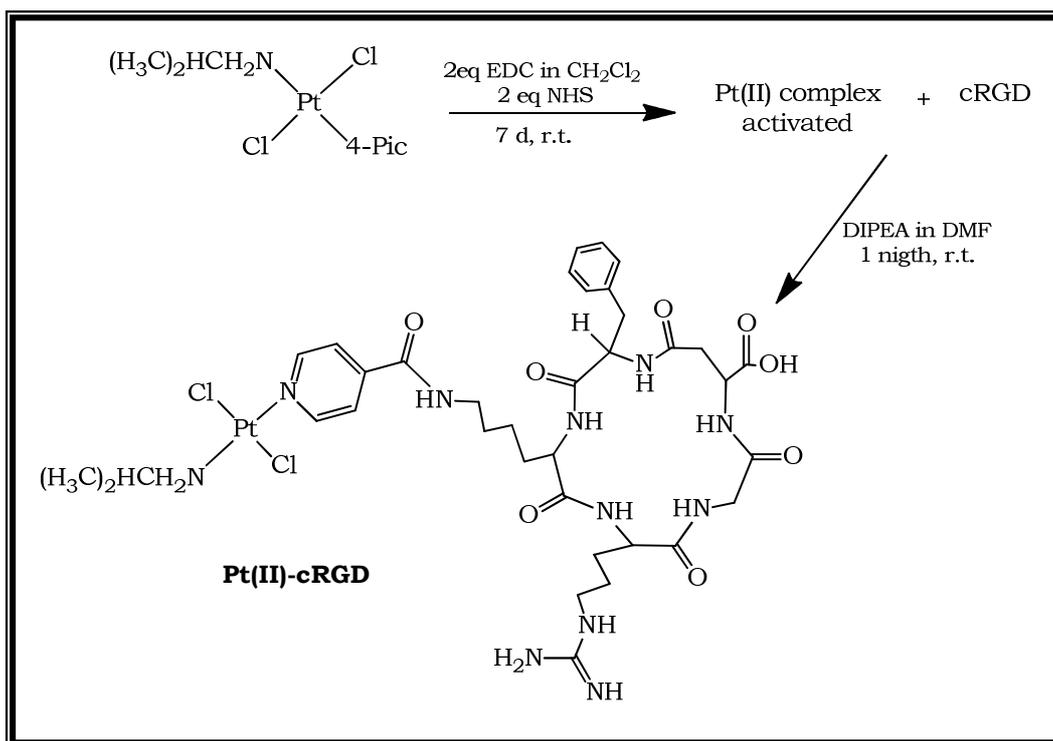


Figure 7.8. Scheme of synthesis of **Pt(II)-cRGD** complex.

We evaluated the cytotoxic activity of the **Pt(II)-cRGD** and *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{ipa})(4\text{-pic})]$  complexes in breast cancer cells (MDAMB231 and MCF7), ovarian carcinoma cells (A2780 and SKOV3) and human adenocarcinoma

(A549). The new platinum(II) complex coupled to the cRGD peptide, did not show cytotoxic activity in the selected cells study (Table 7.B).

There are not many examples in the references of platinum complexes functionalized with a cyclic peptide of this kind, so we have no models to compare with. We found only two examples in the references, but both examples studied whether as transporter<sup>22</sup> or as activators<sup>23</sup> were Pt(IV) complexes.

Based in the lack of information regarding Pt(II) complexes of this kind, we tried to understand further the activity of these complexes. Despite HUVEC cell line is not a carcinogenic model, it produces in excess the  $\alpha_v\beta_3$  integrin, and this overexpression should be very important for our functionalized **Pt(II)-cRGD** complex. For this reason we decided to evaluate the cytotoxicity of **Pt(II)-cRGD** in this cell line. The results indicated that the complex showed a timid improvement on the activity (Table 7.B), that is why it seems important to find a carcinogenic model that shows overexpression in the  $\alpha_v\beta_3$  integrin to confirm our results.

Table 7.B. Results of the cytotoxic activity for **Pt(II)-cRGD** complex and its precursor.

Complexes	Values of IC <sub>50</sub> (μM) in different cells					
	MDAMB231	MCF7	A2780	SKOV3	A549	HUVEC
<b>Pt-II</b>	51.80	60.31	62.31	>100	>100	60.±11
<b>Pt(II)-cRGD</b>	>100	>100	>100	>100	>100	85±15
<b>CDDP</b>	8.5	38.2	-	-	-	-

We also try to prepare the **Pt(IV)-cRGD** complex, but this complex was not stable in solution and we observed the reduction to Pt(II) analogue.

This project was performed in collaboration with the ITN (Institute Tecnológico e Nuclear) during a 5 months stay in Lisbon University (Sacavem campus) in Prof. Isabel Santos' group, under Dr. Filipa Mendes supervision. HUVEC cell lines cytotoxic was performed in a short Term stay (COST CM1105) at University of Groningen (Dr. Angela Casini).

## **7.5 Chapter 6. Heterobimetallic complexes**

### **7.5.1 Background**

Radiopharmaceuticals drugs incorporate a radionuclide in their composition and are administrated to patients for diagnosis or treatment of diseases.<sup>24</sup> The radiotracers containing gamma ( $\gamma$ ) or positron ( $\beta^+$ ) emitting radionuclides are suitable for single photon emission tomography imaging (SPECT-imaging) or positron emission tomography imaging (PET), respectively, whereas those containing  $\beta^-$  or  $\alpha$  emitters are useful for systemic radiotherapy.<sup>25-26</sup> The radiopharmaceuticals currently used in nuclear medicine for SPECT imaging are mainly metal-based compounds, with technetium ( $^{99m}\text{Tc}$ ) accounting for the majority of the complexes used.

The synthesis of Tc and Re complexes relevant for nuclear imaging ( $^{99m}\text{Tc}$ ) or radionuclide therapy ( $^{186/188}\text{Re}$ ) must be performed in aqueous solution, starting from the respective  $\text{Na}[\text{MO}_4]$  obtained by elution of the commercially available  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  and  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  generators. As regards to *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ , it has been firstly shown that this precursor could be obtained by treating  $\text{Na}[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]$  with  $\text{NaBH}_4$  in the presence of CO in aqueous solution. However, CO is a toxic gas, unsuitable for use in hospitals and in commercial radiopharmaceutical kits, a problem which was overcome by the use of boranocarbonate,  $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$ . This compound reduces Tc(VII) and acts as a CO source, through mechanisms not yet fully understood. The synthesis of *fac*- $[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  is only possible by reducing  $[\text{}^{188}\text{ReO}_4]^-$  with a combination of  $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$  and amine borane ( $\text{BH}_3\text{-NH}_3$ ), reflecting the different redox chemistry of Tc and Re.

The diluted nature of the solutions of  $^{99m}\text{Tc}$  complexes ( $10^{-8}\text{ M} - 10^{-10}\text{ M}$ ) makes their structural characterization impossible by the current analytical methods (e.g. elemental analysis, NMR and IR spectroscopy). One of the simplest ways to overcome this issue is to compare the chromatographic behavior of the  $^{99m}\text{Tc}$  complexes with that of the corresponding compounds prepared at the “macroscopic” scale with natural rhenium (“cold metal”), avoiding the use of the long-lived  $\beta^-$  emitter  $^{99}\text{Tc}$  for the characterization of the  $^{99m}\text{Tc}$  complexes. Despite their

differences in terms of ligand exchange reaction kinetics and redox chemistry, Re and Tc present similar physicochemical properties, giving in most of the cases isostructural complexes.<sup>27-30</sup>

This chapter includes a description of the synthesis and characterization of new heterobimetallic complexes Pt-Re and Pt-<sup>99m</sup>Tc. The combination of these metal centers, can have a synergistic effect between chemotherapeutic properties of Pt(II) complexes and <sup>99m</sup>Tc radiotoxic effects.

## 7.5.2 Results

### 7.5.2.1 Synthesis of the tridentate asymmetric pyrazolyl ligand

The synthesis of the pyrazolyl ligand was performed using as starting material, 3,5-dimethylpyrazolyl and following the scheme depicted below (Figure 7.9).

The first step was the synthesis of the ligand **L1**, that was carried out by the alkylation of the 3,5-dimethylpyrazol in the presence of a 1,2-dibromoethane excess in tetrabutylammonium bromide solution, as phase transfer catalyst.

The second step consisted in protecting the amino group of 1,2-diaminoethane using one equivalent of ter-butylidicarbamate with the purpose of protecting only one NH<sub>2</sub> group (**L2**).

Ligand **L3** was obtained, by N-alkylation reaction of the obtained primary amine (**L2**), with halide (**L1**) in the presence of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and KI. The KI in catalytic quantities encouraged the reaction, probably because the iodide replace the bromide in the N-(2-bromoethyl)-3,5-dimethylpyrazol (**L1**), affording a iodide derivative which is capable of more readily reacting with the nucleophilic primary amine (**L2**).

Ligand **L4** was obtained similarly by reacting ligand **L3** (by the N-H) with the halide: N-(3-bromopropyl) phthalimide. In this procedure, we need to use only the weak base (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), as the secondary amine reacted with the bromide directly. We had to purify the crude by column

chromatography with ethyl acetate, all the undesired products were retained into the silica, and the ethyl acetate solution gave the desired product with a 64% yield.

The **L5** and **L6** ligands were accomplished by removing the *t*-butoxycarbonyl (BOC) and the phthalimide group respectively. Both ligands were then ready to be used for the platination and/or the Rhenium coordination.

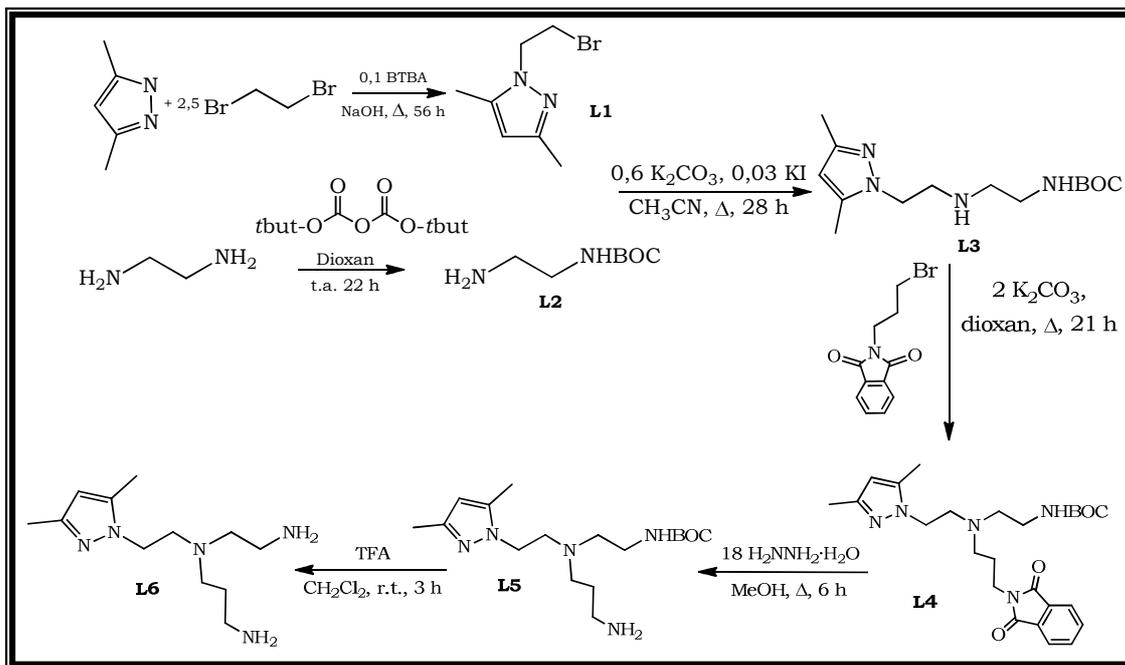


Figure 7.9. General scheme of the synthesis of organic ligands.

Ligand **L5** reacted with *trans*-[PtCl<sub>2</sub>](ipa)(4-picolinic acid) in a coupling reaction using HBTU and HOBT as activators, and affords **PtL5** complex.

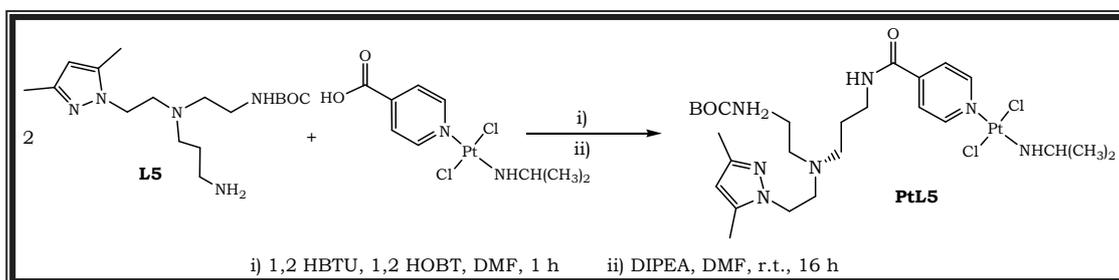


Figure 7.10. Scheme of synthesis of **PtL5**

**PtL5** was deprotected (BOCNH<sub>2</sub>) to achieve the technetium coordination by the treatment of the tridentate pyrazole moiety (Figure 7.10).



## **7.6 Conclusions**

The most significant conclusions are briefly summarized in this section:

1. *Trans* platinum complexes bearing iodide as leaving ligands have been synthesized and studied in detailed:
  - 1.1. The most relevant results with *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amina)(amina')] series were related to the specific cytotoxic activity shown in tumoral cell lines, in particular cisplatin resistant cell lines (HCT116 (-/-) with depletion of p53). Moreover we found a direct correlation between the complexes interaction with DNA models (5'GMP and pBR322), cytotoxicity and their structure.
  - 1.2. Within the *trans*-[PtI<sub>2</sub>(amine)(PPh<sub>3</sub>)] series, only the isopropylamine derivative showed cytotoxic activity in both: sensitive and cisplatin resistance cell lines. Once again, the isopropylamine presence in the structure of the complex seems to have a powerful effect in the cytotoxicity of the series.
2. The monoacetate complexes are the first examples to be reported in the references in which acetate and chloride ligands can be found in the same Pt(II) structure. This combination was aimed to modulate the reactivity of the platinum complexes using the different aquation rates showed by the mentioned ligands.
  - 2.1. These new complexes showed a similar cytotoxic activity that their dichlorido precursors, but they were more effective in the early stage of tumor cells proliferation.
3. The new Pt(IV) complexes synthesized in this work are the only examples found in the reference containing monodentate phosphines ligands, that showed stability enough in solution to allow their study as antitumor agents.
  - 3.1. The *trans*-[PtCl<sub>4</sub>(amine)PPh<sub>3</sub>] complexes showed promising antitumor activity “*in vitro*” in particular, in the cisplatin resistant cells studied.
  - 3.2. The mechanistic studies of Pt(IV) reduction indicated that these complexes were easily reduced in water solution and in the

presence of biological reducing agents (such as GSH). However in the presence of pBR22 in biological media, the Pt(II) species were not easily detected even using the same conditions (GSH).

4. We have prepared the first *trans* platinum (II) complex functionalized with cyclic RGD peptide.
  - 4.1. Studies performed in tumoral cell lines showed that their overexpression of  $\alpha_v\beta_3$  integrin is crucial for the antitumor activity.
  - 4.2. The Pt(IV)-cRGD was not stable enough to be studied in biological systems.
5. To synthesize the complexes designed for "molecular targeting-imaging", we have prepared and characterized of the pyrazolinic ligand appropriate for obtaining heterobimetallics units: Pt-Re and Pt-Tc, using two different procedures:
  - 5.1. In the first method, we synthesized the rhenium-pyrazole complex followed by its coupling to Pt(II) compound. The product obtained was the desired Pt-Re complex, which will be used as a template for the identification and characterization of Pt-Tc complex.
  - 5.2. With the second method, we achieved the PtL5 complex which will allow the final coordination of Tc.

## 7.7 Bibliography

- <sup>1</sup> Rosenberg, B. (1999) *Platinum Complexes for the Treatment of Cancer: Why the Search Goes On, in Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug* (ed B. Lippert), Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich.
- <sup>2</sup> N. Farrell, L. R. Kelland, J. D. Roberts, M. Van Beusichem, *Cancer Res.*, **1992**, 52, 5065.
- <sup>3</sup> F. Basolo, H. B. Gray, R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 4200.
- <sup>4</sup> E. G. Talman, W. Bruening, J. Reedijk, A. L. Spek, N. Veldman, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 854.
- <sup>5</sup> M. J. Cleare, J. D. Hoeschele, *Bioinorg. Chem.*, **1973**, 2, 187.
- <sup>6</sup> A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko, B. K. Keppler, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 2224.
- <sup>7</sup> J. Chatt, L. M. Venanzi, *J. Chem. Soc.*, **1955**, 3858.
- <sup>8</sup> J. Chart, N. P. Johnson, B. L. Shaw, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 1662.
- <sup>9</sup> A. N. Biswas, V. Bagchi, P. Das, P. Bandyopadhyay, *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep.*, **2007**, 63, m2836.
- <sup>10</sup> F. J. Ramos-Lima, A. G. Quiroga, J. M. Perez, M. Font-Bardia, X. Solans, C. Navarro-Ranninger, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2003**, 1591.
- <sup>11</sup> A. C. G. Hotze, E. P. L. van der Geer, S. E. Caspers, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 4935.
- <sup>12</sup> A. G. Quiroga, J. M. Perez, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, N. Farrell, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 224.
- <sup>13</sup> G. H. Bulluss, K. M. Knott, E. S. F. Ma, S. M. Aris, E. Alvarado, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 5733.
- <sup>14</sup> M. D. Hall, H. R. Mellor, R. Callaghan, T. W. Hambley, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 3403.
- <sup>15</sup> L. Kelland, *Expert Opin. Invest. Drugs*, **2007**, 16, 1009.
- <sup>16</sup> Y. Shi, S.-A. Liu, D. J. Kerwood, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 107, 6.
- <sup>17</sup> Y. Jung, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 1387.
- <sup>18</sup> L. T. Ellis, H. M. Er, T. W. Hambley, *Aust. J. Chem.*, **1995**, 48, 793.
- <sup>19</sup> R. O. Hynes, *Cell*, **1992**, 69, 11.
- <sup>20</sup> A. P. Gilmore, *Cell Death Differ.*, **2005**, 12, 1473.
- <sup>21</sup> D. Cheresch, *Cancer Metast Rev*, **1991**, 10, 3.
- <sup>22</sup> L. Gaviglio, A. Gross, N. Metzler-Nolte, M. Ravera, *Metallomics*, **2012**, 4, 260.
- <sup>23</sup> S. Mukhopadhyay, C. M. Barnes, A. Haskel, S. M. Short, K. R. Barnes, S. J. Lippard, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 39.
- <sup>24</sup> G.B. Saha (2010) *Fundamental of Nuclear Pharmacy* (6th ed.).Springer Science Business Media Ed. 175.
- <sup>25</sup> M. D. Bartholoma, A. S. Louie, J. F. Valliant, J. Zubieta, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2903.

- <sup>26</sup> I. Velikyan, *Theranostics*, **2012**, 2, 424.
- <sup>27</sup> Alberto R. (2006) *Radiopharmaceuticals*. In *Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine*; Jaouen G. Wiley-VCH Verlag GmbH Ed.: Weinheim, Germany, 219.
- <sup>28</sup> R. Alberto, *Top. Curr. Chem.*, **2005**, 252, 1.
- <sup>29</sup> R. Alberto, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2003**, 30, 1299.
- <sup>30</sup> G. R. Morais, A. Paulo, I. Santos, *Organometallics*, **2012**, 31, 5693.
- <sup>31</sup> C. Neto, M. C. Oliveira, L. Gano, F. Marques, T. Thiemann, I. Santos, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 111, 1.