



Universitat de Girona

# SÍNTESI, CARACTERITZACIÓ QUÍMICA I ESTUDI DE L'ACTIVITAT BIOLÒGICA DE NOUS COMPLEXOS DE Pt(II) AMB LLIGANDS DE TIPUS DIAMINOCARBOXÍLIC I ELS RESPECTIUS ÉSTERS I DERIVATS PEPTÍDICS

**Sílvia MORADELL RABERT**

**ISBN: 84-688-9869-4**

**Dipòsit legal: GI-91-2003**

<http://hdl.handle.net/10803/8026>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Departament de Química  
Àrea de Química Inorgànica

## **TESI DOCTORAL**

**Síntesi, caracterització química i estudi de l'activitat biològica de nous complexos de Pt(II) amb lligands de tipus diaminocarboxílic i els respectius ésters i derivats peptídics.**

Memòria presentada per

**SÍLVIA MORADELL RABERT**

per optar al grau de

**DOCTORA EN CIÈNCIES QUÍMIQUES**





Departament de Química  
Àrea de Química Inorgànica

## **TESI DOCTORAL**

**Síntesi, caracterització química i estudi de l'activitat biològica de nous complexos de Pt(II) amb lligands de tipus diaminocarboxílic i els respectius ésters i derivats peptídics.**

**SÍLVIA MORADELL RABERT**

**Girona 2002**





Departament de Química  
Àrea de Química Inorgànica

Els sotasignats *Antoni Llobet Dalmases*, Professor Catedràtic del Departament de Química de la Universitat de Girona, i *M<sup>a</sup> Ángeles Martínez Lorente*, Professora Titular de Química Inorgànica de la Universitat de Girona,

CERTIFIQUEM

que la memòria que porta per títol "*Síntesi, caracterització química i estudi de l'activitat biològica de nous complexos de Pt(II) amb lligands de tipus diaminocarboxílic i els respectius ésters i derivats peptídics.*" aplega el treball realitzat sota la nostra direcció per *Sílvia Moradell Rabert*, llicenciada en Ciències Químiques, i que constitueix la seva memòria per optar al grau de Doctora en Ciències Químiques.

I perquè així consti signem el present certificat a Girona, 7 d'Octubre de 2002.

Signat: Dr. Antoni Llobet i Dalmases

Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Martínez Lorente





Departament de Química  
Àrea de Química Inorgànica

## COL·LABORACIONS

Els treballs que es presenten en aquesta tesi doctoral s'han realitzat en el Departament de Química de la UdG amb la col·laboració de diferents centres, gràcies als quals s'han pogut portar a terme diversos experiments:

-Els diversos assaigs de proliferació cel·lular i apoptosi han estat realitzats en l'**Institut de Biotecnologia i Biomedicina**, de la Universitat Autònoma de Barcelona, per la Júlia Lorenzo i Anna Rovira, sota la direcció del professor catedràtic Francesc Xavier Avilés. També pertanyen a aquest centre els diferents cultius cel·lulars i material relacionat.

-Les mesures de Dicroisme Circular i Microscopia de Forces Atòmiques s'han portat a terme en els **Serveis Científic-Tècnics** de la Universitat de Barcelona. El material necessari per la preparació de les respectives mostres ha estat proporcionat pel **Departament de Química** de la Universitat de Barcelona.

-Els estudis a través de RMN-<sup>1</sup>H de la interacció amb 5'-GMP han estat realitzats en els **Laboratoris Gorlaeus**, de la Universitat de Leiden, per Marc Robillard i Steven van Zutphen sota la direcció del professor catedràtic Jan Reedijk.

-Els experiments d'electroforesi en gel d'agarosa s'han realitzat en la **Unitat de Bioquímica**, del Departament de Biologia de la Universitat de Girona.





A la meva família

A l'Enric

## AGRAÏMENTS

La tesi és el resultat de diversos anys de treball, durant els quals coneixes i convius amb moltes persones que t'ajuden, t'animen i et recolzen, i que de ben segur sense elles no hauria arribat on sóc ara. A totes elles, moltes gràcies.

Primer de tot, voldria agrair als meus directors de tesi, la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Martínez i el professor catedràtic Antoni Llobet, per la confiança que han dipositat en mi, i per haver-me ofert aquesta gran oportunitat d'ampliar la meva formació, tant acadèmica com personal.

Sóc conscient que en aquesta vida no es pot fer gaire res si no es té diners, i potser en el món de la recerca això és una realitat palpable. Per aquest motiu, agraeixo personalment al llavors rector de la Universitat de Girona, Josep M<sup>a</sup> Nadal Farreres, la concessió per acció especial d'una beca pre-doctoral de recerca. A la DGI CYT pel suport econòmic al projecte PB96-0467 i a la CI RIT de la Generalitat de Catalunya pel suport econòmic dels projectes SGR95/234, SGR97/247 i SGR99/166. A la companyia Johnson & Matthey per la donació de PtCl<sub>2</sub> i K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>, compostos sense els quals no hagués pogut treballar.

També vull agrair molt sincerament l'ajuda i dedicació que he trobat en tota una sèrie de persones que no són del Departament de Química, sense les quals no hagués pogut realitzar molts dels experiments. Primer de tot, voldria donar les gràcies al professor catedràtic Rafael de Llorens, del Departament de Biologia de la UdG, per haver-me guiat en els aspectes bioquímics de la meva tesi i haver-me ajudat a perfilar el contingut d'aquests treballs. Gràcies per la confiança que ha dipositat en mi i per tot allò que he pogut aprendre dels seus coneixements. No voldria deixar-me de mencionar a la Glòria, la Sílvia, la Rosa, i molt especialment a la Laura, per haver-me ajudat i aconsellat en els experiments bioquímics que he realitzat en els laboratoris de biologia de la UDG, i per no haver dubtat en deixar-me tot allò que he necessitat.

Moltes gràcies a la Julia Lorenzo i a l'Anna Rovira, de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la UAB, per haver realitzat els assaigs de proliferació cel·lular i citometria de flux. Per la constància, dedicació i il·lusió que han mostrat en tot moment,

i per haver-me acollit sempre amb tanta amabilitat. Gràcies Julia per haver-me ensenyat com es realitzen molts dels experiments biològics i per haver dedicat tanta part del teu temps a tirar endavant el nostre projecte i a fer realitat els resultats que es presenten en aquesta tesi.

Vull agrair de tot cor l'ajuda que he rebut de la Dra. Virtudes Moreno, del Departament de Química Inorgànica de la UB, tant per haver-me ensenyat a realitzar els experiments de DC i AFM, com per deixar-me utilitzar les seves instal·lacions i haver-me resolt tots els dubtes que he tingut. Per la seva simpatia i amabilitat i fer-me sentir molt còmode treballant al seu costat. Ha estat tot un plaer. Gràcies també a la M<sup>a</sup> José Prieto per la dedicació i realització de les imatges de AFM i per ajudar-me a interpretar els assaigs d'electroforesi. Gràcies a l'Albert per l'ajuda que m'ha ofert en els assaigs de DC i a la simpatiquíssima Rosa pel seu acolliment i el seu somriure.

Moltíssimes gràcies al Prof. Jan Reedijk, en Marc Robillard i en Steven van Zutphen, de la Universitat de Leiden, per la realització dels estudis d'interacció Pt-GMP per RMN, per llur col·laboració i confiança.

Voldria agrair també a la Dra. Elena Pinilla, de la Universitat Complutense de Madrid, per la realització de la difracció de raig X, i al Dr. Jordi Benet, de la Bayer, per haver intentat cristal·litzar uns complexos una mica rebels. A la Dra. Lluïsa Matas, del Servei de RMN de la UdG, per l'ajuda i els consells.

Ara voldria centrar el protagonisme a tots els companys de treball amb els quals he passat el dia a dia, amb moments realment molt bons, però també alguns moments tristos. A les companyes del 201, a l'Anna, la Judit i l'Ester, per les grans xerrades que hem tingut, pels bons moments que hem passat en el laboratori juntes i per ajudar-me en tot allò que he necessitat...però sobretot per fer front al indiscutible "rei" del laboratori!, el Rei Ayats, Carles Ayats. Em sembla que mai havia conegut una persona que fos l'animació personificada. Amb ell és impossible no riure i passar-s'ho bé, i per més que ens costés a totes nosaltres reconèixer-ho, la seva absència es feia notar.

A la resta de companys del meu grup, la Montse, la Carme, la Cristina, en Raul i en Xevi Sala. A la Montse, per la infinitat de coses en què m'ha ajudat, i no només de la feina, sinó en consells. Per les estones agradables que hem passat treballant i xerrant al

despatx i per interessar-se per com m'anaven les coses. A la Carme, per haver estat sempre disposada a donar-me un cop de mà, i no haver escatimat mai esforços per aconseguir un objectiu. A la Cristina per la seva amistat i per fer-me costat en els atacs verbals (en broma, tot s'ha de dir) contra en Raul. Per haver estat sempre disposada a escoltar-me i ajudar-me. En Raul, a qui m'agrada fer enfedar, però sap de segur que no ho faig amb mala intenció, sinó per riure una estona, que sinó tot seria massa monòton. Per la confiança que ha dipositat en mi, per deixar-me ajudar-lo i aconsellar-lo i per haver-me sabut comprendre en determinats moments. En Xevi, el nou membre del grup a qui li vull donar molts ànims i li desitjo molta sort en la seva recerca. També vull mencionar en Xavi Ribas i l'Elena, que en el seu moment també em van ajudar molt com a companys de grup i amb els qui també vaig compartir moments agradables.

A la resta de companys inorgànics, en Josep Nadal, en Jordi, en Dani, la Nuri, en Josep Duran i la Marisa, perquè a més de ser companys també han sigut uns grans amics. A la resta de companys orgànics, alguns dels quals ja no hi són, amb els qui he compartit grans estones en les reunions improvisades en el despatx, en David, la Pilar, en Santi, en Juan Carlos, en Xevi Serrats, la Gemma Cabarrocas i en Xevi Fontrodona (que ara està en el Servei de RMN). A la resta de companys del Departament de Química amb qui he pogut comptar sempre, en especial a la Carolina, la Montse i la Teia, amigues des de la carrera.

Em guardo l'últim paràgraf per donar les gràcies, i molt més, a les cinc persones més importants de la meua vida. Als meus pares, per haver-me recolzat tant en els bons moments com en els dolents, per estar al meu costat sempre que ho he necessitat i per haver-me animat i escoltat en tot moment. Gràcies per ser tal i com sou...fantàstics!. Als meus germans, Nuri i Francesc, pels vostres consells, per estar sempre disposats a donar-me un cop de mà i per les maravilloses estones que passem junts. I finalment l'alegria dels meus ulls, l'Enric, que un dia vaig tenir la gran sort de conèixer i ara sense ell no podria estar. Perquè ets la persona més especial de la meua vida i la meua font de felicitat.



## ÍNDEX GENERAL

---

# SINOPSIS

## CAPÍTOL 1

### Introducció



En aquest capítol es fa una breu introducció sobre l'origen de les drogues antitumorals de platí, fent especial menció al **cisplatí**, a les seves propietats i mecanisme d'actuació. Malgrat l'èxit d'aquesta droga, el seus greus efectes secundaris i els problemes de resistència en determinats tumors han provocat el desenvolupament de noves drogues antitumorals de platí. Es presenta una mostra dels diferents tipus de nous compostos de platí que són actius in vitro i/o in vivo, i es donen a conèixer diversos compostos d'altres metalls que presenten també activitat antitumoral.

## CAPÍTOL 2

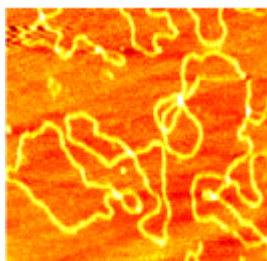
### Objectius



Els objectius d'aquest treball es centren en la síntesi de nous complexos de Pt(II) que puguin ser efectius en el tractament del càncer i puguin reduir els efectes secundaris derivats del tractament amb el cisplatí.

## CAPÍTOL 3

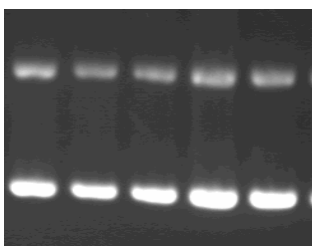
**Síntesi i caracterització dels complexos de Pt(II) amb els lligands 2,3-diaminopropiònic i 2,4-diaminobutíric i els respectius ésters etílics. Estudi de llur interacció amb el DNA i de l'activitat antitumoral.**



En aquest capítol es descriu la síntesi i caracterització química de quatre complexos de Pt(II) amb lligands diaminoquelatants: **PtCl<sub>2</sub>(dap)**, **PtCl<sub>2</sub>(dab)**, **PtCl<sub>2</sub>(Etdap)** i **PtCl<sub>2</sub>(Etdab)**. L'efecte biològic d'aquests compostos s'ha avaluat en quatre etapes: 1. Existència d'interacció amb el DNA a través de dicromisme circular, electroforesi en gel d'agarosa i AFM; 2. Mecanisme d'actuació a través de la interacció Pt-GMP; 3. Percentatge de supervivència cel·lular; 4. Tipus de mort cel·lular.

## CAPÍTOL 4

**Síntesi i caracterització de nous complexos de Pt(II) amb lligands diaminoquelatants contenint aminoàcids com a substituents. Estudi de llur interacció amb el DNA i de l'activitat antitumoral.**

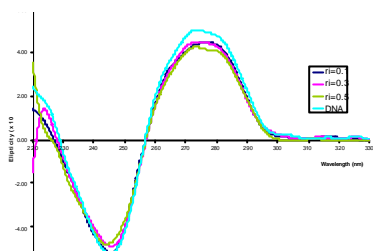


En aquest capítol es descriu la síntesi i caracterització de vuit nous complexos de Pt(II) amb lligands diaminoquelatants que contenen substituents de tipus aminoàcid (èster metílic de L-alanina, L-alanina, L-fenilalanina i èster metílic de L-triptofà). L'activitat biològica d'aquests compostos s'avalua en diverses etapes: 1. Interacció amb el DNA a través de les tècniques de dicromisme circular, electroforesi en gel d'agarosa i AFM; 2. Mecanisme d'actuació a través de la interacció Pt-GMP; 3. Percentatge de supervivència cel·lular; 4. Tipus de mort cel·lular.



## CAPÍTOL 5

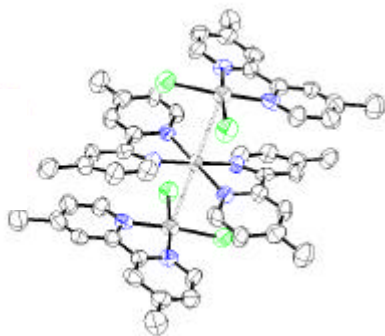
### Síntesi i caracterització de lligands diaminoquelatants amb substituents de tipus peptídic i complexació amb Pt(II). Estudi de la interacció amb el DNA i de l'activitat antitumoral.



En aquest capítol es descriu la síntesi i caracterització química de tres nous lligands diaminoquelatants contenant substituents peptídics amb diferent nombre d'aminoàcids: [(dap-TNYT-OCH<sub>3</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-TTNYT-OCH<sub>3</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH]. S'ha preparat i caracteritzat el complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>), el qual ha demostrat tenir capacitat per interaccionar amb el DNA i modificar la seva estructura secundària. Els assaigs de proliferació cel·lular han demostrat que aquest complex produeix mort cel·lular, però el pèptid lliure per si sol també es mostra actiu. Tot i això, l'activitat del complex és més important que la del pèptid lliure.

## CAPÍTOL 6

### Síntesi d'un nou complex trinuclear de Pt(II). Caracterització espectroscòpica i estructural.



En aquest capítol es descriu la síntesi d'un complex trinuclear de Pt(II), [Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)]<sub>2</sub>[PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)]<sub>2</sub>(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>. El complex s'ha caracteritzat per tècniques espectroscòpiques i s'ha pogut resoldre la seva estructura per difracció de raig-X. A través de la seva estructura cristal·lina s'ha pogut observar l'existència d'una interacció Pt-Pt intermolecular de 3.474 Å.

## CAPÍTOL 7

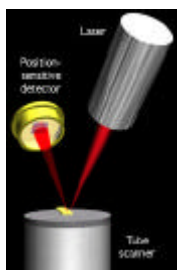
### Conclusions



En aquest capítol es fa un recull de les conclusions generals que es poden extreure dels treballs presentats en els diferents capítols de la tesi.

## ANNEX

### Breus fonaments de les tècniques d'anàlisi de l'activitat biològica de compostos amb propietats antitumorals



En aquest apartat es fa una introducció a les diferents tècniques d'anàlisi de l'activitat biològica emprades en els estudis presentats en aquesta tesi: **dicromisme circular**, **electroforesi en gel d'agarosa**, **microscopia de forces atòmiques**, **assaigs de proliferació cel·lular** i **citometria de flux**.

**ABREVIATURES**

A	Adenina.
AE	Anàlisi Elemental.
AFM	Microscopia de Forces Atòmiques.
An	Annexina
ApG	Dinucleòtid adenina-fosfat-guanina.
as.	Assimètric.
b.a.	Banda ampla.
BOC	Terc-butoxicarbonil.
(BOC) <sub>2</sub> O	di-terc-butildicarbonat.
bpy	2,2' -bipiridina.
C	Citosina.
cm	Centímetres.
DACH	Diaminociclohexà.
DC	Dicroisme Circular.
dien	1,5-diamino-3-azapentà.
DMEM	Medi Eagle modificat per Dulbecco
DMF	N,N-dimetilformamida.
DMSO	Dimetilsulfòxid.
DNA	Àcid desoxiribonucleic.
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic.
EGF	Factor de creixement epidèrmic.
EGFR	Receptor del factor de creixement epidèrmic.
en	1,2-diaminoetà.
ESI-MS	Espectrometria de masses amb ionització electrosprai.
EtOH	Etanol
FITC	isotiocianat marcat amb fluorescència.
G	Guanina.
GMP	Mononucleòtid guanina monofosfat.

GpG	Dinucleòtid guanina-fosfat-guanina.
gr	Grams.
h	Hora.
HEPES	Àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfònic.
HMG	Grup d'Alta Mobilitat.
IR	Infraroig.
m	Metres
M	Molar.
m/z	Massa/Càrrega.
MeOH	Metanol
mg	Mil·ligram.
mL	Mil·lilitre.
MM	Marcador Molecular.
Mm	Massa molecular
mM	Mil·limolar
mmol	Mil·limol.
OAc	Acetat.
PBS	Tampó fosfat salí.
ph	Fenil.
phen	1,10-fenantrolina.
phi	Diimina fenantroquina.
PI	Iodur de propidi.
PS	Pur per síntesi.
py	Piridina.
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear.
RNA	Àcid ribonucleic.
rpm	Revolucions per minut.
si.	Simètric
st.	Stretching.
$t_{1/2}$	Temps de vida mitja.

TAE	Tris-acetat-EDTA
TBE	Tris-borat-EDTA.
TE	Tris-EDTA.
THF	Tetrahidrofurà.
TMS	Tetrametilsilà.
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometà.
UV	Ultraviolat
V	Volts.



## CAPÍTOL 1

---

### INTRODUCCIÓ GENERAL



## Introducció General

### ÍNDIX

1. El càncer	9
2. Origen i evolució de les drogues antitumorals de platí des dels inicis fins a l'actualitat	10
3. Mecanisme d'actuació de la cèl·lula	13
4. Disseny de noves drogues antitumorals de platí	29
5. Compostos quimioterapèutics de metalls diferents del platí	42
6. Assaigs pre-clínics i clínics	48
7. El futur de les drogues antitumorals	48
8. Referències	51





## 1. EL CÀNCER.

El càncer és el resultat d'una sèrie de mutacions que deixen a les cèl·lules lliures dels controls de la proliferació cel·lular i supervivència. Les cèl·lules pateixen mutacions degut a una sèrie d'accidents i adquireixen l'habilitat de proliferar sense cap restricció. Les cèl·lules progenitores hereden aquestes mutacions i donen lloc a un tumor, el qual pot créixer sense límit.<sup>1,2</sup>

Se sap poc sobre els mecanismes que regulen el creixement local normal i anormal. És probable que l'alteració del microambient d'un tumor primari alteri els mecanismes locals de regulació i faciliti la progressió tumoral. Al creixement local li segueix el metastàtic. Aquest procés presenta les etapes de separació del focus d'origen, desplaçament, infiltració en altres òrgans, supervivència, assentament i desenvolupament en el nou i diferent microambient. L'heterogeneïtat del tumor primitiu determina les diferències que es registren no només entre el tumor primitiu i les seves metastasis, sinó també entre les metastasis d'un mateix tumor en òrgans diferents.

Les mutacions que fan que les cèl·lules tumorals siguin defectuoses afecten a dues classes de gens:

**-Gens de proliferació:** que codifiquen les proteïnes que ajuden a promoure la divisió cel·lular.

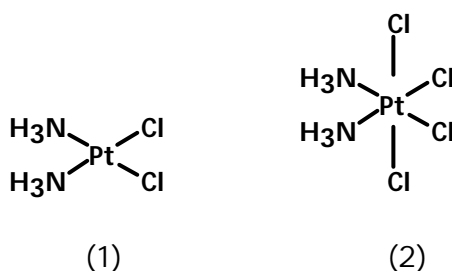
**-Gens d'antiproliferació:** que codifiquen les proteïnes que ajuden a aplicar els frens del cicle cel·lular.

Una mutació en un gen de proliferació que fa que la proteïna que produeix aquest gen estigui sobreexpressada o hiperactiva dóna lloc a una multiplicació cel·lular excessiva. El gen mutant es classifica com a **oncogen** i és un gen promotor del càncer. Una mutació que inactivi un gen d'antiproliferació pot alliberar una cèl·lula de les restriccions normals durant la multiplicació cel·lular i donar lloc a una proliferació cel·lular excessiva. Aquests gens d'antiproliferació que estan presents en les cèl·lules normals es coneixen també amb el nom de **gens supressors del càncer**. Per tant, els gens amb mutacions poden promoure el càncer, estimulants les cèl·lules a proliferar en absència de senyals extracel·lulars apropiats.

Cal destacar també, que els factors de creixement epidèrmic (**EGF**) i els seus receptors (**EGFR**) estan implicats en molts aspectes en el creixement de cèl·lules tumorals. S'ha pogut determinar que els EGFR estan sobreexpressats en moltes cèl·lules tumorals epitelials i són unes dianes potencials per les teràpies antitumorals, de manera que l'activació de la proliferació cel·lular es veu incrementada en aquest tipus de cèl·lules.<sup>2</sup>

## 2. ORIGEN I EVOLUCIÓ DE LES DROGUES ANTITUMORALS DE PLATÍ DES DELS INICIS FINS A L'ACTUALITAT.

L'interès per les drogues antitumorals basades en el platí es remonta en els anys seixanta quan *Rosenberg* i col·laboradors van descobrir de forma inesperada la inhibició de la divisió cel·lular provocada per complexos de Pt.<sup>3</sup> Rosenberg estudiava els efectes que produïen els corrents elèctrics, generats per electrodes de Pt, sobre cultius de *E. Coli* i va observar el creixement cel·lular sense divisió. En estudis posteriors es va demostrar que la causa del creixement anòmal dels bacteris era una substància química que es formava en l'electròlisi del Pt dels electrodes amb el clorur d'amoni del medi de cultiu. De les diverses espècies de Pt formades, el **cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]** (**cisplatí**) (1) i **cis-[PtCl<sub>4</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]** (2) eren els responsables d'aquest fenomen.<sup>4,5</sup>

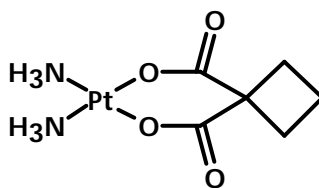


La possibilitat que presentaven els compostos de Pt d'utilitzar-los en el tractament del càncer va fer que Rosenberg i els seus col·laboradors portessin a terme experiments amb les línies cel·lulars sarcoma 180 i leucèmia L1210.<sup>4,6,7,8,9</sup> Aquests experiments van permetre que a l'any 1971 el cisplatí entrés en fase clínica I.<sup>10</sup> No va

ser fins a l'any 1978 que es va aprovar el cisplatí pel tractament del càncer de testicle i ovari. Avui en dia, el cisplatí és una de les drogues més utilitzades pel tractament de tumors,<sup>11,12</sup> és molt efectiu en el tractament del càncer de testicle i ovari, i contribueix en el tractament del càncer de vegina, coll, cap, pulmó, esòfag, estòmac i diversos limfomes.<sup>13,14</sup> Malgrat l'èxit, el cisplatí presenta un gran desavantatge, com és la seva alta toxicitat. Els efectes secundaris que presenta el cisplatí (nàusees, vòmits, toxicitat renal, pèrdua de cabell, pèrdua parcial de l'audició i visió, neuropaties, etc.) fa que la dosi que es pot aplicar als pacients estigui limitada, essent les dosis típiques de 100 mg/dia durant cinc dies seguits.<sup>15</sup>

Tot i la utilització del cisplatí, el seu ús està limitat a uns determinats tumors, ja que alguns presenten una resistència natural a la droga i altres poden desenvolupar resistència després d'iniciar el tractament. El cisplatí també té una solubilitat limitada en solució aquosa i és administrat per via intravenosa. Aquests inconvenients van donar lloc al desenvolupament de millors drogues antitumorals de Pt.

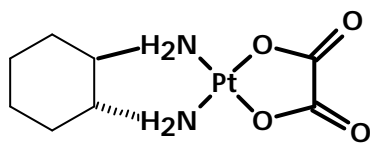
Des de la introducció del cisplatí, milers de compostos de Pt han estat sintetitzats i avaluats com a agents antitumorals. Uns 28 compostos han entrat en fases d'assaig clínic,<sup>11,16</sup> però només el **cis-diamino-[1,1-ciclobutandicarboxilat (2-)]-O,O'-platí (II) (carboplatí) (3)** ha rebut l'aprovació i ha aconseguit un ús clínic rutinari.



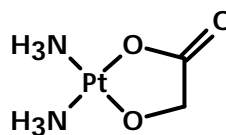
(3)

El carboplatí és menys tòxic que el cisplatí i es pot subministrar en dosis molt més grans que el cisplatí (2000 mg/dosi).<sup>15</sup> Tot i la menor toxicitat del carboplatí, aquest encara només és actiu en el mateix rang de tumors que el cisplatí. Recentment uns altres 2 compostos de Pt han rebut una aprovació limitada a l'ús en alguns països. El **trans-(L-diaminociclohexà)oxalatoplatí (II) (Oxaliplatí) (4)** ha estat aprovat a França i altres països europeus, Àsia, Amèrica Llatina i recentment el seu ús ha estat acceptat

als Estats Units.<sup>17</sup> El **cis-diamino-glicolat-O,O'-platí (II) (nedaplatí)** (5) ha estat aprovat en el Japó.<sup>16</sup>



(4)



(5)

Fins ara, l'oxaliplatí i el nedaplatí no han demostrat cap avantatge clar per sobre del cisplatí i carboplatí, tot i que l'oxaliplatí ha demostrat potencial per utilitzar-lo en tumors resistents al cisplatí.

Per tant, la recerca d'agents antitumorals de Pt millors continua, motivada pel desig de dissenyar compostos menys tòxics i actius, de subministració oral i que no presentin resistència creuada amb el cisplatí i carboplatí.

Després de la introducció del cisplatí, el disseny de noves drogues de Pt es va centrar principalment en anàlegs directes del cisplatí, els quals presentaven una geometria cis, dos lligands donors tipus amina, i dos lligands làbils aniònics. Amb els resultats obtinguts, *Cleare* i *Hoeschele* van establir una sèrie de relacions estructura-activitat:<sup>18,19</sup>

- a. Els isòmers cis interfereixen en la divisió cel·lular, però els corresponents isòmers trans no són actius.
- b. Dos lligands làbils en cis són necessaris, però no suficients.
- c. Els lligands làbils haurien d'estar enllaçats de forma moderadament forta, perquè aquells compostos amb lligands altament làbils són tòxics i els compostos amb lligands fortament enllaçats són menys actius.
- d. El complex ha de ser neutre.
- e. L'elevada activitat es troba en aquells complexos on els lligands amina tenen menys substituents alquil.

Els complexos de Pt amb lligands amina són probablement els més adequats per una unió covalent efectiva amb el DNA. A més, els enllaços N-H tenen la possibilitat de formar interaccions per pont d'hidrogen amb els N heterocíclics dels nucleòtids. Inicialment, es va observar que era essencial per a cada lligand amina portar, al menys, un àtom d'hidrogen per tal d'observar una activitat significativa.<sup>20</sup> A part de les amines, es van tenir en compte també els lligands intercal·ladors ja que els efectes que causaven al DNA donaven lloc a una activitat biològica remarcable.

El paper de la solubilitat és també molt important.<sup>21</sup> El transport per difusió a través de la membrana cel·lular està facilitat per l'elevada lipofília, però la toxicitat mínima està associada a una solubilitat moderada en aigua i en dissolvents no polars, i l'activitat està relacionada amb una solubilitat màxima en aigua.

Aquestes relacions estructura-activitat van dominar el disseny de les drogues de platí durant 20 anys, i s'han mantingut vàlides fins fa poc temps. No obstant, és evident que aquests anàlegs del cisplatí i carboplatí no ofereixen cap avantatge clínic per sobre de les drogues existents. Per això, un gran nombre de científics han pres una nova línia pel disseny de drogues de platí i han preparat compostos que violen les relacions estructura-activitat clàssiques, els quals mostren activitat antitumoral. Els esforços també s'han orientat cap al disseny racional de compostos amb característiques específiques que els hi permeti ser administrats oralment.

### **3. MECANISME D'ACTUACIÓ DEL CISPLATÍ.**

#### **3.1. ENTRADA DEL CISPLATÍ EN LA CÈL·LULA.**

El cisplatí és administrat per injecció intravenosa com a solució aquosa salina. Aproximadament la meitat del platí s'uneix a proteïnes del siero i és excretat. La resta es distribueix per diversos teixits. En el siero, la droga es manté com a cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] degut a l'elevada concentració de clorur (100 mM). Com a molècula neutra difon de forma passiva a través de la membrana cel·lular fins al citoplasma (tot i que hi ha alguna evidència que l'entrada és en part per un mecanisme de transport actiu)<sup>22</sup> on la

concentració de l'ió clorur és bastant més baixa (3 mM), de manera que el complex s'hidrolitza. La hidròlisi produeix complexos catiònics com  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)\text{Cl}]^+$ , que difonen cap al DNA on s'uneixen i provoquen lesions citotòxiques. Les reaccions d'hidròlisi del cisplatí es mostren en la Figura 1.

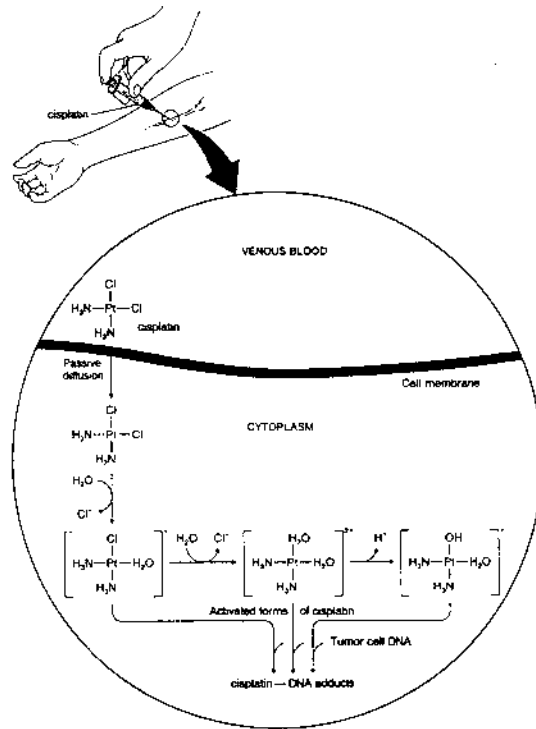
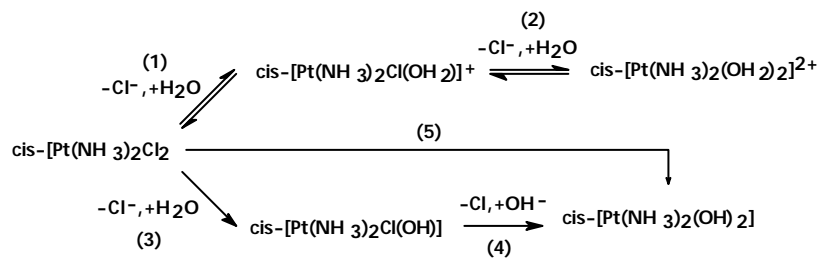


Figura 1. Administració intravenosa i química in vivo de la droga antitumoral cisplatí

Miller i House<sup>23,24</sup> van obtenir les constants de velocitat i d'equilibri dels passos reversibles i els corresponents paràmetres d'activació (Esquema 1).



Esquema 1. Reaccions d'hidròlisi del cisplatí.

Els passos 3,4,5, són irreversibles, cosa que no sorprèn ja que l'enllaç  $\text{Pt}^{\text{II}}\text{-OH}$  és molt estable.  $k_3$  no es va poder obtenir, suggerint que el pas 3 és ràpid o que  $k_3$  és molt similar a  $k_4$ . Els passos 4 i 5 són independents de  $[\text{OH}^-]$ , indicant que l'aigua i no l'hidroxid és el nucleòfil.  $k_1$ ,  $k_2$ , i  $k_4$  són aproximadament equivalents, suggerint un únic mecanisme bàsic.

La unitat  $\text{cis-Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2$  és remarcablement estable. És resistent a l'atac de fosfats, amines o grups carboxilat, tot i que pot ser destruïda per l'ió cianur i sistemes que contenen sofre.

### 3.2. DIANES CEL·LULARS DEL CISPLATÍ.

Molts components cel·lulars, com el RNA, proteïnes, DNA, fosfolípids de la membrana, microfilaments del citoesquelet, reaccionen amb el cisplatí. La primera pista que va permetre identificar la principal diana biològica va ser el creixement filamentós dels bacteris induït pel cisplatí, un fenomen característic d'agents que afecten el DNA com la radiació U.V., radiació ionitzant i la hidroxiurea,<sup>25,26,27</sup> tot i que hi ha algunes evidències que suggereixen la involucració d'algunes dianes que no són el DNA.<sup>28</sup> El cisplatí interacciona amb els fosfolípids i la fosfatidilserina en les membranes,<sup>29,30</sup> afecta el citoesquelet, i afecta la polimerització de l'actina,<sup>31,32</sup> segurament degut als canvis conformacionals que resulten de la formació d'enllaços Pt-S. Per tant, tot i que hi ha evidències d'altres dianes biològiques que poden ser importants en el mecanisme del cisplatí, en general s'ha acceptat que el DNA és la diana principal.

El **DNA** és una molècula helicoidal formada per dues cadenes lineals polinucleòtides en les que els grups fosfat uneixen les posicions 3' i 5' dels residus de sucre consecutius (Figura 2).

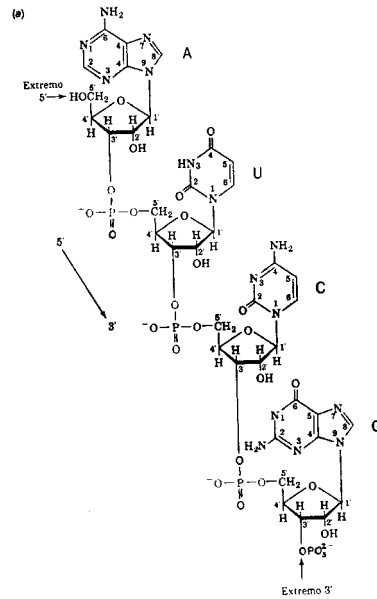


Figura 2. Esquema de l'estructura d'un tetranucleòtid. Els números dels àtoms de sucre porten el superíndex prima per diferenciar-los de les posicions atòmiques de les bases.

El DNA presenta dues funcions principals:

- Dirigir la seva pròpia replicació durant la divisió cel·lular.
- Dirigir la transcripció de molècules de RNA complementàries.

Cada base del DNA està unida per un enllaç d'hidrogen a una altra base de la cadena oposada formant un parell de bases. Només estan permesos dos tipus de parells de bases: cada residu d'adenina s'ha d'aparellar amb un residu de timina i viceversa, i cada residu de guanina s'ha d'aparellar amb un residu de citosina i viceversa. Són els anomenats **parells de bases de Watson-Crick**.<sup>33</sup>

El DNA pot adoptar diverses estructures, depenent de factors com la humitat, els cations presents i la seqüència de les bases. Existeixen diferents formes de DNA:

**A-DNA:** Presenta una conformació de la doble hèlix amb gir cap a la dreta. Els parells de bases estan inclinats respecte l'eix de l'hèlix, i en cada volta de l'hèlix existeixen 11 parells de bases. L'angle de curvatura és de 33° i l'elevació de l'hèlix per parell de bases és de 2.6 Å. Aquesta forma del DNA es troba en graus d'humitat baixa.



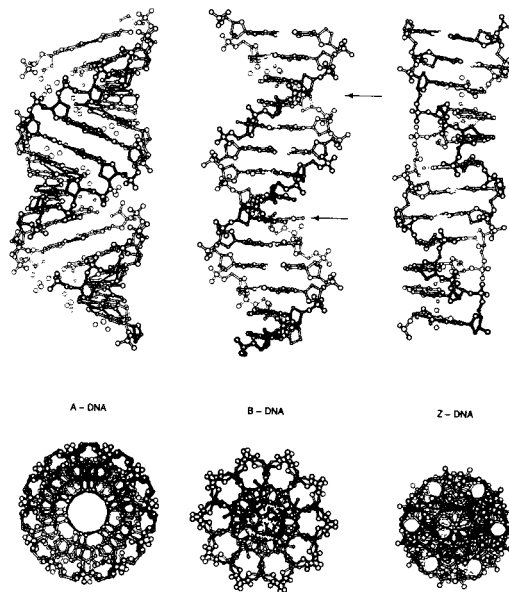
**B-DNA:** Presenta una conformació de la doble hèlix amb gir cap a la dreta. Els parells de bases de l'estructura estan disposats perpendicularment a l'eix de la doble hèlix, i existeixen 10 parells de bases en cada volta. L'angle de curvatura és de  $36^\circ$  i l'elevació de l'hèlix per parell de bases és de 3.4 Å. Aquesta forma del DNA es troba en graus d'humitat alta i és considerada la forma nativa del DNA.

**C-DNA:** És una forma polimorfa de DNA amb una conformació de la doble hèlix amb gir cap a la dreta. Conté 9.3 parells de bases per cada volta de la doble hèlix, un angle de curvatura de  $38.6^\circ$  i una elevació de l'hèlix de 3.32 Å. El C-DNA s'assembla al B-DNA amb petites variacions en els paràmetres conformacionals.

**D-DNA:** És una altra conformació amb gir de la doble hèlix cap a la dreta. Els parells de bases de l'estructura estan inclinats respecte a l'eix de l'hèlix, i conté 8 parells de bases per cada volta.

**Z-DNA:** Presenta una conformació amb gir cap a l'esquerra. L'angle de curvatura és de  $60^\circ$  (per dímer) i l'elevació de l'hèlix per parell de bases és de 3.7 Å. Conté 12 parells de bases per cada volta. La unitat repetitiva, a diferència de les altres formes de DNA, és un dinucleòtid en comptes d'un nucleòtid.

Les formes de DNA més conegudes són la A, B i Z i llur estructura es presenta en la Figura 3.



**Figura 3. Representacions laterals i superiors del DNA A, B i Z. Les fletxes indiquen el solc menor (a dalt) i el solc major (a baix).**

L'anell del sucre no és pla, té un cert grau de flexibilitat que afecta a la conformació de l'esquelet sucre-fosfat. La geometria del sucre és important conformacionalment perquè governa l'orientació del substituent de fosfat respecte a cada residu de sucre.

### 3.3. ADDUCTES FORMATS PEL CISPLATÍ AMB EL DNA.

Els adductes bifuncionals que impliquen cross-links intracadena o intercadena amb el DNA o els cross-links amb el DNA i proteïnes es consideren importants per l'activitat biològica. S'ha observat que el compost  $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$  (dien= 1,5-diamino-3-azapentà), per exemple, i altres compostos similars inactius només s'enllacen de forma monofuncional.<sup>34</sup>

Els adductes que forma majoritàriament el cisplatí amb el DNA (Figura 4) són els cross-links 1,2-intracadena a través de bases adjacents, de manera que els adductes cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{GpG})\}]$  (cis-GG) comprenen el 47-50 % dels adductes formats i els cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{ApG})\}]$  (cis-AG) comprenen un altre 23-28%. A més, es formen un 8-10% de cross-links 1,3-intracadena a través de guanines no adjacents (cis-GNG) i adductes

intercadena. Un altre 2-3% de productes formats són el resultat d'enllaços monofuncionals amb la guanina.<sup>35</sup>

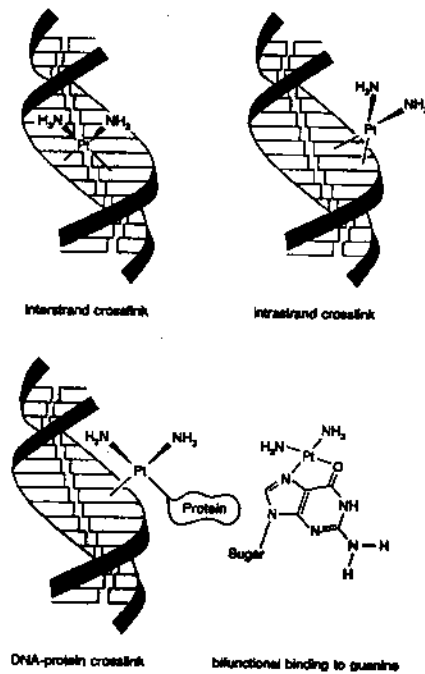


Figura 4. Representació dels diferents adductes que forma el cisplatí amb el DNA.

En tots els casos, el platí s'enllaça a l'àtom N7 de la base purínica (Figura 5). La preferència per l'àtom N7 de la guanina és deguda simplement a que és la base més tova. No obstant, *Reily i Marzilli*<sup>36</sup> van suggerir que la poca reactivitat de l'adenina comparada amb la de la guanina era deguda a efectes estèrics ja que en la posició 6, el NH<sub>2</sub> de l'adenina és més voluminós que el grup O de la guanina.

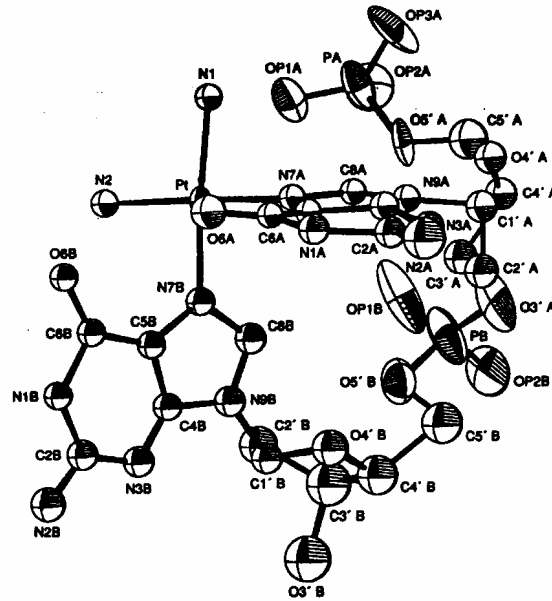


Figura 5. Diagrama ORTEP de l'estructura cristal·lina de l'adducte bifuncional Pt(GpG) on s'observa clarament l'enllaç a través de la posició N7 de la guanina.

Una de les diferències més importants entre el cisplatí i el seu isòmer inactiu, **transplatí**, es troba en la capacitat de formar diferents tipus de cross-links amb el DNA. Els dos compostos formen adductes bifuncionals amb el DNA unint-se a les posicions N7 de la guanina i adenina. Però degut a la seva estereoquímica, el transplatí no pot formar adductes 1,2-intracadena d(GpG) ni d(ApG).<sup>37</sup>

El principal producte que forma el transplatí és amb un 50% el trans-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(GMP)}{d(CMP)}], amb un 40 % el trans-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(GMP)}<sub>2</sub>] i amb un 10% el trans-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(GMP)}{d(AMP)}].<sup>38</sup> En el producte on el platí s'uneix a la citosina, la interacció es produeix en la posició N3 de la base.

En la unió del cisplatí amb el DNA, un lligand clorur s'hidrolitza quan el cisplatí entra en la cèl·lula. Aquesta reacció d'hidròlisi és el pas limitant de la unió amb el DNA, amb un temps de vida mitja de 2h.<sup>39,40,41</sup> Seguidament, el cisplatí s'uneix a l'àtom N7 de la guanina, la qual desplaça la molècula d'H<sub>2</sub>O de forma relativament ràpida ( $t_{1/2} \approx 0.1h$ ) formant un adducte monofuncional. La hidròlisi d'un segon lligand clorur permet la formació d'un adducte bifuncional amb  $t_{1/2} \approx 2h$ .<sup>39,41</sup>

La formació de l'adducte monofuncional amb el DNA té lloc a una mateixa velocitat tant pel cisplatí com pel transplatí. Pel que fa a la velocitat del segon pas per

formar l'adducte bifuncional hi ha certa controvèrsia. Alguns estudis revelen que la velocitat és similar en els dos casos, mentre que altres conclouen que el transplatí forma adductes bifuncionals de forma més lenta.<sup>42,43</sup> La diferència de velocitat podria explicar la diferent activitat biològica que presenten els dos compostos.

### 3.4. EFECTES DE LA UNIÓ Pt-DNA.

#### 3.4.1. Efectes estructurals.

La formació dels cross-links cisplatí-DNA provoca la distorsió del DNA (Figura 6). La unió del cisplatí pot causar el desenrotllament del DNA, i en nivells de saturació, pot fer més curta la doble hèlix fins a un 50%.<sup>44,45,46</sup> La formació d'aquests adductes també genera una pèrdua de l'estabilitat de l'hèlix.<sup>47,48,49</sup>

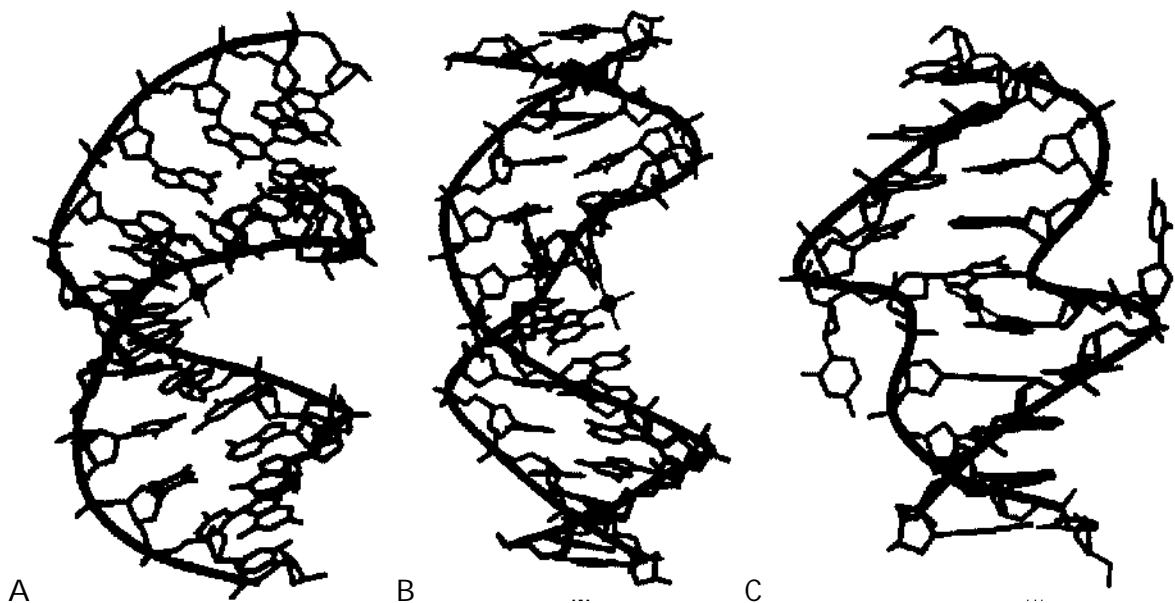


Figura 6. Representació de la deformació estructural del DNA provocada per la formació dels adductes cisplatí-DNA cis-GG (A), cis-(GNG) (B), i l'adducte cisplatí-DNA intercadena (C)

Una característica estructural que s'ha observat en aquesta unió és l'existència d'una interacció per pont d'hidrogen entre el grup amínic i l'àtom d'oxigen del grup fosfat 5'. Aquesta interacció estabilitza els adductes amb el DNA. L'adducte 1,2-intracadena d(GpG) genera un doblegament de 60° cap al solc major.<sup>50,51,52</sup>

### 3.4.2. Efectes en la replicació del DNA.

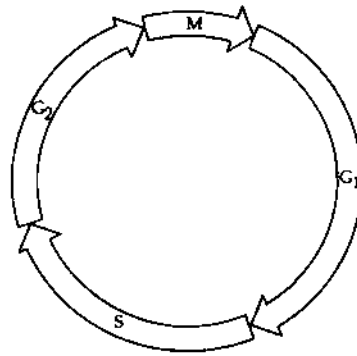
La replicació és un procés cel·lular molt important en el qual es sintetitza DNA nou. El descobriment de la inhibició de la síntesi del DNA que causava el cisplatí va suggerir que el DNA era la principal diana cel·lular de la droga, i que debia matar les cèl·lules cancerígenes bloquejant llur habilitat per sintetitzar nou DNA, necessari per la divisió.<sup>53</sup>

No obstant, quan quantitats similars de complex estan unides de forma bifuncional al DNA, no hi ha gran diferència entre el cisplatí i el transplatí. Les diferències que existeixen en la concentració de compost necessària per inhibir la replicació del DNA són degudes al diferent processament cel·lular. Per tant, tot i que la inhibició de la replicació del DNA forma part del mecanisme d'actuació del cisplatí, no pot explicar del tot les propietats antitumorals de la droga.<sup>54</sup>

### 3.4.3. Efectes en la transcripció del DNA.

Els estudis realitzats per investigar la relació entre la inhibició de la síntesi del DNA, la citotoxicitat i la progressió del cicle cel·lular, posen de manifest que el cisplatí inhibeix la transcripció del DNA.<sup>54</sup> En la transcripció es genera mRNA a partir del DNA i és un procés crític en la síntesi de proteïnes. El transplatí també afecta la transcripció, però ho fa de forma diferent al seu anàleg. S'ha observat, per exemple, que els adductes intracadena 1,3-GNG del cisplatí inhibeixen la transcripció, mentre que els adductes formats per l'isòmer trans són by-passats per la polimerassa.

Les cèl·lules tractades amb cisplatí progressen a través de la fase S, on es produeix la síntesi del DNA, i s'aturen en la fase G<sub>2</sub> (Figura 7). L'aturada en la fase G<sub>2</sub> és temporal per aquelles cèl·lules tractades amb concentracions baixes de cisplatí, però les cèl·lules tractades amb dosis més altes es mantenen parades en la fase G<sub>2</sub> fins que es produeix la mort cel·lular.<sup>55,56</sup> La inhibició de la síntesi del DNA depèn només de la concentració de cisplatí i no està relacionada amb la sensibilitat de la cèl·lula pel cisplatí, demostrant-se que la inhibició de la replicació no està directament relacionada amb la toxicitat del cisplatí. En canvi, la capacitat que té el cisplatí d'aturar el cicle cel·lular en la fase G<sub>2</sub> està relacionada amb la sensibilitat de la línia cel·lular.<sup>54</sup>



**Figura 7.** Representació esquemàtica de les etapes del cicle cel·lular. La fase M comprèn el procés de mitosi, en el qual el nucli es divideix, i el procés de citoquinesi, en el qual la cèl·lula es divideix en dos. En la fase S la cèl·lula replica el seu DNA nuclear. Les fases G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> són intervals entre les fases S i M.

L'habilitat de reparar el DNA consisteix en eliminar els adductes del cisplatí que bloquegen la transcripció i permetre que el cicle cel·lular continui. Aquests resultats indiquen que la citotoxicitat del cisplatí està molt més implicada en la transcripció del DNA que en la inhibició de la síntesi del DNA.<sup>57</sup> Incrementant la concentració de cisplatí s'inhibeix l'inici de la transcripció. Les proteïnes necessàries perquè es produeixi la transcripció són allunyades dels seus punts normals d'unió pel DNA lesionat.

La capacitat que té el cisplatí d'inhibir la transcripció s'ha utilitzat recentment com a mètode per provar de forma ràpida l'activitat antitumoral de diversos compostos de platí.<sup>58</sup>

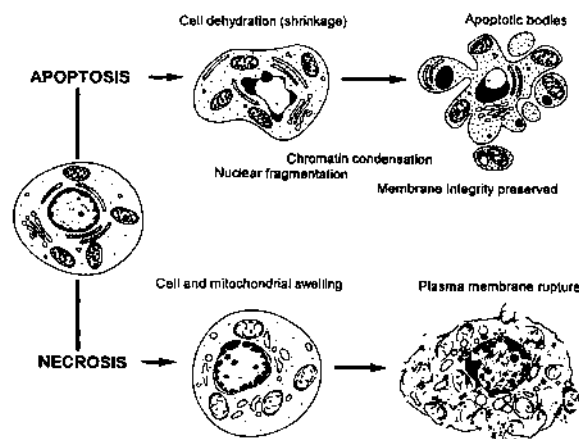
### 3.5. APOPTOSI.

Amb els estudis realitzats, no només s'ha arribat a la conclusió que el cisplatí pot bloquejar la transcripció, sinó que s'ha obtingut informació sobre el mecanisme de la mort cel·lular.<sup>54</sup> El trencament de la doble cadena del DNA és el primer signe detectable d'aquesta mort cel·lular, identificant-se com a apoptosi i no com a necrosi.<sup>59</sup>

Les cèl·lules necessiten senyals d'altres cèl·lules i del seu entorn (matriu extracel·lular) no només per proliferar, sinó també per sobreviure. Si se les nega dels factors de supervivència, les cèl·lules activen un programa de suïcidi intracel·lular i moren mitjançant un procés anomenat **mort cel·lular programada o apoptosi**.<sup>60</sup>

L'apoptosi aporta un paper molt important durant el desenvolupament embrionari i en el manteniment dels teixits en l'organisme adult. A més, és un component important d'alteracions patològiques com el càncer, determinades immunodeficiències, hepatitis fulminant, algunes formes de diabetis i certes malalties cardiovasculars i neurodegeneratives. El número de cèl·lules que existeix en un organisme multicel·lular adult és el resultat d'un equilibri entre proliferació i mort cel·lular. Un nivell de mort cel·lular per sota dels nivells normals pot ser tan perillós com un excés de proliferació.

En la mort per necrosi, causada per danys físics i/o químics a la cèl·lula, es produeix la pèrdua de la integritat de la membrana (Figura 8) i el contingut cel·lular s'expulsa a l'exterior provocant respostes inflamatòries i immunològiques.

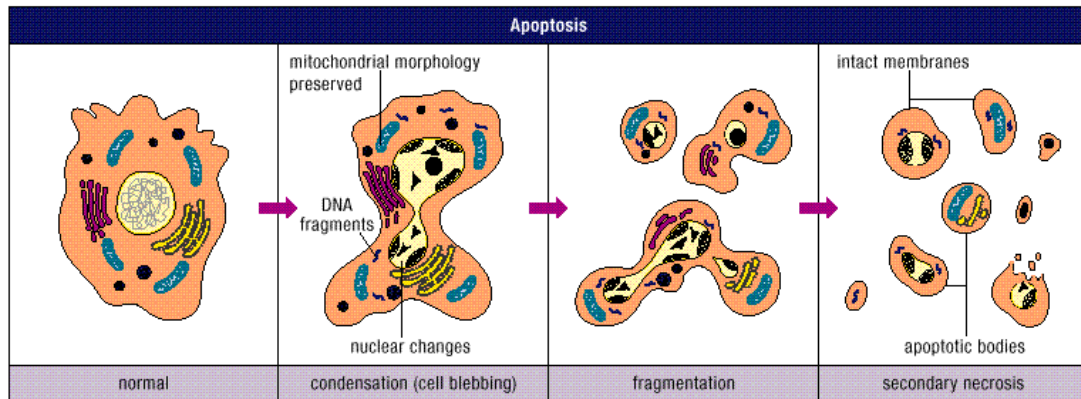


**Figura 8.** Canvis morfològics i bioquímics que es produeixen durant la necrosi i l'apoptosi.

En canvi, l'apoptosi provoca el suïcidí cel·lular com a resposta d'un estímul no letal i és una seqüència d'esdeveniments controlada per gens, enzims i cascades de senyalització. Durant aquest procés de mort cel·lular es produeixen tota una sèrie de fenòmens bioquímics i canvis morfològics en el nucli i en el citoplasma, fins a la total desintegració de la cèl·lula.<sup>61,62</sup> La mort per apoptosi és una mort neta, sense afectar a les cèl·lules veïnes. Disminueix el volum del nucli, es condensa i es fragmenta la cromatina per activació d'una endonucleasa que talla específicament el DNA, generant fragments de 180-200 parells de bases.<sup>63</sup> També s'observen canvis en la membrana cel·lular, com l'aparició de protuberàncies de diferents mides que contenen material



cel·lular i es separen de la cèl·lula en les etapes finals de l'apoptosi, formant els **cossos apoptòtics** (Figura 9).



**Figura 9.** Canvis morfològics que es produeixen durant l'apoptosi. Primer la cèl·lula normal es contrau i la cromatina es condensa formant mitges llunes creixents al voltant de la membrana cel·lular. Després es produeixen canvis en la membrana i finalment el nucli es disgrega. La cèl·lula es trenca en cossos apoptòtics.

Una característica important d'aquesta mort cel·lular és l'absència de l'alliberació dels components intracel·lulars en el medi, gràcies a un procés d'ingestió d'aquests cossos apoptòtics per cèl·lules especialitzades i per les cèl·lules veïnes. Aquest procés evita que es generin inflamacions en la regió del teixit on es produeix la mort cel·lular. La cèl·lula contraïda és fagocitada ràpidament pels macròfags. Per activar aquest mecanisme, les cèl·lules apoptòtiques canvien les molècules de la superfície per tal que els macròfags les puguin reconèixer.

En oncologia l'interès per l'apoptosi prové de l'observació que les interaccions de drogues antitumorals amb llurs respectives dianes intracel·lulars sovint donen lloc a aquest tipus de mort cel·lular, i que l'eficàcia de diverses drogues antitumorals està relacionada amb llur habilitat d'induir apoptosi.<sup>64,65,66</sup>

Durant els últims anys s'ha produït un gran progrés en el coneixement de l'apoptosi com a resultat de la identificació molecular dels components clau que controlen aquest programa de mort cel·lular.<sup>67</sup> L'activació bioquímica d'aquests

components és responsable dels canvis morfològics i el procés es regula a través de senyals provinents d'altres cèl·lules.<sup>68,69</sup>

### **3.6. RESPOSTA CEL·LULAR DAVANT ELS ADDUCTES CISPLATÍ-DNA.**

#### **3.6.1. Reparació dels adductes cisplatí-DNA.**

Les cèl·lules que no poden reparar el DNA són molt més sensibles a la droga que no aquelles que tenen sistemes de reparació. Aquest efecte no s'observa en el transplatí perquè el dany que genera pot ser reparat.<sup>70,71,72</sup>

La capacitat de les cèl·lules de modular la toxicitat del cisplatí a través de mecanismes de reparació indica que aquesta funció pot ser important en el processament del DNA lesionat pel cisplatí.<sup>73</sup>

Les cèl·lules reparen els adductes cisplatí-DNA primerament a través d'un procés d'escissió del nucleòtid (NER). Aquest mecanisme de reparació està ben caracteritzat.<sup>74</sup> El primer pas és el reconeixement de la lesió realitzada en el DNA, de manera que unes proteïnes s'uneixen a aquest DNA i una vegada el fragment de DNA afectat ha estat tallat, les proteïnes es dissocien i el forat creat és tancat per polimerasses i lligasses.<sup>75,76,77</sup>

El DNA modificat pel transplatí produeix un mecanisme de tall no específic.

Existeixen altres mecanismes cel·lulars, a més de l'escissió del nucleòtid que poden afectar la citotoxicitat dels adductes del cisplatí.<sup>78</sup>

#### **3.6.2. Resistència al cisplatí.**

La resistència al cisplatí pot ser intrínseca a les cèl·lules o bé adquirida per l'exposició al compost. Alguns teixits són resistents al cisplatí i no responen al tractament, i altres tipus de tumors, com el d'ovari, inicialment responen al tractament, però amb el temps poden adquirir resistència al cisplatí.<sup>74,79,80,81</sup>

S'han identificat tres tipus principals d'activitats com a moduladores de la resistència:

- a. Canvis en l'acumulació intracel·lular de la droga.
- b. Augment de la formació intracel·lular de tiols que modulen la toxicitat.

- c. Augment de la capacitat de les cèl·lules a reparar els adductes cisplatí-DNA.

La resistència de les cèl·lules al cisplatí és una resposta cel·lular en la que intervenen molts factors i és un procés difícil d'entendre del tot.

El glutatió és el tiol més abundant en la cèl·lula. S'han realitzat diversos estudis per determinar si un augment del nivell del glutatió en la cèl·lula provoca resistència al cisplatí, i s'ha observat que un augment del nivell d'aquest tiol és un factor relacionat amb la resistència al cisplatí, però no és un requeriment absolut.<sup>82,83,84,85</sup>

En el cas d'aquelles cèl·lules que tenen una capacitat de realitzar una reparació intensa del DNA, s'ha observat que un augment de la reparació no sempre es correspon al nivell de resistència al cisplatí.<sup>86,87,88,89</sup> En molts casos s'ha suggerit que una intensa reparació forma part del mecanisme de resistència juntament amb altres respostes cel·lulars. Tot i això, existeixen cèl·lules amb una deficient capacitat de reparar els adductes formats pel cisplatí.

Els estudis on s'ha examinat l'augment de l'acumulació cel·lular i els nivells intracel·lulars de tiols indiquen que és poc probable que només la intensa reparació del DNA sigui suficient per afectar la resistència al cisplatí.<sup>90</sup>

### **3.6.3. Les proteïnes HMG.**

La citotoxicitat del cisplatí pot ser potenciada per la unió de proteïnes nuclears als adductes cisplatí-DNA 1,2-intracadena. Les proteïnes HMG (High Mobility Group) són una família de proteïnes de reconeixement estructural específic (SSRP<sub>s</sub>) que s'uneixen específicament al DNA modificat pel cisplatí i no pel transplatí.<sup>91</sup> La unió d'aquestes proteïnes amb el DNA ha permès explicar les propietats antitumorals del cisplatí.<sup>92,93</sup> Aquestes proteïnes, al unir-se preferentment al DNA lesionat pel cisplatí, poden afectar les seves activitats biològiques, com inhibir la replicació i interferir en la transcripció. El domini HMG està format per 80 aminoàcids i és la part per on s'uneix la proteïna.<sup>94</sup> Aquesta família de proteïnes poden tenir diversos dominis HMG i reconèixer específicament estructures de DNA o seqüències. S'uneixen al solc menor del DNA i poden reconèixer l'estructura distorcionada de l'àcid nucleic.<sup>95,96</sup> La proteïna s'uneix

exclusivament al costat 3' de la cadena platinada (Figura 10). Si es pot controlar els nivells d'aquestes proteïnes en les cèl·lules tumorals, aquestes es poden sensibilitzar selectivament al cisplatí.



---

**Figura 10.** Estructura del domini de la proteïna HMG1 unida en la part del DNA on existeix un adducte cis-GG.

La HMG1 té dos dominis per unir-se al DNA, els quals reconeixen específicament les unions intracadena 1,2-d(GpG) i 1,2-d(ApG) formades pel cisplatí, però no als adductes del transplatí.

La relació existent entre el doblegament del DNA provocat per l'adducte del cisplatí i el punt d'unió de la proteïna depèn de l'estructura del domini de HMG.<sup>97,98</sup> Aquestes proteïnes generen un doblegament en el DNA un cop produït l'enllaç, i la posició d'aquest doblegament és propera al punt d'unió de la proteïna.

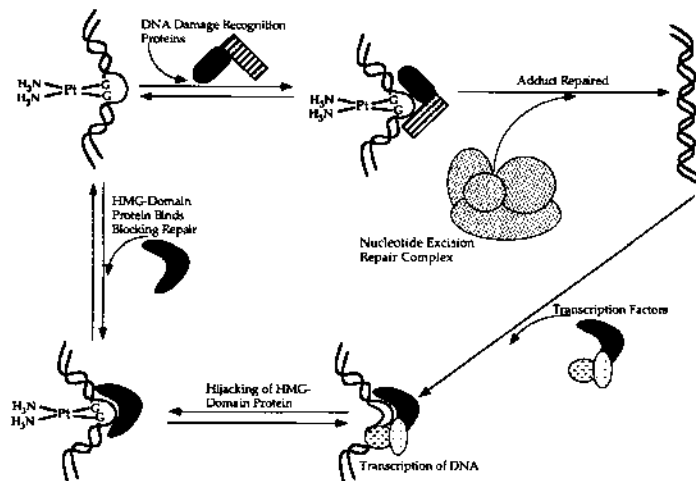


Figura 11. Diagrama esquemàtic de les hipòtesis proposades de com les proteïnes amb el domini HMG afavoreixen la citotoxicitat del cisplatí i el protegeixen de la reparació.

La unió de les proteïnes HMG pot protegir el DNA de la reparació, i s'ha comprovat que la progressió de la polimerassa del DNA al llarg de la cadena està bloquejada en els punt Pt-(GpG). Una conseqüència important d'aquest fenomen és que es retarda o s'inhibeix la unió de les proteïnes reparadores del DNA i això pot provocar la mort cel·lular (Figura 11).<sup>99</sup>

#### 4. DISSENY DE NOVES DROGUES ANTITUMORALS DE PLATÍ.

La majoria dels compostos de platí que inicialment es van avaluar per l'activitat antitumoral s'adherien a les relacions estructura-activitat de *Cleare* i *Hoeschele*.<sup>18,19</sup> Aquestes relacions han estat dominant el disseny de les drogues de platí durant 20 anys, però actualment ja no es mantenen vigents degut al gran nombre d'excepcions existents.

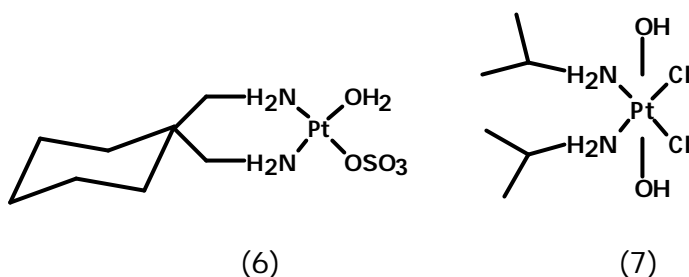
Els esforços s'han dirigit cap el disseny racional de compostos amb unes característiques específiques i que interaccionin amb el DNA de forma diferent al cisplatí, de manera que els hi permeti ser subministrats oralment i evitar els mecanismes de resistència.

Sense oblidar els primers anàlegs del cisplatí, en aquest apartat es presenta un recull dels diferents tipus de productes antitumorals de platí més recents, molts dels

quals no segueixen les relacions estructura-activitat clàssiques i no obstant es mostren actius.

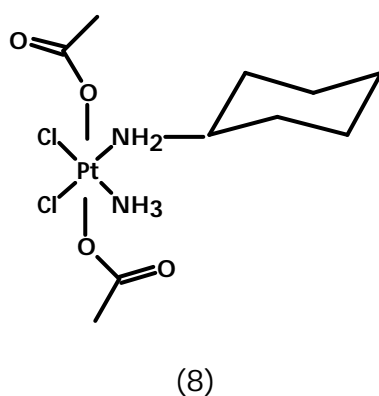
#### 4.1. PRIMERS DERIVATS DEL CISPLATÍ.

Com a primers anàlegs del cisplatí van aparèixer el **carboplatí (3)**, l'**espiroplatí (6)** i l'**iproplatí (7)**.



De tots ells, el que presenta millores notables respecte el cisplatí és el carboplatí. Aquest compost és menys tòxic i resulta efectiu en pacients que no responen al cisplatí. Aquestes propietats provenen del lligand dicarboxilat, el qual és cinèticament més inert a la substitució. Els adductes que forma el carboplatí amb el DNA són idèntics als del cisplatí.<sup>100</sup>

El complex **JM216 (8)** és oralment actiu i presenta una baixa toxicitat renal, no presenta resistència creuada amb el cisplatí i carboplatí en els tractaments conjunts i és més soluble, de manera que es pot subministrar via oral. En aquest cas, el mecanisme intracel·lular que actua és la reducció del Pt(IV) a Pt(II) i la hidròlisi final dels lligands carboxilat.<sup>101</sup>



Els complexos que contenen el lligand 1,2-diaminaciclohexà també han mostrat proves preclíniques esperançadores, però els corresponents complexos de Pt(IV) van ser abandonats degut a la greu neurotoxicitat. L'**oxaliplatí** (4) ha mostrat bons resultats contra el càncer de colon, tot i presentar també neurotoxicitat.<sup>102</sup>

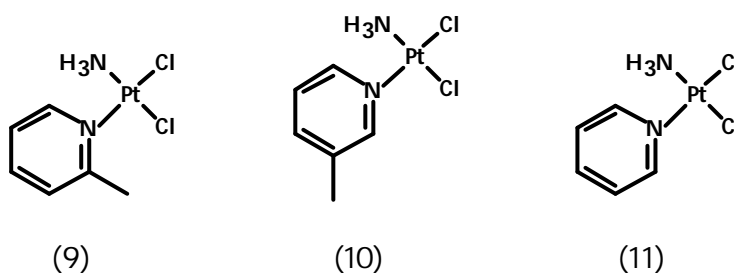
S'han provat compostos de platí amb agents citostàtics, dels quals els que resulten més efectius són aquells que estan acoblats a una molècula funcional portadora. El portador hauria de millorar la selectivitat pel teixit tumoral, evitant la lesió de les cèl·lules sanes.<sup>103</sup>

A més de l'obtenció d'efectes secundaris reduïts, els esforços s'han centrat en millorar la solubilitat, retardar l'excreció, disminuir la resistència terapèutica i aconseguir un transport més selectiu a través de les membranes cel·lulars.

#### 4.2. COMPLEXOS DE PLATÍ IMPEDITS ESTÈRICAMENT.

Fins ara hi ha hagut poc èxit en el desenvolupament de drogues de platí que puguin superar la resistència innata o adquirida per les drogues de platí, i ampliar la quimioteràpia a un nombre més gran de tumors.

El complex **cis-aminodiclor-(2-metilpiridina)platí (II)**, **ZD0473** (9), i els seus derivats han estat dissenyats per evitar la resistència.<sup>104</sup>



La seva estructura cristal·lina i la del seu anàleg **cis-aminodiclor-(3-metilpiridina)platí (II)** (10) estan descrites,<sup>105</sup> i recentment s'ha determinat l'estructura del seu anàleg cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(2-(2-hidroxietil)piridina)].<sup>106</sup>

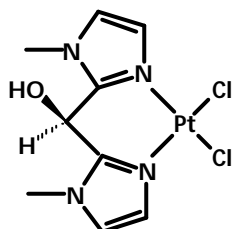
És ben conegut que l'impediment estèric axial disminueix la velocitat de la reacció de substitució en els complexos planoquadrats. La reactivitat del complex

ZD0473 cap a la tiourea, piridina, metionina i GMP és menor que la del cisplatí i el **cis-aminodiclor(piridina)platí (II)** (11).<sup>107</sup>

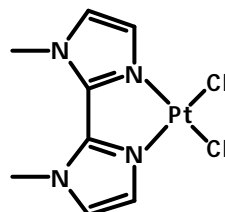
La reacció d'interacció d'aquest compost amb el DNA també és més lenta que la del cisplatí, indicant que pot ser degut a qüestions de la reparació del DNA.<sup>108</sup> El complex mostra una disminució del creixement cel·lular més gran que el cisplatí, carboplatí i JM216, i és oralment actiu. També és important remarcar que té la capacitat de superar la resistència adquirida al cisplatí d'algunes línies cel·lulars.<sup>109</sup>

Uns altres complexos que s'han sintetitzat són el **cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(quinolina)]** i **cis-[PtCl<sub>2</sub>(R'R''SO)(quinolina)]**. No se sap si els efectes estèrics juguen algun paper important en l'activitat d'aquests complexos, però aquest efecte estèric influeix de forma remarcable en l'activitat dels corresponents isòmers trans, els quals són més citotòxics que els isòmers cis.<sup>110,111</sup>

Un altre tipus de complex és el **cis-[Pt(bmic)Cl<sub>2</sub>]** (12) que conté un lligand de tipus biimidazola i presenta una important citotoxicitat en la línia de leucèmia L1210, mentre que el **cis-[Pt(bmi)Cl<sub>2</sub>]** (13), en el qual el centre metàl·lic està menys impedit, és inactiu.



(12)

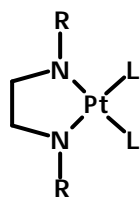


(13)

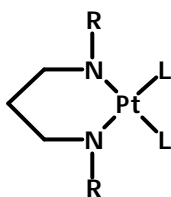
L'impediment estèric més gran del [Pt(bmic)Cl<sub>2</sub>] fa que sigui menys reactiu que [Pt(bmi)Cl<sub>2</sub>].

L'activitat antitumoral dels complexos **cis-bis(piridina)platí(II)** amb lligands de tipus organoamida s'atribueix al gran efecte estèric del lligand organoamida.<sup>112,113</sup>





(14)



(15)

R= p- $\text{HC}_6\text{F}_4$ ,  $\text{C}_6\text{F}_5$ , p- $\text{ClC}_6\text{F}_4$ ,  
 p- $\text{BrC}_6\text{F}_4$ , p- $\text{IC}_6\text{F}_4$ ,  
 2,3,5- $\text{F}_3\text{C}_6\text{H}_2$ , p- $\text{MeC}_6\text{F}_4$ ,  
 p- $\text{C}_6\text{F}_5\text{C}_6\text{F}_4$

L= piridina, 4-metilpiridina,  
 2-metilpiridina, 2,4-dimetilpiridina,  
 2,5-dimetilpiridina.

La substitució del lligand organoamida per un clorur redueix la citotoxicitat del compost, però utilitzant lligands organoamida diferents no s'observa grans diferències en l'activitat. En general, aquests compostos tenen una activitat similar a la del cisplatí.

Aquests compostos, igual que el cis-[Pt(bmic)Cl<sub>2</sub>] violen les relacions estructura-activitat clàssiques, ja que no tenen un grup NH, i en canvi mostren activitat citotòxica.

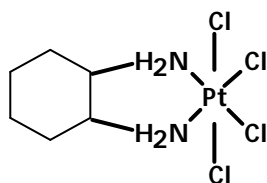
#### 4.3. COMPLEXOS DE Pt(IV).

Tot i que pocs complexos de Pt(IV) han estat estudiats com a agents antitumorals, alguns han mostrat certes característiques per entrar en proves clíniques.<sup>4,5</sup>

En els últims anys, el desig de desenvolupar una droga de platí oralment activa per poder millorar la qualitat de vida dels pacients, ha fet que es reiniciï l'interès pels compostos de Pt(IV).

L'**iproplatí** (7) es va escollir per la seva elevada solubilitat i va entrar en la fase clínica II i III, però va ser refusat per ser menys actiu que el cisplatí.<sup>114,115</sup>

El **tetraplatí** (ormaplatí, [PtCl<sub>4</sub>(D,L-1,2-diaminaciclohexà)] (16) va ser abandonat de les fases clíniques per l'elevada neurotoxicitat.<sup>102</sup>



(16)

El complex **JM216** (satraplatí, cis,trans-[PtCl<sub>2</sub>(OAc)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)]) (8) estava recentment en fase clínica III, però es va abandonar per la variabilitat de la dosificació.<sup>116</sup>

Un avantatge que presenten els complexos aminodiclorodicarboxilatoplatí(IV) és que poden ser químicament modificats per tres posicions, els dos carboxilats axials i la amina equatorial.<sup>117</sup> Aquests complexos presenten una elevada activitat in vitro, però llur reducció in vivo altera les propietats farmacològiques, i per tant l'efectivitat de la droga. En els complexos de Pt(IV) octaèdrics, l'estabilitat cinètica dels enllaços dels lligands axials influeix fortament en les reaccions i reduccions dels complexos.<sup>118,119</sup>

No obstant, els complexos de Pt(IV) tenen un gran potencial com a agents antitumorals degut a l'elevada activitat i baixa toxicitat.<sup>120</sup> Però aquest potencial no s'ha apreciat en les drogues investigades fins ara, probablement perquè són reduïts en el corrent sanguini. L'avantatge que presenten els complexos de Pt(IV) que es mantenen en el flux sanguini amb l'estat d'oxidació alt és que la baixa reactivitat produeix una disminució de la pèrdua de la droga activa i de les reaccions secundàries que donen lloc als efectes tòxics.

A més, l'elevada lipofilitat d'alguns complexos de Pt(IV) dona lloc a grans millores pel que fa a l'entrada en la cèl·lula.<sup>121</sup>

#### 4.4. COMPLEXOS DE PLATÍ AMB GEOMETRIA TRANS.

Tot i que les relacions estructura-activitat clàssiques consideren que els complexos de platí de geometria trans són inactius, alguns grups d'investigadors han mostrat que existeixen alguns complexos trans-Pt que són actius in vitro i in vivo.<sup>122,123,124,125</sup> En molts casos l'isòmer trans és més actiu que el corresponent isòmer cis.

Una diferència entre el cisplatí i el seu anàleg trans és que el transplatí és cinèticament més reactiu que el cisplatí i és més susceptible a la desactivació.<sup>126</sup>

El disseny de complexos trans-Pt utilitzant lligands estèricament impeditos redueix la reactivitat. També s'espera que aquests complexos puguin resoldre el

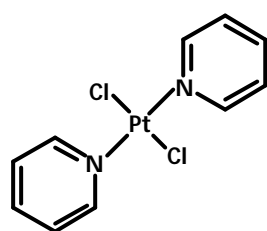
problema de la resistència en certs tumors, ja que l'isòmer trans forma adductes amb el DNA diferents que els del cisplatí.<sup>127,128,129</sup>

Farrell i col·laboradors han estudiat i comparat la citotoxicitat de tres sèries de complexos amb la fórmula general  $[\text{PtCl}_2(\text{L})(\text{L}')]$ :<sup>110,111,122</sup>

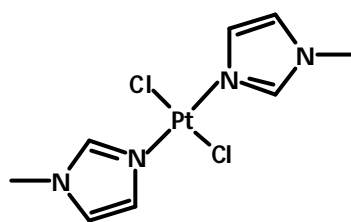
(i)  $\text{L}=\text{L}'$ ,  $\text{L}$ = piridina, N-metilimidazol, tiazola. (17), (18), (19)

(ii)  $\text{L}=\text{quinolina}$ ,  $\text{L}'=\text{RR}'\text{SO}$   $\text{R}=\text{metil}$ ,  $\text{R}'=\text{metil}$ , fenil, benzil. (20)

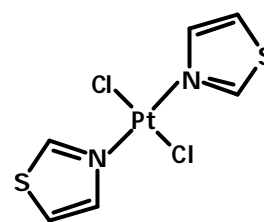
(iii)  $\text{L}=\text{quinolina}$ ,  $\text{L}'=\text{NH}_3$  (21)



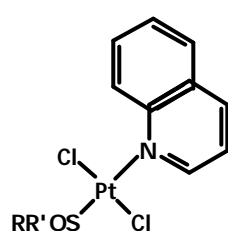
(17)



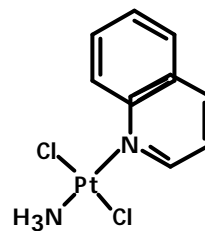
(18)



(19)



(20)

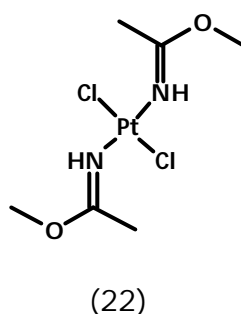


(21)

In vitro, aquests complexos de trans-Pt mostren una activitat comparable a la del cisplatí i més gran que la del transplatí. En les línies sensibles al cisplatí i en la línia resistent L1210, els isòmers trans presenten una activitat més gran que els anàlegs cis.<sup>110,111</sup>

El complex de Pt(IV) **trans, trans, trans-amino(ciclohexilamina)dicloro-dihidroxoplatí(IV) (JM335)** té una activitat més gran que el transplatí i el seu anàleg cis en línies de càncer d'ovari. També mostra activitat in vivo.<sup>130</sup>

Natile i col·laboradors van presentar una sèrie de compostos trans amb lligands iminoéter (22) que són actius.<sup>131</sup>



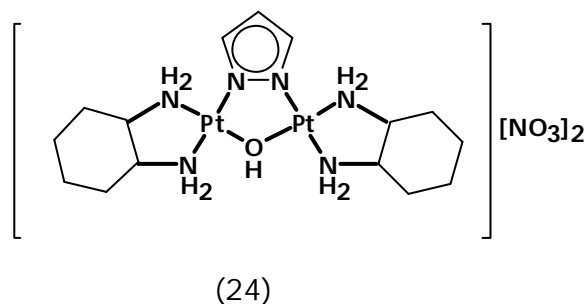
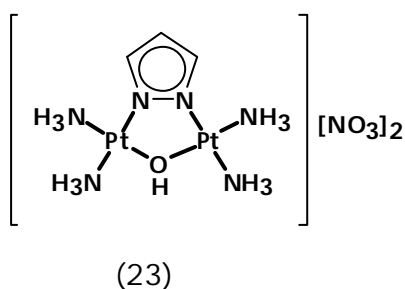
Els isòmers cis i trans reaccionen més lentament amb el DNA que el cisplatí i transplatí. Això s'atribueix al gran impediment estèric dels lligands iminoéter.

#### 4.5. COMPLEXOS DE PLATÍ MULTINUCLEARS.

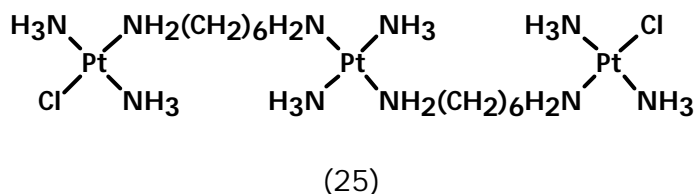
*Farrell* i col·laboradors han estat els més actius en aquesta àrea i han investigat complexos de Pt dinuclears, particularment els que presenten la fórmula general  $[\{\text{PtCl}_m(\text{NH}_3)_{3-m}\}_m\text{-H}_2\text{N-R-NH}_2\text{-}\{\text{PtCl}_n(\text{NH}_3)_{3-n}\}]^{[(2-m)+(2-n)]+}$  ( $m$  o  $n= 0-3$ , R= linker alifàtic substituït o lineal).<sup>132,133,134</sup>

En els complexos de tipus  $[\{\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)\}_m\text{-H}_2\text{N-R-NH}_2\text{-}\{\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)\}]$ , s'ha observat una relació entre la longitud de la cadena i l'activitat. En els complexos dicatiónics  $[\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_m\text{-H}_2\text{N-R-NH}_2\text{-}\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}]^{2+}$  la posició cis o trans del grup Cl té un efecte sobre l'activitat. La unió dels complexos dinuclears de platí amb el DNA és més ràpida que la del cisplatí.<sup>135,136</sup>

Recentment, s'han presentat altres complexos dinuclears de platí amb tiourea bifuncional, spermina, spermidina, i tetraamines modificades o pirazoles (23 i 24) com a molècules pont o *linkers*.<sup>137,138</sup>



També han aparegut complexos trinuclears i tetranuclears.<sup>139,140,141,142</sup> El complex més important és el **BBR3464** (25).



Aquest compost ha mostrat una pèrdua completa de la resistència creuada en cèl·lules resistents al cisplatí.<sup>143,144</sup> És també més potent que el cisplatí in vitro. Aquest augment de la potència s'atribueix a l'augment de l'entrada de platí en la cèl·lula i a l'augment dels enllaços amb el DNA.<sup>145</sup>

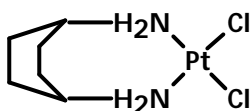
#### 4.6. COMPLEXOS DE PLATÍ AMB DIAMINOCICLOHEXÀ (DACH).

Uns dels nous complexos de platí que presenten activitat en cèl·lules tumorals resistents són els que presenten el lligand 1,2-diaminociclohexà (DACH).<sup>146</sup>

S'han avaluat molts complexos amb DACH, i un total de 12 compostos han arribat a assaigs clínics.<sup>147,148</sup> També s'han presentat compostos de platí preparats a partir d'un altre isòmer del DACH, el cis-1,4-diaminociclohexà.<sup>149</sup> Malgrat tot, els complexos Pt-DACH no són efectius en tots els tumors resistents al cisplatí.<sup>150,151,152</sup>

Actualment, la preparació de nous complexos Pt-DACH inclou la síntesi de complexos de Pt(IV) amb diversos lligands carboxilat en posició equatorial i axial.<sup>153,154,155</sup> També els estudis s'estan dirigint cap a anàlegs de l'oxaliplatí de Pt(IV) amb lligands carboxilat en posició axial, i s'ha preparat complexos de Pt(II)-DACH amb lligands difosfina i tiourea.<sup>156,157</sup>

El complex de l'isòmer 1,4-DACH, **Pt(cis-1,4-DACH)Cl<sub>2</sub>** (26), presenta una significativa activitat in vitro en línies cel·lulars resistents al **Pt(1,2-DACH)Cl<sub>2</sub>**.

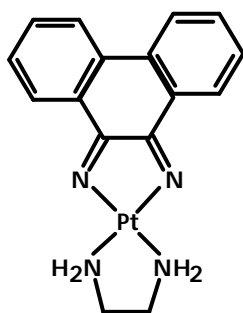


(26)

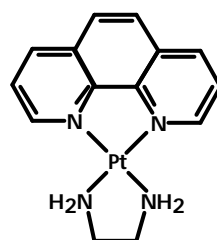
Això pot ser degut a que l'estructura dels complexos cis-1,4-DACH és bastant diferent a la dels isòmers 1,2-DACH.<sup>158</sup> No obstant, aquest compost només presenta una lleugera millor activitat in vitro que el cisplatí en unes poques línies cel·lulars resistents.<sup>159</sup>

#### 4.7. COMPLEXOS DE PLATÍ AMB LLIGANDS PORTADORS BIOLÒGICAMENT ACTIUS.

El disseny de noves drogues de platí s'ha orientat cap a la coordinació amb el metall de lligands portadors adequats amb la finalitat de dirigir el platí cap el DNA.<sup>160</sup> Alguns d'aquests compostos es basen amb lligands intercal·ladors amb l'esperança que els complexos es localitzin a prop del DNA. Alguns d'aquests complexos es basen en derivats del tipus  $[\text{Pt}(\text{L}(\text{diamina}))]^{2+}$ , essent L= bpy, phi (27), phen (28),  $\text{Me}_2\text{phen}$ , i diamina= en, dap, i del tipus  $\text{Pt}(2,2':6',2''\text{-terpiridina})$  com  $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{X}]$  essent X=  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , 4-picolina.

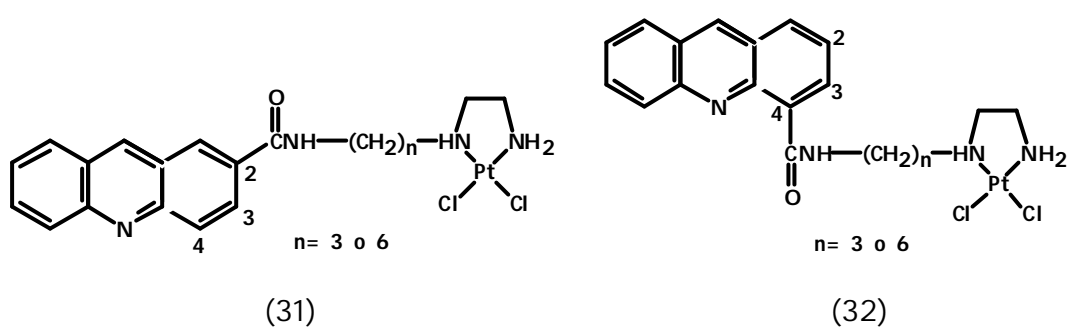
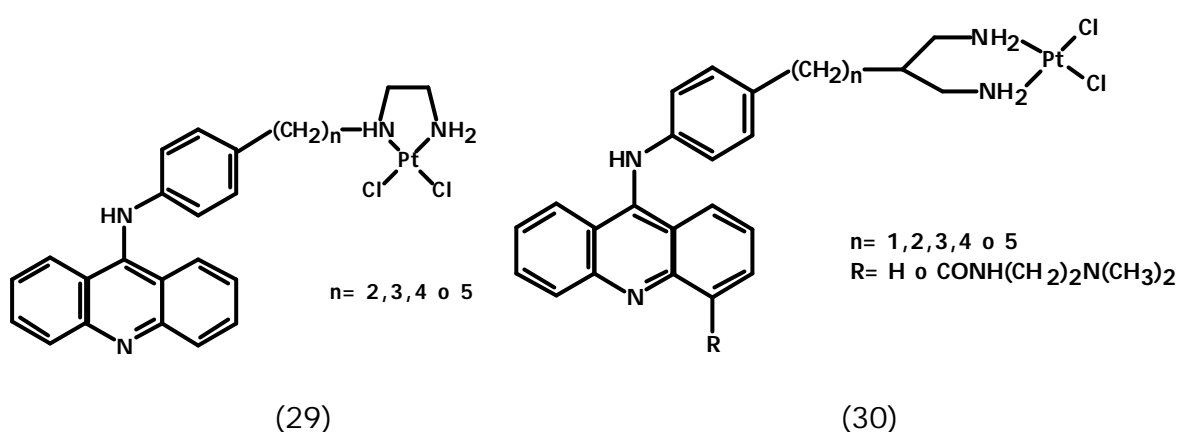


(27)



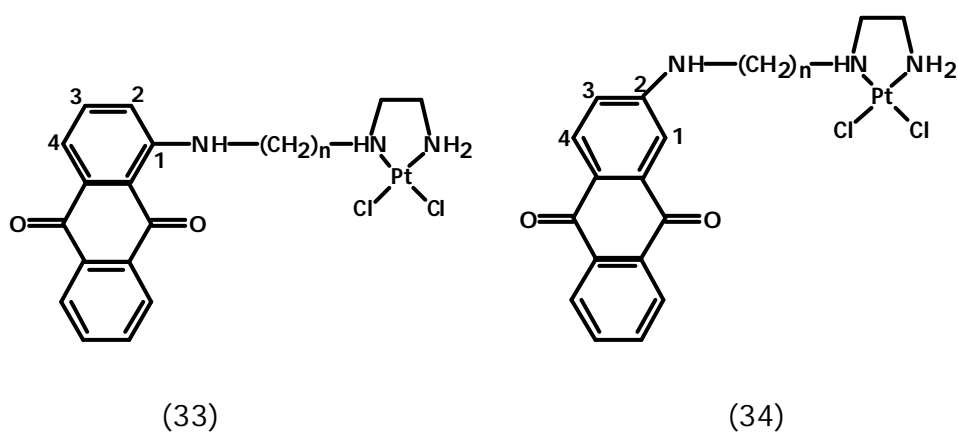
(28)

Denny i col·laboradors van preparar una sèrie de compostos unint el cis-diclor-(1,2-diaminoetà)platí(II) i cis-diclor-(1,3-diaminopropà)platí(II) a l'anilinoacridina (29), (30), i a l'acridinacarboxiamida (31), (32).<sup>161,162,163,164</sup>



En línies cel·lulars resistents al cisplatí, aquests complexos mostren una millor activitat que els complexos de platí similars.

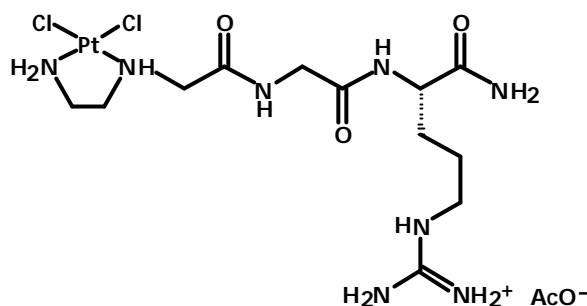
S'ha observat que quan la posició d'enllaç del lligand bioactiu és la 4 (32) el complex presenta una activitat més gran que aquells on el lligand s'uneix per la posició 2 (31). Aquesta relació també s'ha observat en una sèrie de complexos amb antraquinona sintetitzats per *Gibson* i col·laboradors, en els quals si la posició d'enllaç del lligand és la 1 (33) el complex és més actiu que l'anàleg on la unió és en la posició 2 (34).<sup>165</sup>



Altres grups portadors bioactius són, per exemple, la doxorubicina i els anàlegs d'estrogens.<sup>166,167</sup>

*Lippard* i col·laboradors han presentat complexos de platí amb la 9-aminoacridina i la cloroquina, bromur d'etidi, entre altres.<sup>168,169</sup>

S'han sintetitzat també drogues amb aminoàcids, sucres i pèptids (35).<sup>170,171</sup>



(35)

Els complexos de platí amb grups portadors bioactius han presentat resultats interessants, i es pot modificar l'activitat biològica d'aquests compostos variant l'estructura del grup portador. Malgrat tot, fins ara no hi ha hagut avanços clínics significatius en aquest camp.

#### 4.8. COMPLEXOS SOLUBLES EN AIGUA.

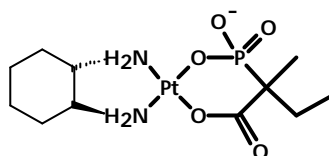
Un dels objectius més importants és l'augment de la solubilitat en aigua dels compostos antitumorals de platí.

La solubilitat del cisplatí és de 1 mg/mL. Els compostos que es subministren oralment poden ser menys solubles, però han de ser prou solubles com per ser absorbits. Desafortunadament, molts dels complexos diclorur de platí(II) són bastant més insolubles que el cisplatí.

El mètode més comú per augmentar la solubilitat d'aquests compostos és substituir els lligands clorur per carboxilats quelatants, oxalat i glicolat.<sup>172</sup> També s'incrementa la solubilitat oxidant el complexos de Pt(II) als hidroxocomplexos de Pt(IV).



S'han sintetitzat una sèrie de complexos aniónics amb lligands de tipus fosfocarboxilat (36), que presenten una elevada solubilitat i estabilitat.<sup>173</sup>



(36)

Aquests compostos presenten una activitat important en determinades línies cel·lulars com la S180a, L1210, M5076.

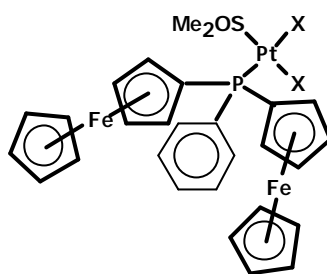
Una altra tècnica per solubilitzar és preparar una solució coloidal estable (hidrosol) d'un compost de platí insoluble. Per exemple, el complex insoluble **cis-diclor-[(+1)-1,2-bis-(4-fluorofenil)etilendiamina]platí(II)** és solubilitzat com un hidrosol i és actiu en determinades línies cel·lulars.<sup>174</sup>

Un compost de platí soluble en aigua que conté un lligand diamino es pot preparar com a forma zwitteriònica quelatant oberta en condicions àcides. A pH fisiològic la diamina quelatant es tanca, formant-se un compost de platí que és actiu in vivo.<sup>175</sup>

#### 4.9. COMPLEXOS HETEROBIMETÀL·LICS DE Pt(II).

Entre la gran diversitat de nous compostos de platí, s'han sintetitzat i estudiat complexos que contenen de forma addicional al platí un altre àtom metàl·lic, com per exemple el ferro.

Complexos de fórmula general **cis-{Pt[(Ferr)<sub>2</sub>PhP](DMSO)X<sub>2</sub>}** (37) essent X<sub>2</sub>= Cl<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, O<sub>2</sub>(CO)<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>(CO)<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, Ferr= ferrocenil, Ph= fenil, han estat experimentats in vitro, exhibint activitat citotòxica davant determinats tipus de cèl·lules.<sup>176</sup>



(37)

De forma semblant, s'han estudiat complexos amb lligands ferrocenilamina del tipus  $\text{cis-PtCl}_2\text{L}_2$ ,  $\text{trans-PtL(DMSO)}_2$ ,  $[\sigma\text{-PtXL(DMSO)}]$ ,  $\{\sigma\text{-L[PtX(DMSO)}]\}_2$ ,  $[\sigma\text{-PtCILP(OPh)}_3]$ , essent L= ferrocenilamina.<sup>177</sup>

## 5. COMPOSTOS QUIMIOTERAPÈUTICS DE METALLS DIFERENTS DEL PLATÍ.

Tot i el gran èxit del cisplatí i altres complexos de platí com a agents antitumorals, l'avanç en aquest camp d'altres metalls de transició és lent.

Alguns treballs recents han suggerit certs avantatges en el fet d'utilitzar ions d'altres metalls de transició, els quals impliquen:<sup>178,179,180</sup>

- Més punts de coordinació.
- Canvis en l'estat d'oxidació.
- Alteracions en l'afinitat dels lligands i en la cinètica de la substitució.
- Aproximacions fotodinàmiques de la teràpia.

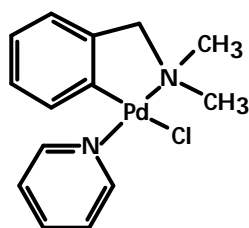
Alguns dels complexos no basats en platí actuen d'una forma similar al cisplatí. Els metalls pesants generalment són tòxics perquè s'enllacen als àtoms de S o N de les proteïnes, i això pot interferir en el metabolisme. Diversos metalls també mostren activitat a través de les propietats redox, i el gal·li sembla que actua desplaçant els ions metàl·lics en el metabolisme del ferro o en l'os.<sup>181</sup>

### 5.1. COMPOSTOS ANTITUMORALS DE PAL·LADI .

En general, els complexos de pal·ladi (II) són molt més làbils que els anàlegs de platí (II) i els adductes DNA-Pd són menys estables. Per exemple, **[Pd(en)Cl<sub>2</sub>]** (en= 1,2-diaminoetà) pateix una solvòlisi espontània en solució aquosa per produir complexos mono i diaqua.<sup>182</sup>

Una característica comuna a tots aquests complexos és que només aquells que presenten lligands amina bidentats són actius, ja que els complexos amb lligands monodentats isomeritzen ràpidament a la geometria trans inactiva.<sup>183</sup>

Alguns complexos de pal·ladi del tipus **Pd(N-C)LX (38)**, (essent N-C una amina aromàtica o alifàtica coordinada com un lligand quelatant a través del nitrogen i un enllaç Pd-C ciclometàl·lic, L= amina, X= clorur o acetat), són citotòxics en set línies tumorals.<sup>184</sup>



(38)

El **bis-(3-hexametileniminil-2-acetilpiridina-tiosemicarbonat)pal·ladi(II)**, entre els diversos complexos de Pd(II) amb derivats 4-N substituïts de la 2-acetilpiridina tiosemicarbona, és actiu en algunes línies cel·lulars. També el complex **trans-[Pd(2-dqmp)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]**, essent 2-dqmp= dietil-2-quinolilmetilfosfanat, presenta activitat.<sup>185</sup>

En els complexos del tipus **[Pd(trans-dach)(SCN)<sub>2</sub>]** la baixa velocitat de la reacció de substitució del lligand SCN<sup>-</sup> comparada amb la del lligand Cl<sup>-</sup> contribueix a l'estabilització i a l'activitat del compost.<sup>186</sup>

## 5.2. COMPOSTOS ANTITUMORALS DE GAL·LI.

El **nitrat de gal·li**,  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ , es mostra moderadament efectiu contra tumors de teixit tou i ha presentat activitat clínica contra limfomes i tumor de vegina.<sup>187,188</sup> En combinació amb determinats productes resulta també actiu contra tumors d'ovari resistents al cisplatí, però els pacients mostren efectes secundaris de tipus cardíac.<sup>189</sup> El  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  és subministrat per infusió intravenosa contínua (200-300 mg/m<sup>2</sup> per dia) i així s'eviten problemes de toxicitat renal.<sup>190</sup> També s'utilitza pel càncer d'os provocat per la hipercalcèmia, incorporant-se en el teixit ossi quan creix augmentant la densitat i fortalesa de l'os.

El **clorur de gal·li**,  $\text{GaCl}_3$ , ha estat utilitzat oralment i potencia l'efecte del cisplatí.<sup>191</sup> Com que el  $\text{Ga}^{3+}$  és similar al  $\text{Fe}^{3+}$  en tamany, imita algunes característiques de la química del ferro, de manera que s'uneix a la transferrina (Tf) i pot entrar en les cèl·lules a través dels seus receptors i també per rutes on no es requereix Tf.<sup>192</sup> L'entrada del  $\text{Ga}^{3+}$  en les cèl·lules depèn molt de la densitat de receptors de Tf extracel·lulars,<sup>193</sup> i la pèrdua de ferro cel·lular dóna lloc a un augment de la sensibilitat de la cèl·lula cap al gal·li.<sup>194</sup> Com que la densitat dels receptors de Tf és més alta en les cèl·lules cancerígenes, l'entrada de traces de  $\text{Ga}^{3+}$  en els tumors és generalment més alta que en altres teixits.<sup>190</sup> El complex Ga-Tf bloqueja la síntesi del DNA.<sup>195,196</sup>

## 5.3. COMPOSTOS ANTITUMORALS DE RUTENI.

Existeix una correlació directa, in vitro, entre la citotoxicitat i la unió amb el DNA pels compostos antitumorals de ruteni contenint  $\text{NH}_3$  o amines, com el **cis-[Ru<sup>III</sup>Cl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl<sub>2</sub>** i **[trans-Ru<sup>III</sup>(Im)<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>](Him)**, (Im= imidazola).<sup>197</sup> La unió del  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5]^{2+}$  al DNA té lloc preferentment a la guanina, però també en els residus adenina i citosina.<sup>198</sup> Molts complexos de ruteni que contenen lligands  $\text{NH}_3$ , amines i lligands heterocíclics inhibeixen la replicació del DNA, presenten activitat mutagènica i redueixen la síntesi del RNA.<sup>199</sup> Recentment, complexos de Ru<sup>III</sup> i Ru<sup>IV</sup> amb EDTA han mostrat activitat antitumoral i aparentment deguda a la unió amb el DNA.<sup>200</sup> El grup ampli de complexos multiclor de Ru<sup>III</sup> que són agents antitumorals difereixen del cisplatí ja que afavoreixen la interacció intercadena en comptes de la intracadena.

Els complexos de ruteni amb lligands quelatants de tipus poliaminopolicarboxílics són un nou grup de compostos antitumorals. Aquests complexos són octaèdrics i molt solubles en aigua. Alguns exemples són **[Ru<sup>IV</sup>Cl<sub>2</sub>(cdta)]** (cdta= 1,2-ciclohexandiaminotetracetat), i **cis-[Ru<sup>III</sup>Cl<sub>2</sub>(pdta)]** (pdta= 1,2-propilendiaminatetracetat).<sup>201,202</sup>

Els complexos de Ru<sup>II</sup> i Ru<sup>III</sup> amb dimetilsulfòxid (DMSO) mostren activitat biològica i són relativament poc tòxics, però requereixen dosis altes per tenir efectes terapèutics.<sup>203</sup> El complex **cis-[RuCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>SO)<sub>4</sub>]** es manté neutre en el corrent sanguini, igual que el cisplatí, i això facilita el seu pas a través de la membrana. A l'interior de la cèl·lula, on la concentració de clorur és més baixa, el compost perd els lligands clorur i s'uneix al DNA.<sup>204</sup> Aquest tipus de complexos mostren activitats similars i tenen potencials redox que són biològicament accessibles, de manera que els dos estats d'oxidació són presents in vivo i coordinen amb biopolímers com els àcids nucleics i la Tf.<sup>205</sup>

#### 5.4. COMPOSTOS ANTITUMORALS DE RHODI.

L'acetat de rhodi, **[m-(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>Rh<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]** i altres complexos derivats han presentat una bona activitat antitumoral, però els efectes tòxics han limitat el seu ús.<sup>206</sup> Estudis recents mostren que llur activitat és anàloga a la del cisplatí, ja que s'uneix al DNA a través de guanines adjacents.<sup>207,208</sup>

En les sèries de complexos **[Rh<sub>2</sub>(RCO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]** l'activitat augmenta amb la lipofilicitat del grup R i és independent del potencial de reducció. Recentment s'ha observat que els complexos de tipus **[Rh<sub>2</sub>L<sub>2</sub>(m-CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sup>2+</sup>]**, on L= bpy o phen, també mostren activitat.<sup>209,210</sup>

Els complexos de rhodi s'uneixen a una gran varietat de proteïnes, incloent l'albumina, i inhibeixen irreversiblement proteïnes que contenen la cisteïna en la part activa.

Alguns compostos de Rh(I) planoquadrats, com **[Rh(COD)(PMI)]Cl** (COD= ciclooctadiè i PMI= 2-piridinmetilimina), presenten activitat contra certes línies tumorals, de la mateixa manera que alguns complexos organometàl·lics del tipus **[Rh(CO)<sub>2</sub>(dtc)]** (dtc=ditiocarbamat).<sup>211</sup>

Existeixen diversos complexos de Rh (III) que són anàlegs de complexos antitumorals de Ru i que presenten igualment activitat, per exemple el **mer**-[Cl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], **mer**,**cis**-[RhCl<sub>3</sub>(Me<sub>2</sub>SO)<sub>2</sub>LRh] (L= NH<sub>3</sub> i imidazola), **trans**-[RhCl<sub>4</sub>(Me<sub>2</sub>SO)(Im)] i **mer**,**cis**-[RhCl<sub>3</sub>(Me<sub>2</sub>SO)<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>SO)].<sup>212</sup>

Alguns compostos de rhodi amb metal·lointercal·ladors presenten una unió específica amb el DNA remarcable, de manera que es poden utilitzar com a agents diana pel DNA.<sup>213</sup>

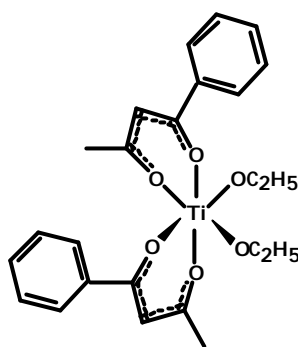
### 5.5. COMPOSTOS ANTITUMORALS DE TITANI .

L'activitat antitumoral dels complexos de tipus **MX<sub>2</sub>Cp<sub>2</sub>**, essent Cp= η<sup>5</sup>-ciclopentadiè i X= halur, depèn del metall, de manera que si M= Ti, V, Nb i Mo el compost presenta una activitat remarcable, si M= Ta i W mostren poca efectivitat i si M= Zr i Hf són inactius.<sup>214</sup>

Tot i que aquests compostos van ser provats inicialment com a possibles anàlegs del cisplatí, l'efectivitat del TiCl<sub>2</sub>Cp<sub>2</sub> contra línies cel·lulars resistents al platí va indicar que existia un mecanisme d'acció diferent que pot portar cap a noves opcions terapèutiques contra el càncer.<sup>215</sup>

L'activitat antitumoral de MCl<sub>2</sub>Cp<sub>2</sub> depèn probablement de la hidròlisi del metall, de manera que en els casos en què M= Ti, V, Zr i Mo, la hidròlisi és més ràpida que en el cas del cisplatí.<sup>216</sup> Els primers estudis indiquen que existeix una correlació entre la unió amb el DNA i l'activitat antitumoral, ja que es produeix una complexació del DNA immediata amb els compostos actius de Ti i Mo, mentre que els complexos inactius de Hf i Zr no s'uneixen significativament al DNA.<sup>217,218</sup> També s'ha observat que els complexos de Ti i V inhibeixen la síntesi del DNA molt més que la síntesi de proteïnes.

El **budotità** (39), **cis**-[Ti<sup>IV</sup>(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(bzac)<sub>2</sub>] (bzac= 1,3-dicetonat-1-fenilbutà), va ser el primer antitumoral que no era de platí que va ser provat en assaigs clínics.<sup>219,220</sup>



(39)

Els complexos dimèrics  $m\text{-O-cis-[Ti}^{\text{IV}}\text{X}_2(\text{bzac})_2]$  també són actius. Malgrat tot, se sap poca cosa sobre el mecanisme del budotità, excepte que actua diferent que el cisplatí. Els experiments *in vitro* i *in vivo* del budotità mostren que no produeix un dany significatiu al DNA, mentre que el complex diaquo s'hi uneix fortament.<sup>221</sup>

#### 5.6. COMPOSTOS ANTITUMORALS D'ESTANY.

Tota una sèrie de compostos organometàl·lics de Sn(IV) del tipus  $\text{SnX}_2\text{R}_2$  i  $\text{SnX}_2\text{R}_2\text{L}_2$  (X= halur, R= grup orgànic, L= lligand nitrogenat monodentat o  $\text{L}_2$ = lligand nitrogenat bidentat) van ser estudiats inicialment com a possibles anàlegs del cisplatí, però van mostrar poca activitat.<sup>222</sup>

Complexos del tipus  $\text{R}_2\text{Sn}(\text{AA})_2$  on R= metil, etil, n-butil, ciclohexil i fenil, AA= dipèptid o mercaptoaminoàcid, mostren una activitat moderada contra algunes línies cel·lulars. Altres complexos més inusuals com  $\text{Sn}(\text{n-Bu})_2(\text{Cy}_2\text{HN})_2(2,6\text{-piridildicarboxilat})_2$  essent Cy= ciclohexil, i complexos  $\mu$ -oxo dimèrics amb carborans com (1,2- i 1,7-dicarba-closo-dodecaborà) han mostrat bona activitat en determinades línies cel·lulars.<sup>223,224</sup>

El gran problema que presenten aquests complexos d'estany és la baixa solubilitat en medi aquós, requerint suspensions amb DMSO per augmentar la solubilitat.<sup>225</sup>

## 6. ASSAIGS PRE-CLÍNICS I CLÍNICS.

Un objectiu important en l'estudi de drogues antitumorals és predir el potencial quimioterapèutic d'un compost de forma prèvia a la seva introducció en pacients. Els efectes citotòxics dels compostos químics s'estudien en cultius cel·lulars, mesurant el percentatge de supervivència a diferents concentracions de compost.<sup>226</sup>

El següent nivell d'estudi, a vegades utilitzat directament sense l'estudi dels resultats en cultius cel·lulars, implica provar el compost en animals, inoculant una suspensió de cèl·lules i evaluant el progrés de la malaltia. S'ha descrit que la capacitat d'un determinat fàrmac de tenir un bon índex terapèutic diferenciant les cèl·lules sanes de les cèl·lules malignes podria ser degut al fet que el fàrmac indueix mort cel·lular per apoptosi a baixes concentracions en les cèl·lules tumorals. En base a aquesta hipòtesi, també s'analitzen els índexs terapèutics segons la inducció d'apoptosi.<sup>227</sup>

Si tots els experiments pre-clínics mostren resultats satisfactoris, es pot iniciar l'estudi clínic. Aquest es divideix en tres fases:

**Fase I:** Estudi toxicològic en humans on s'examina els efectes secundaris de la droga. Es tracta de pacients amb poques expectatives de vida (6-12 mesos).

**Fase II:** Estudi de l'activitat antitumoral.

**Fase III:** Determinació del valor terapèutic de la nova droga.

## 7. EL FUTUR DE LES DROGUES ANTITUMORALS.

Tot i la gran informació que s'ha obtingut fins ara, encara hi ha molts aspectes del mecanisme d'actuació del cisplatí que no són del tot coneguts. Algunes qüestions sobre la resistència a la droga, tant intrínseca com adquirida, a nivell molecular no han estat resoltes, degut al gran nombre de factors que hi intervenen. Recentment, s'han començat a fer estudis sobre altres possibles dianes cel·lulars i s'han continuat identificant proteïnes que s'uneixen al DNA lesionat, de manera que els diferents tipus d'interaccions cel·lulars s'estan estudiant amb més detall per tal d'entendre com el cisplatí mata les cèl·lules.



Continuar la recerca sobre el mecanisme del cisplatí permetrà entendre perquè aquesta droga és tan efectiva en determinats càncers. Així serà possible dissenyar de forma racional noves drogues que puguin tractar diversos tipus de tumors provocant menys efectes secundaris i superar els problemes de resistència que apareixen en les drogues de platí actuals.



## 8. REFERÈNCIES.

- 
- <sup>1</sup> A. Bray, J. Lewis, RR. Waller. *Essential cell biology. An introduction to the molecular biology of the cell.*, **1995**.
- <sup>2</sup> P. Farreras. C. Rozman. *Medicina Interna.*, Vol. I. 12 Ed. DOYMA.
- <sup>3</sup> B. Rosenberg, L. Van camp, T. Krigas. *Nature*, **1965**, 205, 698.
- <sup>4</sup> B. Rosenberg, L. Van Camp, E.B. Grimby, A.J. Thomson. *J. Biol. Chem*, **1967**, 242, 1347.
- <sup>5</sup> B. Rosenberg. *Plat. Mat. Rev.*, **1971**, 15, 42.
- <sup>6</sup> B. Rosenberg, E. Renshaw, L. Van Camp, J. Hartwick, J. Diobnik. *J. Bacteriol.*, **1967**, 93, 716.
- <sup>7</sup> B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Trosko, H.V. Mansour. *Nature*, **1969**, 222, 385.
- <sup>8</sup> B. Rosenberg, L. Van Camp. *Cancer Res.*, **1970**, 30, 1799.
- <sup>9</sup> R.J. Kociba, S.D. Sleight, B. Rosenberg. *Cancer Chemother. Rep.*, **1970**, 54, 325.
- <sup>10</sup> D.J. Higby, H.J. Wallace, D.J. Albert, J.F. Holland. *Cancer*, **1974**, 33, 1219.
- <sup>11</sup> R.B. Weiss, M.C. Christian. *Drugs*, **1993**, 46, 360.
- <sup>12</sup> M. Gordon, S. Hollander. *J. Med. Chem*, **1993**, 209.
- <sup>13</sup> V. Rodilla. *Oncología*, **1993**, 16, 149-158.
- <sup>14</sup> E. Reed. *Anticancer Drugs*, section 7, 396-399.
- <sup>15</sup> J. Reedijk. *Chem. Commun.*, **1996**, 801.
- <sup>16</sup> D. Lebwohl, R. Canetta. *Eur. J. Cancer*, **1998**, 34, 1522.
- <sup>17</sup> B. Spingler, D.A. Whittington, S.J. Lippard. *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 5596-5602.
- <sup>18</sup> M.J. Cleare, J.D. Hoeschele. *Plat. Met. Rev.*, **1973**, 17, 3.
- <sup>19</sup> M.J. Cleare, J.D. Hoeschele. *Bioinorg. Chem.*, **1973**, 2, 187.
- <sup>20</sup> J. Reedijk. *Inorg. Chim. Acta*, **1992**, 873, 198-200.
- <sup>21</sup> I. Bertini, H. Bgray, S.J. Lippard, J.S. Valentino. *Bioinorg. Chem.* University Science Books.
- <sup>22</sup> D.P. Gataly, S.B. Howell. *Br. J. Cancer*, **1993**, 67, 1171-1176.
- <sup>23</sup> S.E. Miller, D.A. House. *Inorg. Chim. Acta*, **1989**, 161, 131.
- <sup>24</sup> S.E. Miller, D.A. House. *Inorg. Chim. Acta*, **1989**, 166, 189.
- <sup>25</sup> E.M. Witkin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1967**, 57, 1275-1279.

- 
- <sup>26</sup> H.I. Adler, A.A. Hardigree. *Rad. Res.* **1965**, 25, 92-102.
- <sup>27</sup> H.S. Rosenkranz, A.J. Garro, J.A. Levy, H.S. Carr. *Biochem. Biophys. Acta*, **1966**, 114, 501-515.
- <sup>28</sup> K. Wang, J. Lu, R. Li. *Coord. Chem. Rev.*, **1996**, 151, 53-88.
- <sup>29</sup> G. Speelmans, W.H.H.M. Sips, R.J.H. Grisel, R.W.H.M. Staffhorst, A.M.J. Fichtinger-Schepman, J. Reedijk, B. de Kruijff. *Biochim. Biophys. Acta*, **1996**, 1283, 60-66.
- <sup>30</sup> G. Speelmans, R.W.H.M. Staffhorst, K. Versluis, J. Reedijk, B. de Kruijff. *Biochemistry*, **1997**, 36, 10545-10550.
- <sup>31</sup> P. Köpf-Maier, S.K. Mühlhausen. *Chem. Biol. Interact.*, **1992**, 82, 295-316.
- <sup>32</sup> H. Zeng, B. Wang, Y. Zhang, K. Wang. *Thermochim. Acta*, **1995**, 265, 31-38.
- <sup>33</sup> D. Voet, J.G. Voet. *Bioquímica*, **1990**, Ed. Omega S.A., 840.
- <sup>34</sup> S.E. Sherman, S.J. Lippard. *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 1153-1181.
- <sup>35</sup> A.M.J. Fichtinger-Schepman, J.L. Van der Veer, J.H.J. den Hartog, P.H.M. Lohman, J. Reedijk. *Biochemistry*, **1985**, 24, 707-713.
- <sup>36</sup> M.D. Reily, L.G. Marzilli. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 6785.
- <sup>37</sup> C.A. Lepre, K.G. Strothkamp, S.J. Lippard. *Biochemistry*, **1987**, 26, 5651-5657.
- <sup>38</sup> A. Eastman, M.M. Jennerwein, D.L. Nagel. *Chem. Biol. Interact.*, **1988**, 67, 71-80.
- <sup>39</sup> D.P. Bancroft, C.A. Lepre, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6860-6871.
- <sup>40</sup> N.P. Johnson, J.D. Hoeschele, R.O. Rahn. *Chem. Biol. Interact.*, **1980**, 30, 151-169.
- <sup>41</sup> K.J. Barnham, S.J. Berners-Price, T.A. Frenkiel, V. Frey, P.J. Sadler. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 1874-1877.
- <sup>42</sup> A. Eastman, M.A. Barry. *Biochemistry*, **1987**, 26, 3303-3307.
- <sup>43</sup> E. Bernal-Méndez, M. Boudvillain, F. González-Vilchez, M. Leng. *Biochemistry*, **1997**, 36, 7281-7287.
- <sup>44</sup> G.L. Cohen, W.R. Bauer, J.K. Barton, S.J. Lippard. *Science*, **1979**, 203, 1014-1016.
- <sup>45</sup> J.P. Macquet, J.L. Butour. *Biochimie*, **1978**, 60, 901-914.
- <sup>46</sup> W.M. Scovell, L.R. Kroos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1982**, 104, 1597-1603.
- <sup>47</sup> a) Y. Maesa, K. Nunomura, E. Ohtsubo. *J. Mol. Biol.*, **1990**, 215, 321-329. b) K. Nunomura, Y. Maeda, E. Ohtsubo. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1991**, 37, 207-214.

- 
- <sup>48</sup> A. Kagemoto, H. Takagi, K. Naruse, Y. Baba. *Thermochim. Acta*, **1991**, 190, 191-201.
- <sup>49</sup> L.J. Naser, A.L. Pinto, S.J. Lippard, J.M. Essigmann. *Biochemistry*, **1988**, 27, 4357-4367.
- <sup>50</sup> J.H.J. den Hartog, C. Altona, G.A. Van der Marel, J. Reedijk. *Eur. J. Biochem.*, **1985**, 147, 371-379.
- <sup>51</sup> J.H.J. den Hartog, C. Altona, J.H. van Boom, G.A. van der Marel, C.A.G. Haasnoot, J. Reedijk. *J. Biomol. Struct*, **1985**, 2, 1137-1155.
- <sup>52</sup> F. Herman, J. Kozelka, V. Stouen, E. Guittet, J.P. Girault, T. Huynh-Dinh, J. Igolen, J.Y.Lallemant, J.C. Chottard. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, 194, 119-133.
- <sup>53</sup> H.C. Harder, R.G. Smith, A.F. Leroy. *Cancer Res.*, **1976**, 36, 3821-3829.
- <sup>54</sup> a) C.M. Sorenson, A. Eastman. *Cancer Res.*, **1988**, 48, 6703-6707. b) C.M. Sorenson, A. Eastman. *Cancer Res.*, **1988**, 48, 4484-4488.
- <sup>55</sup> J.A. Mello, S.J. Lippard, J.M. Essigmann. *Biochemistry*, **1995**, 34, 1483-1491.
- <sup>56</sup> J.S. Mymryk, E. Zaniewski, T.K. Archer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 2076-2080.
- <sup>57</sup> a) Y. Corda, C. Job, M.F. Anin, M. Leng, D. Job. *Biochemistry*, **1991**, 30, 222-230. b) Y. Corda, M.F. Anin, M. Leng, D. Job. *Biochemistry*, **1992**, 31, 1904-1908. c) Y. Corda, C. Job, M. F. Anin, M. Leng, D. Job. *Biochemistry*, **1993**, 32, 8582-8588.
- <sup>58</sup> K.E. Sandman, S.S. Marla, G. Zlokarnik, S.J. Lippard. *J. Chem. Biol.*, **1999**, 6, 541-551.
- <sup>59</sup> C.M. Sorenson, M.A. Barry, A. Eastman. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1990**, 82, 749-755.
- <sup>60</sup> Z. Darzynkiewicz, G. Juan, X. Li, W. Gorczyca, T. Murakami, F. Traganos. *Cytometry*, **1997**, 27, 1-20.
- <sup>61</sup> C. Dive, J.A. Hickman. *Br. J. Cancer*, **1991**, 64, 192-196.
- <sup>62</sup> J.J.R. Frausto de Silva, R.J.P. Williams. *The biological chemistry of the elements*, **1991**, Carendon Press-Oxford.
- <sup>63</sup> J. Lee. *Anticancer Research*, **1997**, 17, 3445-3450.
- <sup>64</sup> R. Bertrand, D. Kerrigan, M. Sareng, Y. Pommier. *Biochem. Pharmacol.*, **1991**, 42, 77-85.
- <sup>65</sup> S.H. Kaufmann. *Cancer Res.*, **1989**, 49, 5870-5878.

- 
- <sup>66</sup> B. Szende, A. Zalatrai, A.V. Schally. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 1643-1647.
- <sup>67</sup> Annual Review of cell and developmental biology, **1999**, vol. 15, 269-284.
- <sup>68</sup> Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota, F. Traganos. *Cytometry*, **1992**, 13, 795-808.
- <sup>69</sup> S. Kumar. *Trends Biochem. Sci*, **1995**, 198-202.
- <sup>70</sup> J. Brouwer, P. van de Putte, A.M.J. Fichtinger-Schapman, J. Reedijk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, 78, 7010-7014.
- <sup>71</sup> D.J. Beck, S. Popoff, A. Sancar, W.D. Rupp. *Nucleic Acids Res.*, **1985**, 13, 7395-7412.
- <sup>72</sup> R.J. Fram, P.S. Cusick, J.M. Wilson, M.G. Marinus. *Mol. Pharmacol.*, **1985**, 28, 51-55.
- <sup>73</sup> D.B. Zamble, S.J. Lippard. *Trends Biochem. Sci.*, **1995**, 20, 435-439.
- <sup>74</sup> G. Chu. *J. Biol. Chem*, **1994**, 269, 787-790.
- <sup>75</sup> A. Sancar. *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, 65, 43-81.
- <sup>76</sup> K. Sugasawa, C. Masutani, S. Iwai, P.J. van der Spek, A.P.M. Ekar, F. Henaoka, D. Bootsma, J.H.J. Hoeijmakers. *Molecular Cell*, **1998**, 2, 213-232.
- <sup>77</sup> M. Wakasugi, A. Sancar. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 18759-18768.
- <sup>78</sup> P. Modrich. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 24727-24730.
- <sup>79</sup> K.J. Scanlon, M. Kashani-Sabet, T. Tone, T. Funato. *Pharmac. Ther.*, **1991**, 52, 385-406.
- <sup>80</sup> H. Timmer-Bosscha, N.H. Mulder, E.G.E. de Vries. *Br. J. Cancer*, **1992**, 66, 227-238.
- <sup>81</sup> R.P. Pérez. *Eur. J. Cancer*, **1998**, 34, 1535-1542.
- <sup>82</sup> G.A.P. Hospers, N.H. Mulder, B. de Jong, L. de Ley, D.R.A. Uges, A.M.J. Fichtinger-Schepman, R.J. Schepper, E.G.E. de Vries. *Cancer Res.*, **1988**, 48, 6803-6807.
- <sup>83</sup> C.R. Wolf, I.P. Hayward, S.S. Lawrie, K. Buckton, M.A. McIntyre, D.J. Adams, A.D. Lewis, A.R.R. Scott, J.F. Smyth. *Int. J. Cancer*, **1987**, 39, 695-702.
- <sup>84</sup> A.K. Godwin, A. Meister, P.J. O'Dwyer, C.S. Huang, T.C. Hamilton, M.E. Anderson. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1992**, 89, 3070-3074.
- <sup>85</sup> a) R.J. Fram, B.A. Woda, J.M. Wilson, N. Robichaud. *Cancer. Res.*, **1990**, 50, 72-77. b) B.A.J. Jansen, J. Brouwer, J. Reedijk. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 89, 197-202.

- 
- <sup>86</sup> W. Zhen, C.J. Link Jr., P.M. O'Connor, E. Reed, R. Parker, S.B. Howell, V.A. Bohr. *Mol. Cell Biol.*, **1992**, 12, 3689-3698.
- <sup>87</sup> B.C. Behrens, T.C. Hamilton, H. Masuda, K.R. Grotzinger, J. Whang-Peng, K.G. Louie, T. Knutsen, W.M. McKoy, R.C. Young, R.F. Ozols. *Cancer Res.*, **1987**, 47, 414-418.
- <sup>88</sup> S.W. Johnson, P.A. Swiggard, L.M. Handel, J.M. Brennan, A.K. Godwin, R.F. Ozols, T.C. Hamilton. *Cancer Res.*, **1994**, 54, 5911-5916.
- <sup>89</sup> N. Sheibani, M.M. Jennerwein, A. Eastman. *Biochemistry*, **1989**, 28, 3120-3124.
- <sup>90</sup> S.L. Jones, I.D. Hickson, A.L. Harris, P.R. Harnett. *Int. J. Cancer*, **1994**, 59, 388-393.
- <sup>91</sup> E.N. Huges, B.N. Engelsberg, P.C. Billings. *J. Biol. Chem.*, **1993**, 21, 1643-1646.
- <sup>92</sup> D.B. Zamble, S.J. Lippard. *Trends Biochem. Sci.*, **1995**, 20, 435-439.
- <sup>93</sup> X. Zhai, H. Beckmann, H.M. Jantzen, J.M. Essigmann. *Biochemistry*, **1998**, 37, 16307-16315.
- <sup>94</sup> R. Grosschedl, K. Giese, J. Pagel. *Trends Genet.*, **1994**, 10, 94-100.
- <sup>95</sup> a) J.P. Whitehead, S.J. Lippard. *Metal ions in biological systems*, **1996**, A. Sigel, H. Sigel Ed., vol. 32. New York. b) S.M. Cohen, Y. Mikata, Q. He, S.J. Lippard. *Biochemistry*, **2000**, 39, 11771-11776.
- <sup>96</sup> J. Malina, J. Kasparova, G. Natile, V. Bravec. *Chemistry & Biology*, **2002**, 9, 629-638.
- <sup>97</sup> M.H. Werner, J.R. Huth, A.M. Gronenborn, G.M. Close. *Cell*, **1995**, 81, 705-714.
- <sup>98</sup> J.J. Love. *Nature*, **1995**, 376, 791-795.
- <sup>99</sup> M.J. Bloemink, J.P. Dorenbos, R.J. Heelebrij, B.K. Keppler, J. Reedijk, H. Zahn. *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 1127.
- <sup>100</sup> W.I. Sundquist, S.J. Lippard, B.D. Stollar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 8225.
- <sup>101</sup> M.J. McKeage, S.E. Morgan, F.E. Boxell, G.C. Hard. *Annals of Oncol.*, **1992**, 111.
- <sup>102</sup> M.C. Christian. *Abstracts, 7<sup>th</sup> International Symposium on platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy*, **1995**, 5128.
- <sup>103</sup> A. Pasini, F. Zunino. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1987**, 26, 615.

- 
- <sup>104</sup> a) T. Okada, I.M. Elmehasseb, M. Kodaka, T. Tomohiro, K. Okamoto, H. Okuno. *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 4661-4667. b) I.M. Elmehasseb, M. Kodaka, T. Okada, T. Tomohiro, K. Okamoto, H. Okuno. *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, 84, 157-158.
- <sup>105</sup> Y. Chen, Z. Guo, S. Parsons, P.J. Sadler. *Chem. Eur. J.*, **1998**, 4, 672.
- <sup>106</sup> A.C.G. Hotze, Y. Chen, T.W. Hambley, S. Parsons, N.A. Kratochwil, J.A. Parkinson, V.P. Munk, P.J. Sadler. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2002**, 1035-1039.
- <sup>107</sup> J.F. Holford, F.I. Raynaud, B.A. Murrer, K. Grimaldi, J. A. Hartley, M.J. Abrams, L.R. Kelland. *Anti-Cancer Drug Des.*, **1998**, 13, 1.
- <sup>108</sup> F.I. Raynaud, F.E. Boxall, P.M. Goddard, M. Valenti, M. Jones, B.A. Murrer, M.J. Abrams, L.R. Kelland. *Clin. Cancer Res.*, **1997**, 3, 2063-2074.
- <sup>109</sup> J. Holford, S.Y. Sherp, B.A. Murrer, M.J. Abrams, L.R. Kelland. *Br. J. Cancer*, **1998**, 77, 366.
- <sup>110</sup> M. van Beusichem, N. Farrell. *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 634.
- <sup>111</sup> N. Farrell. *Met. Ions Biol. Syst.*, **1996**, 32, 603.
- <sup>112</sup> L.K. Webster, G.B. Deacon, D.P. Buxton, B.L. Hillcoat, A.M. James, I.A.G. Roos, R.J. Thomson, L.P.G. Wakelin, T.L. Williams. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 3349.
- <sup>113</sup> a) M.S. Robillard, M. Galanski, W. Zimmermann, B.K. Keppler, J. Reedijk. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 88, 254-259. b) M. Dealmeida, A.P.S. Fontes, R.N. Berg, E.T. Cesar, E.D. Felicio, J.D. Desouza. *Molecules*, **2002**, 7, 405-411.
- <sup>114</sup> V.H.C. Bramwell, D. Crowther, S. O'Malley, R. Swindell, R. Johnson, E.H. Cooper, N. Thatdrer, A. Howell. *Cancer Treat. Rep.*, **1985**, 69, 409.
- <sup>115</sup> M. Gordon, S. Hollander. *J. Med. Chem.*, **1993**, 24, 209.
- <sup>116</sup> M.J. McKeage, F. Raynaud, J. Ward, C. Berry, D. O'Dell, L.R. Kelland, B. Murrer, P. Santabarabara, K.R. Harrap, I.R. Judson. *J. Clin. Oncol.*, **1997**, 15, 2691.
- <sup>117</sup> R.M. Orr, C.F. O'Neill, M.C. Nicolson, C.F.J. Barnard, B.A. Murrer, C.M. Giandomenico, F.K. Vollano, R. Harrap. *Br. J. Cancer*, **1994**, 70, 415.
- <sup>118</sup> 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.



- 
- <sup>119</sup> N.A. Kratochwil, Z. Guo, P.D.S. Murdoch, J.A. Parkinson, P.J. Bednarski, P.J. Sadler. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 8253.
- <sup>120</sup> a) D.C. Dolman, G.B. Deacon, T.W. Hambley. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 88, 260-267. b) C.N. Navarroranninger, E.I. Montero, J.M. Perez, L.R. Kelland, A. Pizarro, A.G. Quiroga. *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, 86, 356. c) M. Watabe, M. Kai, S. Asanuma, M. Yoshikane, A. Horiuchi, A. Ogasawara, T. Watanabe, T. Mikami, T. Matsumoto, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 1496-1500. d) S.R.A. Khan, S. Huang, S. Shamsuddin, S. Inutsuka, K.H. Whitemire, Z.H. Siddik, A.R. Khokhar, *Bioorg. & Med. Chem.*, **2000**, 8, 515-521. e) Z.H. Siddik, G.S. Hagopian, G. Thai, S. Tomisaki, T. Toyomasu, A.R. Khokhar. *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, 77, 65-70.
- <sup>121</sup> M.D. Hell, T.W. Hambley. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 1-19.
- <sup>122</sup> N. Farrell, T.T.B. Ha, J.P. Souchard, F.L. Wimmer, S. Cross, N.P. Johnson. *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 2240.
- <sup>123</sup> a) M. Coluccia, A. Nassi, F. Loseto, A. Boccarelli, M.A. Mariggio, D. Giodano, F.P. Intini, P. Caouto, G. Natile. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 510. b) G. Natile, M. Coluccia, *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, 216, 383-410.
- <sup>124</sup> A. Zakouska, O. Novakova, Z. Balcarova, U. Bierbach, N. Farrell, V. Brabec. *Eur. J. Biochem.*, **1998**, 254, 547.
- <sup>125</sup> a) U. Bierbach, N. Farrell. *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 3657. b) P. Yang, X.L. Meng, L.J. Yue, L.J. Wei, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 89, 248-254. c) E.I. Montero, J.M. Perez, A. Schwartz, M.A. Fuertes, J.M. Malinge, C. Alonso, M. Leng, C. Navarroranninger, *ChemBiochem*, **2002**, 3, 61-67.
- <sup>126</sup> J.D. Hoeschele, T.A. Butler, J.A. Roberts. *Inorganic Chemistry in Biology and Medicine*, **1980**, A.E. Martel Ed., Washington DC.
- <sup>127</sup> a) S.F. Bellon, S.J. Lippard. *Biophys. Chem.*, **1990**, 35, 179. b) S.F. Bellon, J.H. Coleman, S.J. Lippard. *Biochemistry*, **1991**, 30, 8026.
- <sup>128</sup> J.J. Roberts, F. Friedlos. *Cancer Res.*, **1987**, 47, 31.
- <sup>129</sup> A.L. Pinto, S.J. Lippard. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1985**, 82, 4616.

- 
- <sup>130</sup> L.R. Kelland, C.F.J. Barnard, K.J. Mellish, M. Jones, P.M. Goddard, M.A. Valenti, B.A. Murrer, K.K. Harrap. *Cancer Res.*, **1994**, 54, 5618.
- <sup>131</sup> a) M. Leng, D. Locker, M.J. Giraudpanis, A. Schwartz, F.P. Intini, G. Natile, C. Pisano, A. Boccarelli, D. Giordano, M. Coluccia, *Molec. Pharm.*, **2000**, 58, 1525-1535. b) 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, 31-35.
- <sup>132</sup> N. Farrell. *Comm. Inorg. Chem.*, **1995**, 16, 373.
- <sup>133</sup> a) P.K. Wu, M. Kharatishvili, Y. Qu, N. Farrell. *J. Inorg. Biochem.*, **1996**, 63, 9. b) P.K. Wu, Y. Qu, B. van Houten, N. Farrell. *J. Inorg. Biochem.*, **1994**, 54, 207.
- <sup>134</sup> A. Johnson, Y. Qu, B. van Houten, N. Farrell. *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20, 1697.
- <sup>135</sup> Y. Zou, B. van Houten, N. Farrell. *Biochemistry*, **1994**, 33, 5404.
- <sup>136</sup> N. Farrell, T.G. Appleton, Y. Au, J.D. Roberts, A.P. Soares Fontes, K.A. Skou, P. Wu, Y. Zou. *Biochemistry*, **1995**, 34, 15480.
- <sup>137</sup> a) U. Bierbach, T.W. Hambley, N. Farrell. *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 708. b) U. Bierbach, J. D. Roberts, N. Farrell. *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 717. c) Y. Qu, H. Rauter, A.P.S. Bandarage, L.R. Kelland, N. Farrell. *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 3189-3192.
- <sup>138</sup> a) H. Rauter, R. Di Domenico, E. Menta, A. Oliva, Y. Qu, N. Farrell. *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 3919. b) J. Bennett, A.D. Rae, G.R. Salem, N.C. Ward, P. Waring, K. Wells, A.C. Willis. *J. Chem. Soc-Dalton Trans.*, **2002**, 234-243. c) B.A.J. Jansen, J. Vanderzwan, H. Dendulk, J. Brouer, J. Reedijk. *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 245-249.
- <sup>139</sup> a) T.G. Appleton, Y. Qu, J.D. Hoeschele, N. Farrell. *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 2591. b) M.S. Davies, D.S. Thomas, A. Hegmans, S.J. Bernersprice, N. Farrell. *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 1101-1109.
- <sup>140</sup> a) F.C. Giuliani, G. Beggiolin, L. Piazzoni, M.L. Formento, P. Di Blesi, N. Farrell, L.R. Kelland, C. Caserini, P. Perego, R. Supino, F. Zunino. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, **1997**, 38, 310. b) P. Perego, L. Gatti, C. Caserini, R. Supino, D. Colangelo, R. Leone, S. Spinelli, N. Farrell, F. Zunino. *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, 77, 59-64.
- <sup>141</sup> P. Di Blasi, A. Bernareggi, G. Beggiolin, L. Piazzoni, E. Menta, M.L. Fomento. *Anticancer Res.*, **1998**, 18, 3113.

- 
- <sup>142</sup> A.G. Quiroga, J.M. Pérez, J. López-Solera, J.K. Massaguer, A. Luque, P. Roman, A. Edwards, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 1399.
- <sup>143</sup> G. Pratesi, F.C. Giuliani, D. Polizzi, S. Righetti, C. Pezzoni, N. Farrell, F. Zunino. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **1997**, 38, 3310.
- <sup>144</sup> P. Perego, C. Caserini, L. Gatti, N. Caranini, S. Romanelli, R. Supino, D. Colangelo, L. Viano, R. Leone, N. Spinelli, G. Pezzoni, C. Mazotti, N. Farrell, F. Znrino. *Mol. Pharm.*, **1999**, 55, 528-534.
- <sup>145</sup> a) J.H. Burchenal, K. Kalaher, K. Dew. *Biochimie*, **1978**, 60, 961. b) J.H. Burchenal, K. Kalaher, K. Dew, L. Lo Kys. *Cancer Treat. Rep.*, **1979**, 63, 1493.
- <sup>146</sup> a) C. Cullinane, G.B. Deacon, P.R. Drago, T.W. Hambley, K.T. Nelson, L.K. Webster. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 89, 293-301.
- <sup>147</sup> Y. Kidani. *Trends Inorg. Chem.*, **1991**, 1, 107.
- <sup>148</sup> J.D. Hoeschele, H.D.H. Showalter, A.J. Kraker, W.L. Elliott, B.J. Roberts, J.W. Kampf. *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 2630.
- <sup>149</sup> J. Shamsuddin. *J. Inorg. Biochem.*, **1996**, 61, 291.
- <sup>150</sup> Y. Kido, A.R. Khokhar, S. Al-Baker, Z.H. Siddik. *Cancer Res.*, **1993**, 53, 4567.
- <sup>151</sup> Z.H. Siddik, S. Al-Baker, G. Thai, A.R. Khokhar. *Anti-Cancer Drug Des.*, **1994**, 9, 139.
- <sup>152</sup> S. Shamsuddin, I. Takahashi, Z.H. Siddik, A.R.J. Khokhar. *J. Inorg. Biochem.*, **1996**, 61, 291.
- <sup>153</sup> S. Shamsuddin, C.C. Santillan, J.L. Stark, K.H. Whitmire, Z.H. Siddik, A.R. Khokhar. *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, 71, 29.
- <sup>154</sup> A.R. Khokhar, S. Al-Baker, S. Shamsuddin, Z.H. Siddik. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 112.
- <sup>155</sup> S. Shamsuddin, J.W. van Hal, J.L. Stark, K.H. Whitmire, A.R. Khokhar. *J. Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 5969.
- <sup>156</sup> S.G. Chang, J.C. Jung, Y.S. Rho, J.S. Huh, J.I. Kimm, R.M. Hoffman. *Anticancer Res.*, **1996**, 16, 3423.
- <sup>157</sup> M.S. Baek, Y.S. Rho, J.C. Jung, S.G. Chang, M. Nomura, K.I. Miyamoto. *Anticancer Res.*, **1997**, 17, 955.

- 
- <sup>158</sup> a) S.R.A. Khan, A.R. Khokhar. *J. Coord. Chem.*, **2000**, 51, 323-333. b) S. Shamsuddin, M.S. Ali, A.R. Khokhar. *J. Coord. Chem.*, **2000**, 49, 291-299.
- <sup>159</sup> R. Knox, F. Friedlos, D. Lydall, J.J. Roberts. *Cancer Res.*, **1986**, 46, 1972-1979.
- <sup>160</sup> a) Y.P. Ho, K.K.W. To, S.C.F. Auyeung, X.N. Wang, G. Lin, X.W. Han. *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 2065-2068. b) R. Cini, S. Grabner, N. Bukovec, L. Cerasino, G. Natile. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 1601-1607. c) R. Paschke, J. Kalbitz, C. Paetz. *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 304, 241-249.
- <sup>161</sup> B.D. Palmer, H.H. Lee, P. Johnson, B.C. Baguley, G. Wickham, L.P.G. Wakelin, W.D. McFadyen, W.A. Denny. *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 3008.
- <sup>162</sup> H.H. Lee, B.D. Palmer, B.C. Baguley, M. Chin, W.D. Fadyen, G. Wickham, W.A. Denny. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 2983.
- <sup>163</sup> V. Murray, H. Motyka, P.R. England, G. Wickham, H.H. Lee, W.A. Denny, D.W. McFadyen. *Biochemistry*, **1992**, 31, 11812.
- <sup>164</sup> V. Murray, H. Motyka, P.R. England, G. Wickham, H.H. Lee, W.A. Denny, D.W. McFadyen. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 207, 18805.
- <sup>165</sup> K.F. Gean, R. Benshoshan, A. Ramu, I. Ringel, J. Katzhandler, D. Gibson. *Eur. J. Med. Chem.*, **1991**, 26, 593.
- <sup>166</sup> F. Zunino, G. Savi, A. Pasini. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1986**, 18, 180.
- <sup>167</sup> a) R. Gust, K. Niebler, H. Schönenberger. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 2070. b) A. Jackson, J. Davis, R.J. Pither, A. Rodger, M.J. Hannon. *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 3964-3973.
- <sup>168</sup> a) W.I. Sundquist, D.P. Bancroft, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1590. b) E.T. Martins, H. Baruah, J. Kramarczyk, G. Saluta, C.S. Day, G.L. Kucera, U. Bierbach. *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 4492-4496.
- <sup>169</sup> W.I. Sundquist, D.P. Bancroft, L. Chassot, S. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 8559.
- <sup>170</sup> N.D. Sachinvala, H. Chen, W.P. Niemezura, E. Furusawa, R.E. Cramer, J.J. Rupp, I. Ganjian. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1791.

- 
- <sup>171</sup> a) H.C. Apfelbaum, J. Blum, F. Mandelbaumshavit. *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 186, 243.  
 b) M.S. Robillard, A.R.P.M. Valentijn, N.J. Meeuwenoord, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, J. Reedijk. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 3096-3099.
- <sup>172</sup> R.I. Haines, D.R. Hutchings, T.M. McCormack. *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, 85, 1-7.
- <sup>173</sup> a) L.S. Hollis, A.V. Miller, A.R. Amundsen, J.E. Schurig, E.H. Stern. *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 105-111. b) A.R. Battle, J.A. Platts, T.W. Hambley, G.B. Deacon. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2002**, 1898-1902.
- <sup>174</sup> R. Gust, G. Bernhardt, T. Spuiss, R. Krauser, M. Koch, H. Shönenberger, K.H. Bauer, S. Schertl, Z. Lu. *Arch. Pharm.*, **1968**, 328, 645-653.
- <sup>175</sup> R. Kockerbauer, P.J. Bednarski. *J. Pharm. Sci.*, **1995**, 84, 819-823.
- <sup>176</sup> T.A.K. Al-Allaf, L.J. Rahan. *Appl. Organometal. Chem.*, **1999**, 13, 63-68.
- <sup>177</sup> R.W. Mason, K. McGrouther, P.R.R. Ranatunge-Banderage, B.H. Robinsom, J. Simpson. *Appl. Organometal. Chem.*, **1999**, 13, 163-173.
- <sup>178</sup> M. Hartmann, B.K. Keppler. *Comm. Inorg. Chem.*, **1995**, 16, 339-372.
- <sup>179</sup> M.J. Clarke, M. Stubbs. *Met. Ions Biol. Syst.*, **1996**, 32, 727-780.
- <sup>180</sup> H. Ali, J.E. van Lier. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2379.
- <sup>181</sup> M.J. Clarke, F. Zhu, D.R. Frasca. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2511-2533.
- <sup>182</sup> a) H. Hohmann, R. Van Eldik. *Inorg. Chim. Acta*, **1990**, 174, 87. b) H. Hohmann, S. Suvachittanont, R. Van Eldik. *Inorg. Chim. Acta*, **1990**, 177, 51.
- <sup>183</sup> R.G. Compton, R. Barhgout, J.C. Eklund, A.C. Fisher, S.G. Davies, M.R. Metzler, A.M. Bond, R. Colton, J.N. Walter. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1993**, 3641.
- <sup>184</sup> J.D. Higgins, L. Neely, S. Fricker. *J. Inorg. Biochem.*, **1993**, 49, 149.
- <sup>185</sup> a) A. Papageorgiu, Z. Iakovidou, D. Mourelatos, E. Miglou, L. Boutis, A. Kotsis, D. Kovala-Demertzi, A. Domapoulou, D.X. West, M.A. Demertzis, *Anticancer Res.*, **1997**, 17, 247. b) L. Tusek-Bozic, I. Matijasic, G. Bocelli, G. Calestani, A. Furlani, V. Scarcia, A. Papaioannou. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1991**, 195.
- <sup>186</sup> A.M. Bond, R. Colton, F. Marken, J.N. Walter. *Organometallics*, **1994**, 13, 5122.
- <sup>187</sup> B.J. Foster, K. Clagett-Carr, D. Hoth, B. Leyland-Jones. *Cancer Treat. Rep.*, **1986**, 70, 1311-1319.

- 
- <sup>188</sup> P.A. Seligman, E.D. Crawford. *Natl. Cancer. Inst.*, **1991**, 83, 1582-1584.
- <sup>189</sup> R. Dreicer, T.A. Lallas, J.K. Joyce, B. Anderson, J.I. Sorosky, R.E. Buller. *Am. J. Clin. Oncol.*, **1998**, 21, 287-290.
- <sup>190</sup> P. Kopf-Maier. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, 47, 1-16.
- <sup>191</sup> a) P. Collery, H. Millart, J.P. Kleisbauer, D. Paillotin, G. Roninet, A. Durand, S. Claeysens, J.M. Legendre, A. Leroy, A. Rousseau, C. Pechery, S. Kochman. *Anticancer Res.*, **1994**, 14, 2299-2306. b) P. Collery, M. Morel, B. De Soize, H. Millart, D. Perdu, A. Prevost, H. Vallerand, C. Pechery, H. Choisy, J.C. Etienne. *Anticancer Res.*, **1991**, 11, 1529-1532.
- <sup>192</sup> L.R. Bernstein. *Pharmacol. Rev.*, **1998**, 50, 665-682.
- <sup>193</sup> F. Nejmeddine, N. Caillat-Vigneron, F. Escaig, J.L. Moretti, M. Raphael, P. Galle. *Cell. Mol. Biol.*, **1998**, 44, 1215-1220.
- <sup>194</sup> J.H. Lundberg, C.R. Chitambar. *Cancer Res.*, **1990**, 50, 6466-6470.
- <sup>195</sup> B.J. Wallar, J.D. Lipscomb. *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 2625-2657.
- <sup>196</sup> C.R. Chitambar, J. Narasimhan, J. Guy, D.S. Sem, W.J. O'Brien. *Cancer Res.*, **1991**, 51, 6199-6201.
- <sup>197</sup> D. Frasca, J. Ciampa, J. Emerson, R.S. Umans, M.J. Clarke. *Metal-Based Drugs*, **1996**, 3, 196-209.
- <sup>198</sup> a) M.J. Clarke, B. Jansen, K.A. Marx, R. Kruger. *Inorg. Chim. Acta*, **1986**, 124, 13-28. b) M. McNamara, M.J. Clarke. *Inorg. Chim. Acta*, **1992**, 195, 175-185.
- <sup>199</sup> a) K.A. Marx, R. Kruger, M.J. Clarke. *Mol. Cell. Biochem.*, **1989**, 86, 155-162. b) K.A. Marx, C. Seery, P. Malloy. *Mol. Cell. Biochem.*, **1989**, 90, 37-95.
- <sup>200</sup> a) M. Carballo, R. Vilaplana, G. Marquez, M. Conde, F. Bedoya, F. González-Vilchez, F. Sobrino. *Biochem. J.*, **1997**, 328, 559-564. b) R. Vilaplana, M.A. Romero, M. Quiros, J.M. Salas, F. González-Vilchez. *Metal-Based Drugs*, **1995**, 2, 211-219.
- <sup>201</sup> S.R. Vilaplana, M.G. Basallote, C. Ruiz-Valero, E. Gutierrez, F. González-Vilchez. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1991**, 100-101.
- <sup>202</sup> R.A. Vilaplana, F. González-Vilchez, C. Ruiz-Valero. *Inorg. Chim. Acta*, **1994**, 224, 15.
- <sup>203</sup> C. Monti-Bragadin, M. Giacca, L. Dolzani, M. Tamaro. *Inorg. Chim. Acta*, **1987**, 137, 31.

- 
- <sup>204</sup> E. Alessio, G. Mestroni, G.A. Nardin, M. Wahib, M. Calligaria, G. Sava, S. Zorzet. *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 4099-4106.
- <sup>205</sup> M. Coluccia, G. Sava, F. Loseto, A. Nassi, A. Boccarelli, D. Giordano, E. Alessio, G. Mestroni. *Eur. J. Cancer*, **1993**, 29, 1873-1879.
- <sup>206</sup> J.L. Bear, C.L. Yao, L.M. Liu, F.J. Capdevielle, J.D. Korp, T.A. Albright, S.K. Kang, K.M. Kadish. *Inorg. Chem.*, **1989**, 28, 1254-1262.
- <sup>207</sup> K.R. Dunbar, J.H. Matonic, V.P. Saharan, C.A. Cramfort, G. Christon. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 2201-2202.
- <sup>208</sup> K.V. Catalan, K.R. Dunbar, L. Bickerstaff, K.D. Bishop, E. Lozada. *FASEB J.*, **1997**, 11, A1366.
- <sup>209</sup> R.A. Howard, E. Sherwood, A. Erck, A.P. Kimball, J.L. Bear. *J. Med. Chem.*, **1977**, 20, 943.
- <sup>210</sup> F. Pruchnik, D. Dus. *J. Inorg. Biochem.*, **1996**, 61, 55-61.
- <sup>211</sup> E. Lozada, K.R. Dunbar, L. Bickerstaff, K.D. Bishop, K.V. Catalan, *FASEB J.*, **1997**, 11, A1366.
- <sup>212</sup> G. Mestroni, E. Alessio, M. Coluccia. *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 273, 62.
- <sup>213</sup> B.A. Jackson, J.K. Barton. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 12986-12987.
- <sup>214</sup> P. Kopf-Maier, H. Kopf. *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 1137-1152.
- <sup>215</sup> C. Villena-Heinsen, M. Friedrich, A.K. Ertan, C. Farnhammer, W. Schmidt. *Anticancer Drugs*, **1998**, 9, 557-563.
- <sup>216</sup> L.Y. Kuo, A.H. Liu, T.J. Marks, *Met. Ion Biol. Syst.*, **1996**, 33, 53-85.
- <sup>217</sup> J.H. Murray, M.M. Handing. *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 1936-1941.
- <sup>218</sup> M.L. McLaughlin, J.M. Cronan, T.R. Schaller, R.D. Snelling. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 8949-8952.
- <sup>219</sup> B.K. Keppler, C. Friesen, H.G. Moritz, H. Vongerichten, E. Vogel. *Struct. Bonding*, **1991**, 78, 97-127.
- <sup>220</sup> T. Schilling, K.B. Keppler, M.E. Heim, G. Niebch, H. Dietzfelbinger, J. Rastetter, A.R. Hanauske. *Invest. New Drugs*, **1996**, 13, 327-332.
- <sup>221</sup> B.K. Keppler, M. Hartmann. *Metal-Based Drugs*, **1994**, 1, 145-149.

- <sup>222</sup> A. Novogrodsky, M. Suthanthiran, K.H. Stenzel. *J. Immunol.*, **1989**, 143, 3981-3987.
- <sup>223</sup> S.W. Ng, V.G.K. Das, J. Holecek, A. Lycka, M. Gielen, M.G.B. Drew. *Appl. Organomet. Chem.*, **1997**, 11, 39-45.
- <sup>224</sup> E.R.T. Tiekink, M. Gielen, A. Bouhdid, R. Willem, V. I. Bregadze, L.V. Ermanson, S.A. Glazun. *Metal-Based Drugs*, **1997**, 4, 75-80.
- <sup>225</sup> D. de Vos, R. Willem, M. Gielen, K.E. van Wingerden, K. Nooter. *Metal-Based Drugs*, **1998**, 5, 179-188.
- <sup>226</sup> I. Bertini, H. Bgray, S.J. Lippard, J.S. Valentine. *Bioinorganic Chemistry*, **1992**, University Science Books.
- <sup>227</sup> S.W. Lowe, H.E. Ruley. T. Jacks, D.E. Housman. *Cell*, **1993**, 74, 957-967.



## CAPÍTOL 2

---

### OBJECTIUS



## OBJECTIUS

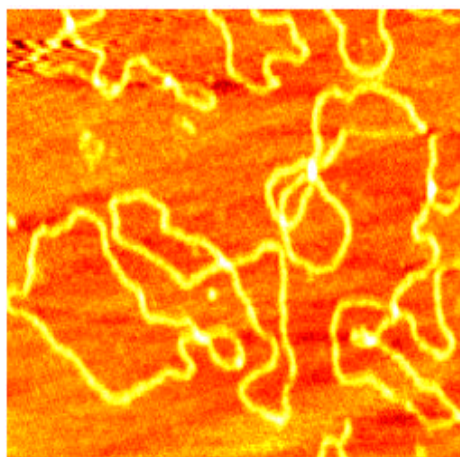
1. Síntesi i caracterització química de nous complexos de Pt(II) susceptibles a ser utilitzats com a agents antitumorals, que presentin geometria cis, amb dos lligands làbils tipus clorur i un lligand diaminoquelatant derivat del 2,3-diaminopropà i 2,4-diaminobutà.
2. Aplicació de noves estratègies sintètiques encaminades a millorar la selectivitat dels complexos per la creació de zones específiques de reconeixement molecular. Es pretén funcionalitzar els lligands amb grups químics que permetin l'obtenció de complexos cisplatí units a molècules orgàniques tipus aminoàcid o pèptid.
3. Realització de diversos assaigs biològics per tal de determinar l'existència d'interacció complex-DNA, l'efecte que produeix aquesta interacció sobre l'estructura del DNA i l'activitat antitumoral en diferents línies cel·lulars. S'anlitzarà en cada cas els diferents paràmetres que governen la relació estructura-activitat.



## CAPÍTOL 3

---

**SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DELS COMPLEXOS DE Pt(II)  
AMB ELS LLIGANDS 2,3-DIAMINOPROPIÒNIC I 2,4-  
DIAMINOBUTÍRIC I ELS RESPECTIUS ÉSTERS ETÍLICS.  
ESTUDI DE LLUR INTERACCIÓ AMB EL DNA I DE  
L'ACTIVITAT ANTITUMORAL.**



**Síntesi i caracterització dels complexos de Pt(II) amb els lligands 2,3-diaminopropiònic i 2,4-diaminobutíric i els respectius ésters etílics. Estudi de llur interacció amb el DNA i de l'activitat antitumoral.**

## **ÍNDEX.**

1. RESUM	73
2. INTRODUCCIÓ	74
3. EXPERIMENTAL	75
3.1. Material i instrumentació	75
3.2. Síntesi dels lligands i complexos	78
3.3. Assaigs biològics	81
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	87
4.1. Síntesi i caracterització química dels lligands i complexos	87
4.2. Assaigs biològics	96
4.2.1. Estudi de la interacció Pt-DNA per dicroisme circular	96
4.2.2. Estudi de la interacció Pt-GMP per RMN- <sup>1</sup> H	102
4.2.3. Estudi de la interacció Pt-DNA per electroforesi en gel d'agarosa	107
4.2.4. Imatges de microscopia de forces atòmiques	110
4.2.5. Assaigs de proliferació cel·lular	113
4.2.6. Determinació de la mort cel·lular per apoptosi	121
5. CONCLUSIONS	127
6. REFERÈNCIES	131
7. MATERIAL SUPLEMENTARI	135



## 1. RESUM.

En aquest capítol es descriu la síntesi i caracterització química de quatre complexos de Pt(II) amb lligands de tipus diaminocarboxílic i els respectius ésters etílics, **cis-diclor-(2,3-diaminopropiònic)Pt(II)**, **cis-diclor-(2,4-diaminobutíric)Pt(II)**, **cis-diclor-(2,3-diaminopropionat d'etil)Pt(II)** i **cis-diclor-(2,4-diaminobutirat d'etil)Pt(II)**. L'efecte biològic d'aquests compostos s'ha avaluat en quatre etapes: 1. existència d'interacció amb el DNA; 2. mecanisme d'actuació a través de l'estudi de la interacció Pt-GMP; 3. percentatge de supervivència cel·lular; 4. tipus de mort cel·lular. L'estudi de la interacció d'aquests complexos amb el DNA per dicroisme circular (DC) mostra un comportament d'aquests compostos similar al que presenta el cisplatí, mentre que el comportament electroforètic és diferent al d'aquest. La interacció complex-DNA s'ha pogut visualitzar per microscopia de forces atòmiques (AFM). La reactivitat dels quatre complexos amb 5'-GMP s'ha seguit per RMN-<sup>1</sup>H, observant-se que el mecanisme d'interacció d'aquests complexos és a través de la formació d'un enllaç Pt-5'GMP en la posició N7 de la guanina. També s'ha pogut determinar el temps de vida mitja ( $t_{1/2}$ ) de la formació dels adductes bifuncionals Pt-5'GMP i s'ha percebut la formació d'espècies monofuncionals intermitges. En aquestes condicions de treball també s'ha comprovat la hidròlisi dels corresponents ésters etílics.

Els dos complexos que contenen els lligands diaminocarboxílics inhibeixen de forma remarcable la supervivència cel·lular de les línies cel·lulars A431 (carcinoma epidermoide ATCC-American Type Culture Collection-N<sup>o</sup>CLR 1555), HeLa (carcinoma humà d'úter) i HL60 (leucemia aguda promielocítica ATCC N<sup>o</sup>CLL-240), depenent de la dosi i del temps d'incubació. Tot i això, presenten valors de IC<sub>50</sub> més elevats que el cisplatí. En tots els casos, l'activitat citotòxica és deguda a una mort cel·lular per apoptosi, tal i com ho demostren els resultats del test de l'Annexina V per l'estudi de citometria de flux i de la fragmentació del DNA.

S'ha pogut comprovar que l'ús del DMSO com a dissolvent en una proporció del 12 % bloqueja les posicions làbils dels complexos i els inactiva biològicament.

## 2. INTRODUCCIÓ

El cisplatí,  $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$ , i altres complexos de Pt (II) han estat estudiats amb la finalitat de determinar els respectius mecanismes d'actuació davant de diferents tipus de cultius cel·lulars, els quals donen com a resultat la supressió del creixement de les cèl·lules tumorals. L'èxit que tenen alguns complexos metàl·lics en la inhibició del creixement tumoral s'ha atribuït a diferents propietats, incloent la permeabilitat a través de la membrana, l'acumulació en l'interior de la cèl·lula tumoral i del nucli, i l'eficiència en coordinar-se al DNA. Aquesta interacció amb el DNA és la clau de la inhibició del creixement.<sup>1,2,3,4,5</sup>

Alguns complexos de Pt (II) contenint etilendiamina o etilendiamines substituïdes s'han provat per experimentar l'activitat *in vitro* i *in vivo*.<sup>6</sup> En aquests estudis s'ha comprovat que l'activitat d'aquests complexos depèn dels substituents de la etilendiamina i també dels grups o lligands làbils, de manera que posteriors estudis s'han dirigit cap a compostos amb lligands diamino quelatants que continguin alguna funcionalització en la cadena.<sup>7</sup>

L'estudi de la relació estructura-activitat amb espècies de tipus  $[\text{PtA}_m\text{X}_2]$ , on A=amina i X=halur, ha demostrat que la longitud de la cadena pot jugar un paper important en la capacitat dels complexos a hidrolitzar-se, influenciant en llur solubilitat. Això pot afectar la permeabilitat de la membrana i conseqüentment la quantitat de complex en la cèl·lula.<sup>8,9,10</sup>

És ben conegut que la diana final dels complexos de platí és el DNA, preferentment per la posició N7 de les guanines, afavorida termodinàmicament, i que les seqüències GG i AG de la doble cadena del DNA són les posicions d'enllaç majoritàries.<sup>11,12,13</sup> Els compostos interaccionen amb el DNA de diferents formes, cada una donant lloc a una distorsió específica del DNA i per tant donant una funció farmacològica específica.<sup>14</sup> Per tal de determinar satisfactòriament les formes d'actuació dels complexos s'analitza el mecanisme d'interacció amb nucleòtids.<sup>15,16,17</sup>

En aquest capítol es descriuen dues sèries de complexos derivats del cisplatí (Figura 1), amb lligands diaminoquelatants de diferents longituds de cadena i amb substituents diferents amb la finalitat de reduir els efectes secundaris que presenta el



cisplatí i augmentar l'efectivitat. Aquests complexos s'han estudiat per establir com la càrrega i la longitud del lligand diaminoquelatant afecta en l'activitat antiproliferativa *in vitro* i en la interacció amb 5'-GMP i amb el DNA. Els complexos de platí dels lligands **Hdap** i **Hdab** es desprotonen a pH fisiològic, quedant amb una càrrega negativa. Per tant, suposen una excepció de les normes estructura-activitat clàssiques descrites per Cleare i Hoeschele,<sup>18</sup> els quals concluen que els compostos havien de ser neutres per poder presentar activitat antitumoral. Així doncs, l'estudi d'aquests compostos implica la introducció de nous paràmetres a avaluar en l'estudi del transport a través de la cèl·lula i de la interacció amb el DNA.

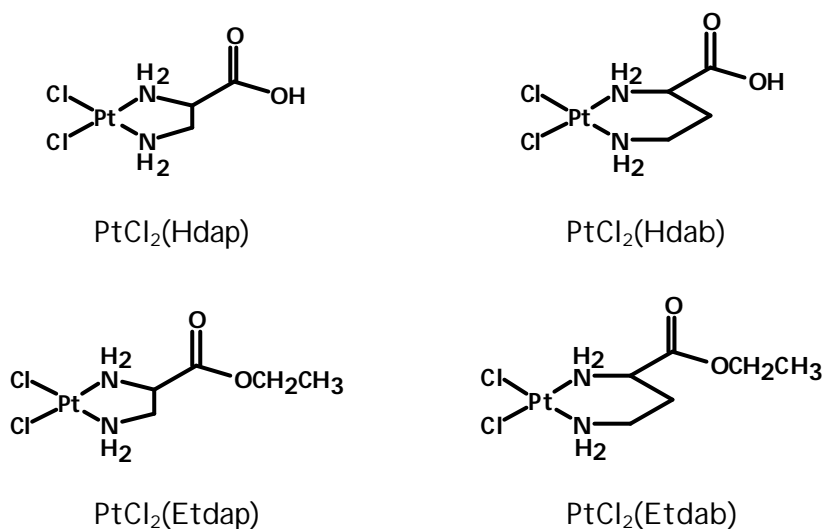


Figura 1. Estructura dels complexos de Pt(II) sintetitzats i estudiats.

### 3. EXPERIMENTAL.

#### 3.1. MATERIAL I INSTRUMENTACIÓ.

##### 3.1.2. Material.

Els reactius comercials han estat utilitzats sense purificació prèvia: àcid d,l-2,3-diaminopropiònic monohidroclorat 98% (Aldrich), àcid d,l-2,4-diaminobutíric dihidroclorat 98% (Aldrich), bicarbonat sòdic (Panreac), àcid clorhídric 37% (Aldrich), àcid sulfúric concentrat (Panreac), la sal disòdica de 5'-rGMP (Sigma), dihidrogenfosfat

de potassi (J.T. Baker Chemicals), Calf Thymus-DNA (Sigma), pBR-DNA (Boehringer Mannheim GmbH).

El tetraclorplatínat de potassi,  $K_2PtCl_4$ , ha estat proporcionat per gentilesa de Johnson Matthey.

Els dissolvents de qualitat PS han estat obtinguts de Panreac i SDS.

El nitrogen gas ha estat subministrat per Abelló Linde.

El tampó TE (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH=7.4) i el DNA Calf-Thymus (Sigma) necessaris per la preparació de les mostres de difracció circular han estat proporcionats per la Universitat de Barcelona.

El tampó HEPES (40 mM HEPES, 10 mM  $MgCl_2$ , pH=7.4) i el plasmidi pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH) utilitzats per la preparació de les mostres de microscopia de forces atòmiques han estat proporcionats per la Universitat de Barcelona.

El tampó TBE (45 mM tris-[hidroximetil]aminometà, 45 mM àcid bòric, 1 mM EDTA, pH= 8.0), l'agarosa (Ecogen) i el bromur d'etidi (ICN Biomedicals) necessaris pels gels d'electroforesi han estat proporcionats per l'àrea de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Girona.

Les dissolucions i medis pels assaigs de proliferació cel·lular i de detecció d'apoptosi han estat proporcionats per l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona: Solució del 0.4 % de blau de tripan (Gibco BRL, USA), DMSO (Sigma), PBS (Gibco BRL, USA), sèrum fetal boví FBS (Gibco BRL, USA), solució antibiòtic-antimicòtic 100x (Gibco BRL, USA), piruvat 100 mM (Sebak, Alemanya), DMEM líquid amb GLUTAMAX (Gibco BRL, USA), IMDM líquid amb GLUTAMAX (Gibco BRL; USA), tripsina-EDTA solució (Gibco BRL, USA), kit EZ4U (Biomédica, Alemanya), kit Roche Annexin-V-Fluos Staining, tampó de lisis (10 mM Tris-HCl, pH=8.0, 100 mM EDTA pH= 8.0, 20 mg/mL RNAsa A), proteinassa K 10 mg/mL, NaCl 5M, gel d'agarosa al 1.5 %, 50x TAE, tampó d'aplicació de mostres 4x (45 mL formamida, 5 mL EDTA 0.1 M, 0.15 g blau de bromofenol, 0.15 g xilencianol,  $H_2O$  fins a 100 mL), bromur d'etidi (Amresco, USA)

Medi complet amb FBS: medi + antibiòtic + 10% FBS.

Medi de congelació: 90% FBS + 10% DMSO.

### 3.1.2. Instrumentació.

Els espectres IR han estat enregistrats en estat sòlid (pastilla de KBr) en un espectròmetre FT-IR Mattson Satellite en el rang de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Els espectres de RMN- $^1\text{H}$  i RMN- $^{13}\text{C}$  han estat enregistrats en un espectròmetre Bruker DPX 200 utilitzant  $\text{D}_2\text{O}$  i  $\text{DMSO-d}_6$  com a dissolvents. Els espectres de RMN- $^1\text{H}$  per l'estudi de les interaccions Pt-GMP han estat enregistrats en un espectròmetre Bruker DPX 300 utilitzant  $\text{D}_2\text{O}$  com a dissolvent i TMS com a referència externa a  $\delta = 0$  ppm. Els anàlisis elementals s'han portat a terme en un microanalitzador Carlo Erba 1108. Els espectres ESI-MS s'han realitzat en un espectròmetre Navigator Thermo Quest Finigan utilitzant  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  com a dissolvent. Les mesures de pH s'han realitzat a 298 °K amb un pHmetre Radiometer PHM 80.

Els espectres de dicroisme circular s'han obtingut en un espectropolarímetre J-600 (Jasco Europe) utilitzant una cel·la de quars rectangular de 1 cm. Els resultats han estat analitzats utilitzant el programari Jasco.

Les electroforesis en gel d'agarosa s'han realitzat en un tanc horitzontal Danaphor connectat a una font de voltatge variable Apelex Electrophoresis Power Supply st. 304. Els gels es fotografien en un sistema d'imatge Bio Rad Gel Doc 1000.

Les imatges de microscopia de forces atòmiques han estat preses a través d'un Nanoscope III Multimode AFM (Digital Instrumentals) operant a una velocitat de scan de 1-3 Hz. La sonda de AFM ha estat de 125  $\mu\text{m}$  de longitud i amb una punta de silici (Nanosensors GmbH) amb una freqüència de ressonància de  $f_0 = 330$  kHz i una constant de  $K = 50$  N/m.

En els assaigs de proliferació cel·lular in vitro, les mesures d'absorbància de les plaques de pouets s'han pres amb un lector Labsystems iEMS Reader MF a 495 nm i amb un filtre de referència de 620 nm. Com a indicador cromòfor s'ha utilitzat el Kit EZ4U basat en sals de tetrazol. Les mesures de citometria de flux s'han realitzat en el citòmetre FACSCALIBUR Becton Dickinson utilitzant el Kit Roche Annexin-V-Fluos Staining i l'aplicació simultània de iodur de propidi.

### 3.2. SÍNTESI DELS LLIGANDS I COMPLEXOS.

#### 3.2.1. Éster 2,3-diaminopropionat d'etil dihidroclorat. [Etdap· 2HCl].

S'addicionen 40 mL d'etanol absolut a l'àcid d,l-2,3-diaminopropiònic monohidroclorat, (Hdap·HCl), (0.4 gr, 2.846 mmols). La suspensió resultant s'escalfa a reflux mantenint un corrent continu i estable de HCl gas durant 24 hores. La solució incolora resultant es filtra en calent, i el filtrat es refreda a -15 °C. L'éster precipita en forma de sòlid blanc, el qual es filtra i es renta amb etanol absolut fred i acetona freda. Posteriorment s'asseca el producte sota el buit.

La formació del producte es segueix per cromatografia de capa prima, utilitzant sílica com a fase estacionària i una mescla d'acetat d'etil/metanol (80:20) i 6 gotes d'amoniac com a fase mòbil. El revelat es realitza amb una solució de ninhidrina al 2% en etanol.

**Rendiment:** 0.463gr (2.258 mmols), 81%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3429 b.a. (st. NH), 2983 (st. CH), 1744 (st. C=O), 1593 ( $\delta$  NH), 1479 ( $\delta_s$   $\text{NH}_3^+$ ), 1242 (st. CN, st. CO).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1.35 (t, 3H, CH<sub>3</sub> etílic, J=3Hz), 3.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.11 (t, 1H, CH, J=3Hz), 4.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub> etílic).

**RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 300 K):**  $\delta$  (ppm)= 13 (CH<sub>3</sub> etílic), 37 (CH<sub>2</sub>), 49 (CH), 64 (CH<sub>2</sub> etílic), 166 (C=O).

**AE:** 13.58 %N, 28.83 %C, 6.60 %H. Calculat per C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Mm=205.11 gr/mol): 13.66 %N, 29.28 %C, 6.88 %H.

#### 3.2.2. Éster 2,4-diaminobutirat d'etil dihidroclorat. [Etdab· 2HCl].

Seguint el mateix procés sintètic de [Etdap·2HCl] (Apartat 3.2.1) s'escalfa a reflux una suspensió de l'àcid d,l-2,4-diaminobutíric dihidroclorat, (Hdab·2HCl) (0.5 gr, 2.617 mmols), en 50 mL d'etanol absolut durant 30 hores. L'éster resultant és higroscòpic i es filtra en condicions inertes.

**Rendiment:** 0.239gr (1.091 mmols), 42.5%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3424 b.a. (st. NH), 2972 (st. CH), 1735 (st. C=O), 1577 ( $\delta$  NH), 1516 ( $\delta_s$   $\text{NH}_3^+$ ), 1238 (st. CN, st. CO).

**RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1.32 (t, 3H,  $\text{CH}_3$  etílic,  $J=3\text{Hz}$ ), 2.34 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.25 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 4.23 (dd, 1H, CH,  $J=3\text{Hz}$ ), 4.36 (q, 2H,  $\text{CH}_2$  etílic,  $J=3\text{Hz}$ ).

**RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K):**  $\delta$  (ppm)= 16 ( $\text{CH}_3$  etílic), 31 ( $\text{CH}_2$ ), 39 ( $\text{NCH}_2$ ), 53 (CH), 66 ( $\text{CH}_2$  etílic), 188 (C=O).

**AE:** 13.02 %N, 31.98 %C, 7.49 %H. Calculat per  $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$  (Mm=219.14 gr/mol): 12.79 %N, 32.89 %C, 7.36 %H.

### 3.2.3. Cis-diclor-(2,3-diaminopropiònic)Pt (II). $[\text{PtCl}_2(\text{Hdap})]$ .

Es neutralitza una dissolució aquosa (6 mL) de Hdap-HCl (0.288 gr, 2.007 mmols) amb una dissolució (10 mL) de  $\text{NaHCO}_3$  (0.900gr, 10.71 mmols). La solució resultant s'addiciona a una dissolució (6 mL) de  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  (0.900 gr, 2.169 mmols) i s'agita a temperatura ambient durant 24h. La solució fosca que es forma s'acidifica amb HCl 3N fins a pH=2. El complex precipita en forma de sòlid groc. Es renta amb acetona i éter dietílic, i es recristalitza amb HCl 1N. Finalment, el complex es deixa assecat sota el buit.

**Rendiment:** 0.261 gr (0.711 mmols), 35.3%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3432 (st. OH), 3237-3201 (st. NH), 3125-2942 (st. CH), 1716 (st. C=O), 1585 ( $\delta$  NH), 1247-1192 (st. CN, st. CO).

**RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300K):**  $\delta$  (ppm)= 2.87 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.64 (m, 1H, CH).

**AE:** 7.28 %N, 9.87 %C, 2.54 %H, 18.06 %Cl. Calculat per  $\text{PtCl}_2\text{C}_3\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Mm=388.11 gr/mol): 7.22 %N, 9.28 %C, 2.60 %H, 18.27 %Cl.

**ESI-MS (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ ):**  $[\text{M}-\text{H}^+]^- = 369.2$  m/z

### 3.2.4. Cis-diclor-(2,4-diaminobutíric)Pt (II). $[\text{PtCl}_2(\text{Hdab})]$

Seguint el mateix procediment sintètic de  $[\text{PtCl}_2(\text{Hdap})]$  (Apartat 3.2.3.), es neutralitza una dissolució aquosa (8 mL) de Hdab-2HCl (0.309 gr, 1.584 mmols) amb una dissolució (10 mL) de  $\text{NaHCO}_3$  (0.945 gr, 11.25 mmols). La solució resultant s'addiciona a

una dissolució (6 mL) de  $K_2PtCl_4$  (0.945 gr, 2.277 mmols). El complex precipitat es recristal·litza amb HCl 1N.

**Rendiment:** 0.153 gr (0.399 mmols), 29.2%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $cm^{-1}$ )= 3447 (st. OH), 3239-3199 (st. NH), 3125-2940 (st. CH), 1717 (st. C=O), 1585 ( $\delta$  NH), 1215-1082 (st. CN, st. CO).

**RMN- $^1H$  ( $D_2O$ , 300K):**  $\delta$  (ppm)= 2.41 (m, 2H,  $CH_2$ ), 2.81 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 4.09 (tt, 1H, CH).

**AE:** 7.26 %N, 12.42 %C, 3.21 %H, 20.82 %Cl. Calculat per  $PtCl_2C_4H_{10}N_2O_2 \cdot 1/4 HCl$  (Mm=393.23 gr/mol): 7.12 %N, 12.22 %C, 2.63 %H, 20.28%Cl.

**ESI-MS (MeOH/ $H_2O$ ):**  $[M-H^+]^- = 383.2$  m/z

### 3.2.5. Cis-diclor-(2,3-diaminopropionat d'etil)Pt(II). $[PtCl_2(Etdap)]$ .

Una dissolució (4 mL) de  $NaHCO_3$  (0.125 gr, 1.48 mmols) s'addiciona a una dissolució aquosa (3 mL) de  $K_2PtCl_4$  (0.301 gr, 0.725 mmols). Es comprova que el pH resultant sigui 7-8. La mescla es barreja a temperatura ambient i seguidament s'afageix una dissolució aquosa (3 mL) de l'éster Etdap-2HCl (0.151 gr, 0.736 mmols). La mescla resultant s'agita a temperatura ambient durant 3-4 dies. El precipitat groc que es forma es filtra i es renta amb aigua, acetona i éter dietílic. Finalment, el complex es deixa asseca sota el buit.

**Rendiment:** 0.225 gr (0.565 mmols), 77.9%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $cm^{-1}$ )= 3249-3191 (st. NH), 3108(st. CH), 2989 (st. CH), 1740 (st. C=O), 1571 ( $\delta$  NH), 1459 ( $\delta$  ip NH), 1223-1089 (st. CN, st. CO).

**RMN- $^1H$  (DMSO, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1.33 (t, 3H,  $CH_3$  etílic,  $J = 3$ Hz), 2.8 (m, 2H,  $CH_2$ ), 3.7(m, 1H, CH), 4.3 (m, 2H,  $CH_2$  etílic), 5.5-6.55 (m, 4H, NH).

**RMN- $^{13}C$  (DMSO, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 13.9 ( $CH_3$ ), 48.34 ( $CH_2$ ), 60.2 (CH), 61.6 ( $CH_2$  etílic), 168 (C=O).

**AE:** 6.77 %N, 14.80 %C, 3.12 %H, 16.70 %Cl. Calculat per  $PtCl_2C_5H_{12}N_2O_2 \cdot H_2O$  (Mm=416.16 gr/mol): 6.73 %N, 14.43 %C, 3.39 %H, 17.04%Cl.

### 3.2.6. Cis-diclor-(2,4-diaminobutirat d'etil)Pt (II). [PtCl<sub>2</sub>(Etdab)].

Seguint el mateix procediment sintètic que [PtCl<sub>2</sub>(Etdap)] (Apartat 3.2.5., pàg. 80), una dissolució (3.5 mL) de NaHCO<sub>3</sub> (0.08 gr, 0.952 mmols) s'addiciona a una dissolució (2 mL) de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (0.200 gr, 0.481 mmols). Es comprova que el pH=7-8. La mescla es barreja a temperatura ambient i seguidament s'afageix una dissolució aquosa (3 mL) de l'éster Etdab·2HCl (0.101 gr, 0.456 mmols). La mescla resultant s'agita a temperatura ambient durant 3-4 dies. El precipitat que es forma es filtra i es renta amb aigua, acetona i éter dietílic.

**Rendiment:** 0.050 gr (0.121 mmols), 27%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3230-3188 (st. NH), 3119(st. CH), 2952 (st. CH), 1740 (st. C=O), 1586 ( $\delta$  NH), 1455 ( $\delta$  ip NH), 1224-1096 (st. CN, st. CO).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1.30 (t, 3H, CH<sub>3</sub> etílic, J= 3Hz), 1.7-2.0 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.5 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4.2 (q, 2H, CH<sub>2</sub> etílic), 5.2-5.4 (m, 4H, NH).

**RMN-<sup>13</sup>C (DMSO, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 14 (CH<sub>3</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 53.8 (CH), 61.7 (CH<sub>2</sub> etílic), 170 (C=O).

**AE:** 6.45 %N, 17.46 %C, 3.71 %H, 17.18 %Cl. Calculat per PtCl<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mm=412.21 gr/mol): 6.80 %N, 17.48 %C, 3.42 %H, 17.20 %Cl.

## 3.3. ASSAIGS BIOLÒGICS.

### 3.3.1. Estudi de la interacció Pt-DNA per dicroisme circular.

Es prepara una solució stock de cada compost a una concentració de 1 mg/mL en una barreja de DMSO:TE (50mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH=7.4) i amb una proporció màxima de DMSO del 2%. Les solucions es preparen just abans de la seva utilització.

La solució de DNA de Calf Thymus es prepara a una concentració de 20  $\mu$ g/mL en TE estèril i es guarda a 4 °C fins a la seva utilització. La concentració de la solució de DNA es verifica per espectroscopia ultraviolat-visible, mesurant l'absorbància a 260 nm.

La formació dels adductes complex-DNA es realitza per addició d'alíquotes de la solució stock del compost a un volum conegut de dissolució de DNA i deixant la mescla en

incubació durant 48 hores. La quantitat de complex afegit a la dissolució s'expressa com  $r_i$  (raó molar teòrica de compost per nucleòtid) i es calcula segons la fórmula:

$$r_i = \frac{m \cdot M_{\text{nucl}} \cdot A_m}{C \cdot M_r \cdot V}$$

$m$ = massa del compost utilitzat en la preparació de la solució stock, en  $\mu\text{g}$ .

$M_{\text{nucl}}$ = massa molecular mitja per nucleòtid, en g/mol.

$A_m$ = número d'àtoms metàl·lics en el compost. En el cas dels lligands es considera 1.

$C$ = concentració de la solució de DNA en  $\mu\text{g/mL}$ .

$M_r$ = massa molecular de cada compost en g/mol.

$V$ = volum final de la mostra en mL.

La concentració de DNA emprada ha estat de 20  $\mu\text{g/mL}$  i les raons molars dels complexos han estat de  $r_i = 0.10, 0.30, 0.50$ .

Cada mostra s'enregistra en un rang de longitud d'ona comprès entre 220-330 nm, a una velocitat de 50 nm/min. Els espectres dels complexos de platí es resten dels espectres dels adductes complex-DNA per obtenir la modificació que experimenta el DNA.

### 3.3.2. Estudi de la interacció Pt-GMP per RMN-<sup>1</sup>H.

Les reaccions s'han portat a terme en tubs de RMN utilitzant D<sub>2</sub>O com a dissolvent. S'incuba 5'-GMP amb cada un dels complexos de platí en una relació molar 4:1 a pH=7.0 i una temperatura de 37 °C. Per mantenir el pH s'utilitza un tampó 50 mM de KD<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Les concentracions absolutes dels complexos estudiats depenen de la solubilitat de cada un i varien entre 3.4 mM a 5 mM.

Les reaccions es segueixen enregistrant els espectres de RMN-<sup>1</sup>H en intervals de temps de 30 minuts durant 24 hores i de forma automàtica. La formació dels productes es quantifica utilitzant les intensitats relatives del senyal H8 de 5'-GMP.



### 3.3.3. Estudi de la interacció Pt-DNA per electroforesi en gel d'agarosa.

La preparació de les mostres per electroforesi en gel d'agarosa és similar a la descrita per dicromisme circular, però en aquest cas la concentració final de DNA (pBR322) és de 35 µg/mL, de manera que cada mostra ha de contenir 0.7 µg de DNA. El tampó utilitzat és també TE.

S'addicionen 4 µL de marcador de càrrega sobre 20 µL de les mostres de compost-DNA prèviament incubades a 37 °C durant 24 hores. La mescla es sotmet a electroforesi en gel d'agarosa al 1% en tampó TBE (45 mM tris-base [tris-(hidroximetil)aminometà], 45 mM àcid bòric, 1 mM EDTA; pH=8) i amb una dissolució de bromur d'etidi (10 µg/mL en TBE) a 0.7 V/cm durant 16 hores aproximadament.

L'experiment es realitza utilitzant com a control negatiu una mostra de DNA lliure del plàsmid pBR322, i com a controls positius es preparen mostres de cisplatí-DNA en les mateixes condicions i concentracions que les mostres preparades pels altres complexos.

### 3.3.4. Microscopia de forces atòmiques (AFM).

Es preparen dissolucions de concentració 1mg/mL (1.5-1.8 mg) dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab) i els corresponents lligands en tampó HEPES (40 mM HEPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH=7.4). Les dissolucions es dilueixen a una proporció 1:1000 en HEPES (volum final de 2000 µL), i es filtren a través de filtres FP030/3 de 0.2 µm (Scheicher & Schueell GmbH). Posteriorment, per cada mostra s'afegeix 1 µL de plàsmid pBR322 de concentració 0.25 µg/µL i 7 µL de droga a un volum total de 40 µL. Les mostres es deixen incubar a 37 °C durant 24 hores.

Per la visualització de les mostres, es col·loquen 3 µL de la solució de DNA o de la solució DNA-complex metàl·lic en una placa de mica (Ashville-Schoonmaker Mica Co., Newport News, VA). Després d'estar 5 minuts adsorbides a temperatura ambient, les mostres s'esbandeixen amb aigua desionitzada de 18 MΩ/cm procedent d'un sistema de purificació d'aigua Milli-Q (Millipore, Molshem, França). Seguidament, les mostres s'assequen amb un corrent d'argó per finalment realitzar les imatges de AFM.

### 3.3.5. Línies cel·lulars tumorals, condicions de cultiu i activitat citotòxica.

Les línies **A431** (línia de carcinoma epidermoid humà ATCC-American Type Culture Collection-N<sup>o</sup>CLR 1555) i **HeLa** (línia de carcinoma humà d'úter) han estat cultivades en medi complet DMEM suplementat amb 10% FBS, 2 mM L-glutamina i antibiòtic en flascons de cultiu estèrils. Els flascons s'han mantingut a 37 °C, 10% de CO<sub>2</sub> i 90% d'humitat en l'incubador. Les cèl·lules es deixen créixer fins que aconseguen un 90% de confluència, canviant el medi segons les necessitats de cultiu (cada 2-4 dies). Un cop aconseguida la monocapa cel·lular, les cèl·lules es tripsinitzen per realitzar nous subcultius. Es sembla entre 1:2 a 1:10 segons la proporció de subcultiu de la línia cel·lular. Es congela una alíquota amb nitrogen líquid.

La línia **HL60** (línia de leucèmia aguda promielocítica ATCC n<sup>o</sup> CLL-240) ha estat cultivada en RPMI -1640 suplementat amb 2 mM de L-glutamina i 10% FBS en flascons de cultiu estèrils. Els flascons es mantenen en l'incubador a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> i 95% d'humitat. La línia HL60 creix en suspensió i per aquest motiu no requereix tripsinització.

Per realitzar la tripsinització de les cèl·lules a tractar, s'aspira el medi de cultiu del flascó que conté les cèl·lules. Es renten les cèl·lules amb PBS per tal d'eliminar els residus del medi amb suero que queda en el cultiu i afavorir el procés de desanclatge de les cèl·lules a l'afegir EDTA. S'addiciona la tripsina i es manté el flascó en l'incubador fins a observar en el microscopi que les cèl·lules comencen a desenganxar-se (adopten una morfologia arrodonida i refringent). La reacció s'atura addicionant medi complet en el flascó. Es recull el medi dissolt amb les cèl·lules en un tub cònic estèril. Es centrifuga a 1500 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient i finalment s'elimina el sobrenedant, es resuspesa el sediment de les cèl·lules en sec i s'addiciona medi de cultiu nou.

Un cop les cèl·lules s'han tripsinitzat i centrifugat, es pot procedir al seu subcultiu o bé a la seva congelació. Per això, es desfà el sediment en sec i s'afegeix el medi de congelació (90% FBS i 10% DMSO) a 4°C. Tot el procés de congelació es realitza mantenint els tubs i el medi en gel, ja que el DMSO que conté el medi de congelació és tòxic per les cèl·lules a temperatures més elevades. Es recull aquest medi amb les cèl·lules i es guarda en criotubs en alíquotes de 1 mL. El procés de congelació cel·lular és

un procés seqüencial per tal d'evitar que les cèl·lules perdin vitalitat. Els criotubs es col·loquen en caixes de poliestirè a  $-20^{\circ}\text{C}$  durant una hora, després es passen a  $-80^{\circ}\text{C}$  durant un temps mínim de 12 hores i finalment els criotubs es guarden en nitrogen líquid a  $-196^{\circ}\text{C}$  on es poden mantenir durant anys.

El procés de descongelació de les cèl·lules, en canvi, ha de ser molt ràpid. Els criotubs es retiren del nitrogen líquid, s'incuben en un bany a  $37^{\circ}\text{C}$  i abans que el gel es desfaci completament, es transfereix el medi en un tub de centrifuga estèril de 15 mL. S'addiciona medi complet a  $4^{\circ}\text{C}$  agitant enèrgicament després d'afegir cada gota, per tal d'homogeneïtzar la barreja. Posteriorment s'introdueix medi de cultiu fins a un volum de 6 mL. Tot aquest procés és necessari per poder diluir lentament el DMSO que contenen les cèl·lules. Després es centrifuga a 1500 rpm durant 10 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$ , s'elimina el sobrenedant i el sediment de cèl·lules del desfet en sec. Finalment s'afegeix medi de cultiu i es cultiven les cèl·lules en un flascó nou.

Per realitzar el recompte cel·lular i així conèixer la viabilitat i el número de cèl·lules en qualsevol moment del cultiu, primer s'han de tripsinitzar les cèl·lules. Seguidament, es resuspesen les cèl·lules en 1 mL de medi, es pren una alíquota de 10  $\mu\text{L}$  i es col·loca en un microtub. S'addicionen 10  $\mu\text{L}$  de blau de tripà, es barreja i es dipositen 10  $\mu\text{L}$  de la barreja en un hemocitòmetre. Les cèl·lules vives s'observen com a esferes refringents i clares, mentre que les cèl·lules mortes s'observen opaques i tenyides de blau, ja que el colorant només pot penetrar en les cèl·lules mortes. Finalment es compta el total de cèl·lules de la zona W de l'hemocitòmetre sota el microscopi invertit, diferenciant les vives de les mortes. Les cèl·lules es converteixen en cèl·lules per mL multiplicant la xifra obtinguda per  $1 \cdot 10^4$  (factor de correcció de volum) i per 2 (factor de la dilució feta pel recompte). La viabilitat es calcula dividint el número de cèl·lules vives pel total de cèl·lules comptades i multiplicant per 100.

Per la realització dels assaigs de proliferació cel·lular, les cèl·lules s'han cultivat en plaques de 96 pouets en un volum de 100  $\mu\text{L}$  de medi. Per les línies cel·lulars adherents, com HeLa o A431, la densitat de cultiu ha estat de  $5 \cdot 10^3$  cèl·lules/pouet, i és necessari que les cèl·lules s'adhereixin durant 24 hores a l'incubador abans de realitzar els tractaments amb els complexos de platí. La línia HL-60 s'ha cultivat a una densitat

de  $10^4$  cèl·lules/pouet i les cèl·lules s'han deixat reposar en l'incubador 2-3 hores abans de realitzar els tractaments. Els tractaments amb els diferents complexos de platí s'han afegit en 100  $\mu$ L de medi a una concentració final en el pouet compresa entre 0 i 500  $\mu$ M.

Un cop realitzades les addicions, s'incuben les cèl·lules durant 24, 48 i 72 hores (segons el tractament) i un cop transcorregut el temps es prepara la mescla de marcatge dissolent el substrat en pols de sals de tetrazol en 2.5 mL d'activador preescalfat a 37°C (Kit EZ4U). S'afegeix en cada pouet 20  $\mu$ L de la solució per cada 200  $\mu$ L de medi de cultiu. Les plaques s'incuben a 37°C i 10% CO<sub>2</sub> durant un període de 2 o 3 hores, depenent de la capacitat metabòlica de les cèl·lules. Es mesura l'absorbància en un lector d'ELISA a 495 nm amb un filtre de referència de 620 nm que permet corregir els valors no específics de fons, causats per les restes cel·lulars. Aquest valor d'absorbància es corregeix amb l'absorbància de la mitja dels blancs, els quals estan constituïts únicament per medi. Tots els experiments de citotoxicitat han estat realitzats un mínim de tres vegades independents amb quadruplicats de les mostres.

### **3.3.6. Detecció d'apoptosi.**

#### **3.3.6.1. Citometria de flux.**

Es dipositen 2.5 mL de cultiu de la línia cel·lular HL60 en plaques de 6 pouets i amb una densitat de  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL. Es destinen 3 pouets pel control i els altres s'utilitzen pels diferents tractaments amb els complexos de platí a una concentració final de 15  $\mu$ M pel cisplatí i 150  $\mu$ M pel carboplatí, PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab). Les plaques s'incuben durant 48 hores.

Un cop realitzat el tractament, les cèl·lules es centrifuguen i es renten amb PBS per resuspendre-les posteriorment en 100  $\mu$ L de reactiu marcadore Annexina-V-FITC diluït en tampó HEPES a una concentració de  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL. Posteriorment, s'addicionen 2  $\mu$ L de iodur de propidi (PI) i les mostres s'incuben durant 15 minuts a temperatura ambient abans de realitzar l'anàlisi en el citòmetre de flux. La fluorescència FITC es mesura a 530-545 nm i la fluorescència dels complexos DNA-PI a 575-606 nm. En cada condició s'analitzen  $2 \cdot 10^4$  cèl·lules. Les porcions de cèl·lules en cada

quadrant del citograma s'expressen com a percentatges de la població total. El quadrant baix-esquerre dels citogrames mostra les cèl·lules viables An<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>. El quadrant baix-dreta mostra les cèl·lules que són apoptòtiques recents, les quals mantenen la integritat de la membrana plasmàtica (An<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>). El quadrant dalt-dreta mostra les cèl·lules que han perdut la integritat de la membrana plasmàtica i són An<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>, les quals corresponen a cèl·lules apoptòtiques tardanes o a cèl·lules necròtiques.

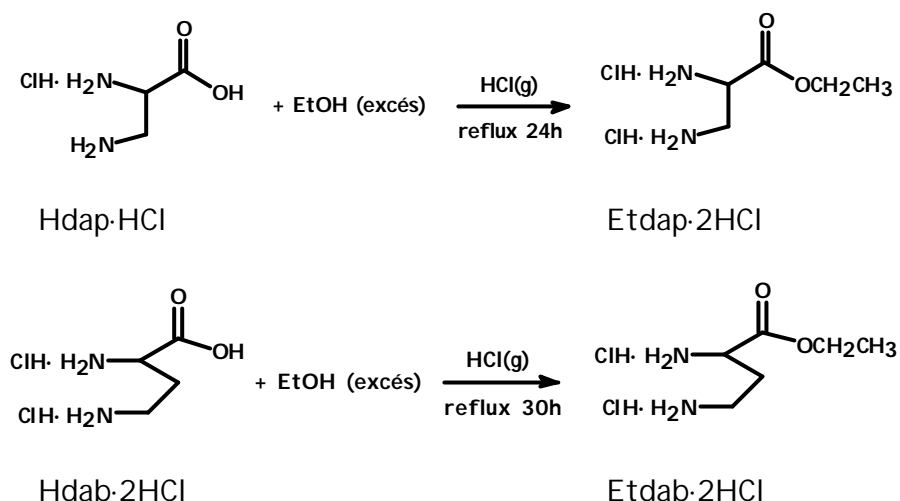
### 3.3.6.2. Electroforesi en gel d'agarosa.

Per l'anàlisi de la fragmentació del DNA, la qual és característica de la mort cel·lular per apoptosi, s'aïlla el DNA de les cèl·lules HL60. Aquestes cèl·lules, a una densitat de  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules/mL, es tracten amb una solució 15  $\mu$ M de cisplatí, una solució 150  $\mu$ M de carboplatí i dels complexos de platí sintetitzats a 37 °C durant 72 hores. Les cèl·lules tractades es centrifuguen durant 10 minuts, es renten amb PBS i es tornen a centrifugar. Seguidament, es ressuspenen i es digereixen tota una nit a 37°C en un tampó de lisis que conté 10 mM Tris-HCl, pH=8.0, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.6% SDS i 166  $\mu$ g/mL de proteinassa K. Després de la digestió, s'augmenta la concentració de NaCl a 1M i els tubs es sacsegen vigorosament. Les mostres es centrifuguen, els sobrenedants es recullen i es precipita el DNA. El DNA es ressuspena en 25  $\mu$ L de tampó TE. Posteriorment, s'addicionen 1.5 unitats de RNAsa de DNAses a les mostres i s'incuben a 37 °C durant 2 hores. Finalment, les mostres es sotmeten a electroforesi en un gel 1.5 % d'agarosa. El DNA es visualitza tenyint amb bromur d'etidi i es fotografia sota il·luminació UV.

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.

### 4.1. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DELS LLIGANDS I COMPLEXOS.

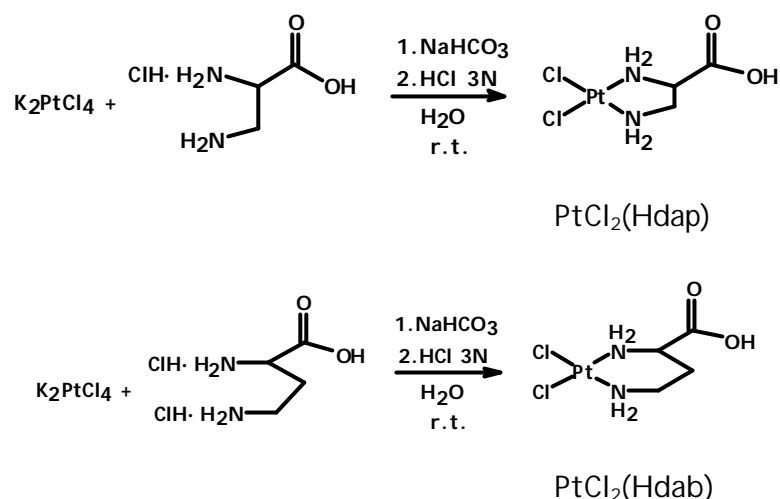
Els ésters **Etdap·2HCl** i **Etdab·2HCl** han estat sintetitzats segons el mètode descrit per González et al.<sup>19</sup> i es presenta en l'esquema següent:



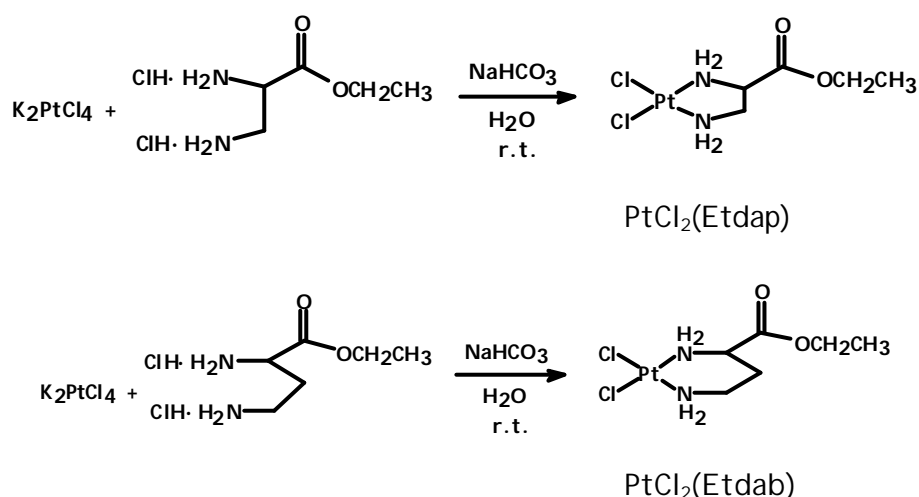
**Esquema 1. Esquema de la reacció d'esterificació dels lligands Hdap· HCl i Hdab· 2HCl.**

En aquest procés sintètic es fa reaccionar l'àcid diaminocarboxílic corresponent (Hdap·HCl i Hdab·2HCl) amb l'alcohol en excés (actuant de reactiu i dissolvent), escalfant a reflux i en presència d'un corrent continu de HCl gas. En assaigs previs es va poder comprovar que la presència d'àcid en quantitat catalítica o bé la utilització d'un clorur d'acetil per portar a terme l'esterificació no donava bons resultats.

Les síntesis dels complexos de platí dels àcids diaminocarboxílics i dels ésters etílics corresponents han estat realitzades de forma similar i es mostren esquemàticament en l'Esquema 2 i l'Esquema 3. En tots els casos, la reacció s'ha portat a terme en medi aquós i a temperatura ambient, fent reaccionar quantitats equimolars (1:1) de  $K_2PtCl_4$  i lligand. La utilització de la base  $NaHCO_3$  és necessària per la neutralització de les molècules de HCl dels hidroclorets i permetre que els àtoms de nitrogen puguin coordinar-se amb el metall.



Esquema 2. Esquema de la síntesi dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab).



Esquema 3. Esquema de la síntesi dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Etdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdab).

Els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) són parcialment solubles en aigua, mentre que els complexos dels corresponents ésters són insolubles en aigua i en molts dissolvents orgànics, exceptuant el DMSO i DMF.

L'espectroscopia d'infraroig (IR) ha permès identificar els grups funcionals de les molècules, mesurant l'excitació vibracional dels àtoms al voltant dels enllaços quan la molècula absorbeix l'energia de la regió d'infraroig. La posició de les bandes d'absorció

depèn del tipus de grups funcionals presents, i l'espectre en el seu conjunt representa una identificació única de la molècula.

En la Taula 1 es mostra les principals freqüències d'absorció dels lligands i complexos descrits en aquest capítol, i els diferents espectres es presenten en l'apartat de *material suplementari* (Apartat 7, pàg. 135). Una característica comuna dels espectres IR dels lligands és la presència d'una banda d'absorció ampla en l'interval de freqüència comprès entre 3400 i 2900  $\text{cm}^{-1}$ , corresponent a les vibracions st. OH (àcids) st.  $\text{NH}_3^+$  i st. CH alifàtic. Els ésters Etdap i Etdab presenten la banda d'absorció corresponent a la vibració st. C=O a una freqüència més alta (1744, 1735  $\text{cm}^{-1}$ ) que els àcids respectius (1623, 1730  $\text{cm}^{-1}$ ).<sup>20</sup> El senyal del carbonil de l'àcid Hdap·HCl apareix a una freqüència més baixa que el seu anàleg Hdab·2HCl ja que es troba en forma de zwitterió degut a la deslocalització del protó acídic cap a la posició del  $\text{NH}_2$  lliure. El diaminoàcid Hdab·2HCl té els dos grups amina protonats i el protó acídic no es pot deslocalitzar. Els lligands, al trobar-se en forma d'hidroclorur, presenten una banda d'absorció corresponent a la vibració de deformació de  $\text{NH}_3^+$  (1479, 1516  $\text{cm}^{-1}$ ), inexistent quan aquests estan coordinats al metall. Per altra banda, els complexos mostren les principals bandes d'absorció que tenen en comú amb els respectius lligands, modificant-se únicament les corresponents a les vibracions st. NH dels grups amina que estan directament coordinats al platí, tal i com es mostra en la figura següent:



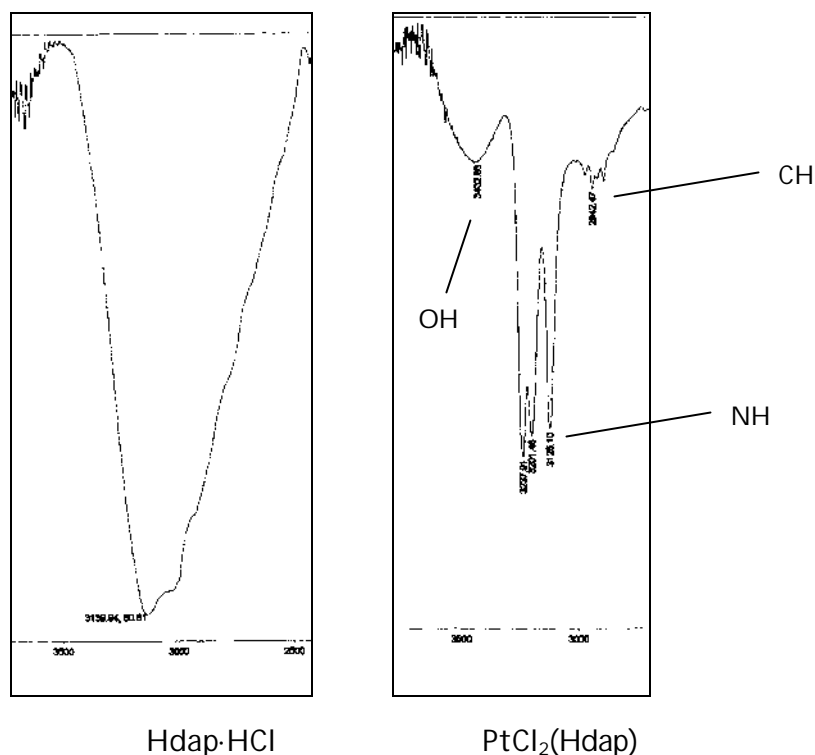


Figura 2. Zona espectral compresa entre entre 2900 i 3500  $\text{cm}^{-1}$  del lligand Hdap i el corresponent complex de Pt(II). El mateix fenomen s'observa en els altres casos.

Per aquest motiu, en la zona espectral compresa entre 3500 i 2900  $\text{cm}^{-1}$  no apareix una banda ampla i desestructurada, com passa en els lligands, sinó que s'observa una banda doble d'absorció en l'interval de freqüència 3250-3200  $\text{cm}^{-1}$  corresponent a la vibració st. as. dels grups  $\text{NH}_2$ , i una banda a 3120  $\text{cm}^{-1}$  aproximadament, corresponent al st. si. dels grups  $\text{NH}_2$ .

vibracions	Hdap·HCl	Hdap·2HCl	Etdap·2HCl	Etdab·2HCl	PtCl <sub>2</sub> (Hdap)	PtCl <sub>2</sub> (Hdap)	PtCl <sub>2</sub> (Etdap)	PtCl <sub>2</sub> (Etdab)
n (NH) t	3300- 2900	3500- 2600	3424-3100	3424-3100	3237- 3201	3239- 3199	3249-3191	3220-3188
n (CH) t	3300- 2900	3500- 2600	2983	2972	3125- 2942	3125- 2940	3108-2989	3119-2952
n (C=O) t	1623	1730	1744	1735	1716	1717	1740	1740
n (NH) d	1543	1581	1593	1577	1585	1585	1571	1586
n (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) d	1479	1510	1479	1516	-	-	-	-
n (CN,CO) t	1235	1237	1242	1238	1247-1192	1215-1082	1223-1089	1224-1096

Taula 1. Freqüències (en  $\text{cm}^{-1}$ ) de les bandes més significatives dels espectres IR dels lligands Hdap·HCl, Hdap·2HCl, Etdap·2HCl, Etdab·2HCl i els respectius complexos de Pt(II). (t)=tensió o stretching. (d)=deformació o bending.

En l'interval de freqüències estudiat (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ), no s'observen les vibracions de tensió  $\nu$  (M-N) ni les  $\nu$  (M-Cl) ja que aquestes apareixen generalment entre 400-200  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>20,21</sup>

### **Espectroscopia de ressonància magnètica nuclear de protó (RMN-<sup>1</sup>H)**

Els espectres de tots els lligands i dels complexos [PtCl<sub>2</sub>(Hdap)] i [PtCl<sub>2</sub>(Hdab)] s'han realitzat amb D<sub>2</sub>O com a dissolvent, mentre que els espectres dels complexos [PtCl<sub>2</sub>(Etdap)] i [PtCl<sub>2</sub>(Etdab)] s'han enregistrat utilitzant DMSO-d<sub>6</sub>. Els espectres corresponents es mostren en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (apartat 7, pàg. 135), i els valors dels desplaçaments químics es resumeixen en la Taula 2.

<i>d</i> (ppm)	<i>N-CH</i>	<i>N-CH<sub>2</sub></i>	<i>CH<sub>2</sub></i>	<i>CH<sub>2</sub>(Et.)</i>	<i>CH<sub>3</sub>(Et.)</i>	<i>NH</i>
<b>Hdap· HCl</b>	4.0 t	3.45 d				
<b>Hdab· 2HCl</b>	4.12 t	3.18-3.29 m	2.16-2.36 m			
<b>Etdap· 2HCl</b>	4.11 t	3.56 m		4.30 q	1.35 t	
<b>Etdab· 2HCl</b>	4.23 dd	3.25 m	2.34 m	4.36 q	1.32 t	
<b>PtCl<sub>2</sub>(Hdap)</b>	3.64 m	2.87 m				
<b>PtCl<sub>2</sub>(Hdab)</b>	4.09 tt	2.81 m	2.41 m			
<b>PtCl<sub>2</sub>(Etdap)</b>	3.7 m	2.8 m		4.3 m	1.33 t	5.5-6.55 m
<b>PtCl<sub>2</sub>(Etdab)</b>	-	3.5 m	1.7-2.0 m	4.2 q	1.30 t	5.2-5.4 m

**Taula 2. Valors dels desplaçaments químics de protó (ppm) dels diferents lligands i complexos. (d)= doblet, (t)= triplet, (q)= quadruplet, (dd)= doble doblet, (tt)= triple triplet, (m)= multiplet.**

Els espectres realitzats amb D<sub>2</sub>O no presenten els senyals corresponents al protons NH ni OH. Aquest fenomen és degut a l'intercanvi d'aquests protons per deuteris. Si l'intercanvi fos molt lent, els senyals d'aquests grups es podrien arribar a distingir. En general, si no hi ha l'intercanvi de deuteris, els senyals corresponents als protons dels grups amina solen aparèixer com a senyals amples a 0.5-5 ppm, tal i com succeeix en els espectres enregistrats en DMSO d<sub>6</sub>. L'acoblament H-N-C-H normalment no és observable perquè l'intercanvi dels protons NH és ràpid i, degut a la relaxació

quadrupolar del nucli de nitrogen, els acoblaments N-H no es poden veure encara que l'intercanvi dels protons amínics sigui lent. En molts casos la relaxació quadrupolar i l'intercanvi de protons NH no són prou ràpids per eliminar completament el fort acoblament N-H a través d'un enllaç. És llavors quan s'observen senyals amples dels protons NH.<sup>20</sup> Els diaminoésters i els respectius complexos presenten el triplet del CH<sub>3</sub> i el quadruplet del CH<sub>2</sub> etílics aproximadament a 1.3 i 4.3 ppm respectivament. Els espectres dels complexos presenten els senyals dels protons dels lligands modificant-se lleugerament els desplaçaments químics d'aquells protons propers al metall, degut a la coordinació amb el platí. En general, els protons que es troben més allunyats del centre metàl·lic presenten senyals amb bona resolució i amb un canvi de desplaçament químic mínim. Però els senyals dels protons no etílics apareixen bastant amples degut a la presència de diferents isòmers conformacionals, com a resultat de les diverses disposicions espacials de la molècula en dissolució. Quan el canvi conformacional es produeix lentament s'obtenen aquests senyals amples (Figura 3).

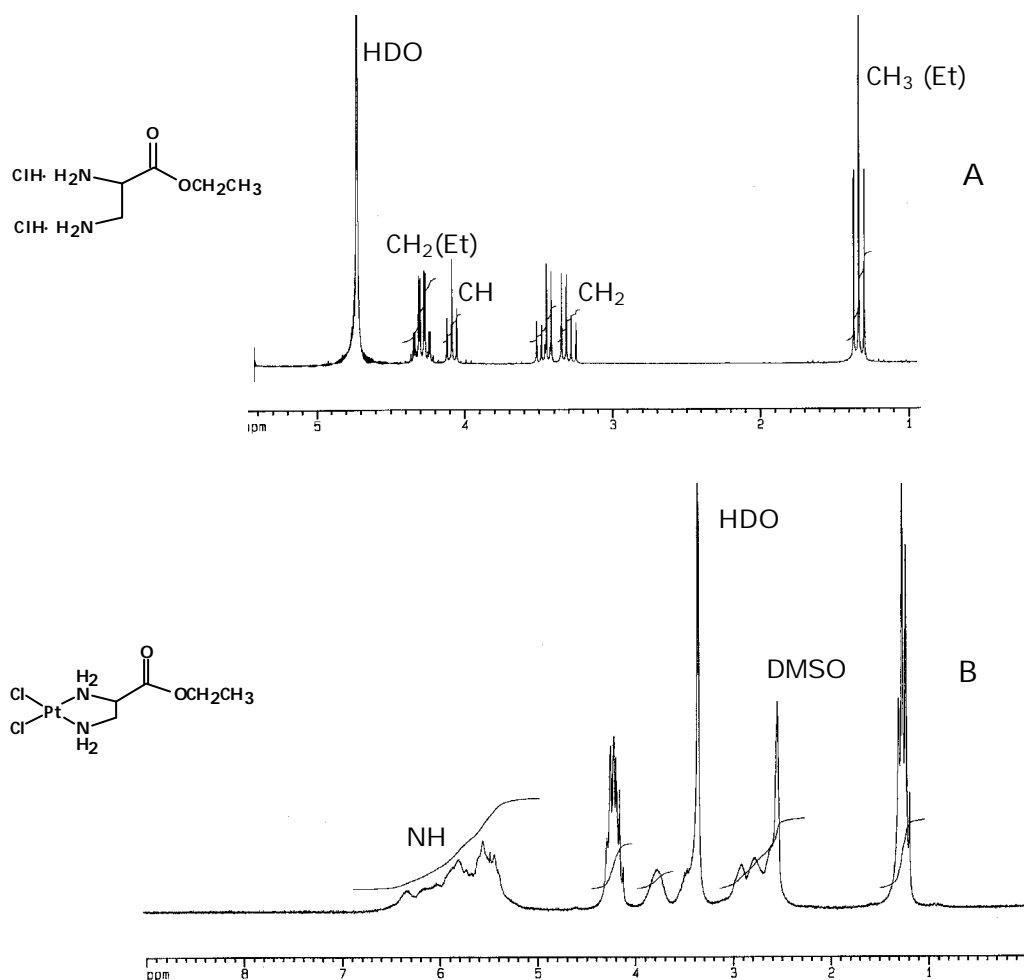


Figura 3. Espectres de RMN- $^1\text{H}$  del lligand Etdap (A) i del corresponent complex PtCl<sub>2</sub>(Etdap) (B) on es pot observar clarament l'efecte de l'eixamplament dels senyals quan es produeix la complexació.

A través d'experiments de RMN- $^1\text{H}$  a diferents temperatures es pot arribar a estudiar i aïllar el conformèmer més estable, ja que a baixes temperatures s'aconsegueix congelar l'equilibri conformacional (dinàmic a temperatura ambient) i d'aquesta manera es pot obtenir els senyals de les diferents espècies per separat. En aquests experiments, la solubilitat dels complexos hi té un paper molt important perquè es requereixen dissolvents que permetin arribar a temperatures molt baixes. En el cas dels complexos sintetitzats, aquests estudis no es poden realitzar ja que només són solubles en H<sub>2</sub>O i DMSO i no es pot baixar la temperatura per sota dels 0°C sense que el dissolvent no es congeli.

### Espectroscopia de ressonància magnètica nuclear de $^{13}\text{C}$

Els espectres de RMN- $^{13}\text{C}$  dels diferents lligands es mostren en l'apartat de *material suplementari* (apartat 7, pàg 135) i en la Taula 3 es presenten les principals assignacions. En el rang espectral comprès entre 30 i 55 ppm apareixen els senyals corresponents als carbonis no etílics, i a 15 ppm i a 65 ppm aproximadament apareixen els senyals corresponents al  $\text{CH}_3$  i  $\text{CH}_2$  etílics respectivament.

<i>d</i> (ppm)	<i>N-CH</i>	<i>N-CH<sub>2</sub></i>	<i>CH<sub>2</sub></i>	<i>CH<sub>2</sub> (Et.)</i>	<i>CH<sub>3</sub> (Et.)</i>	<i>C=O</i>
<b>Hdap· HCl</b>	51.48	40.00				172.25
<b>Hdab· 2HCl</b>	50.63	36.01	27.52			170.97
<b>Etdap· 2HCl</b>	49	37		64	13	166
<b>Etdab· 2HCl</b>	53	39	31	66	16	188

Taula 3. Valors dels desplaçaments químics de carboni (ppm) dels diferents lligands presentats en aquest capítol.

### Cromatografia líquida ESI-MS

L'espectre de masses obtingut és una representació del corrent produït pels ions dels diferents compostos, generats en la cambra de ionització, quan arriben al detector i la intensitat del pic és una indicació del número relatiu de ions. Els ions produïts per la fragmentació es separen segons la seva relació massa/càrrega ( $m/z$ ).

Els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  han estat mesurats utilitzant com a fase mòbil una mescla  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ . Al no observar-se cap senyal en la mesura de ions positius, s'ha realitzat un canvi de voltatge amb la finalitat de poder detectar espècies anióniques. En aquestes condicions s'han pogut detectar un grup de senyals a 369 i 383 corresponent a l'espècie aniónica resultat de la pèrdua del protó carboxílic del complex  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  respectivament. En aquests senyals cal tenir en compte que el platí presenta sis isòtops:  $^{190}\text{Pt}$ ,  $^{192}\text{Pt}$ ,  $^{194}\text{Pt}$ ,  $^{196}\text{Pt}$ ,  $^{198}\text{Pt}$ , i el clor presenta dos isòtops:  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ .

En ambdós casos s'ha realitzat la simulació teòrica de la distribució isotòpica d'aquests anions que coincideix amb l'obtinguda experimentalment, tal i com es mostra en la Figura 4.

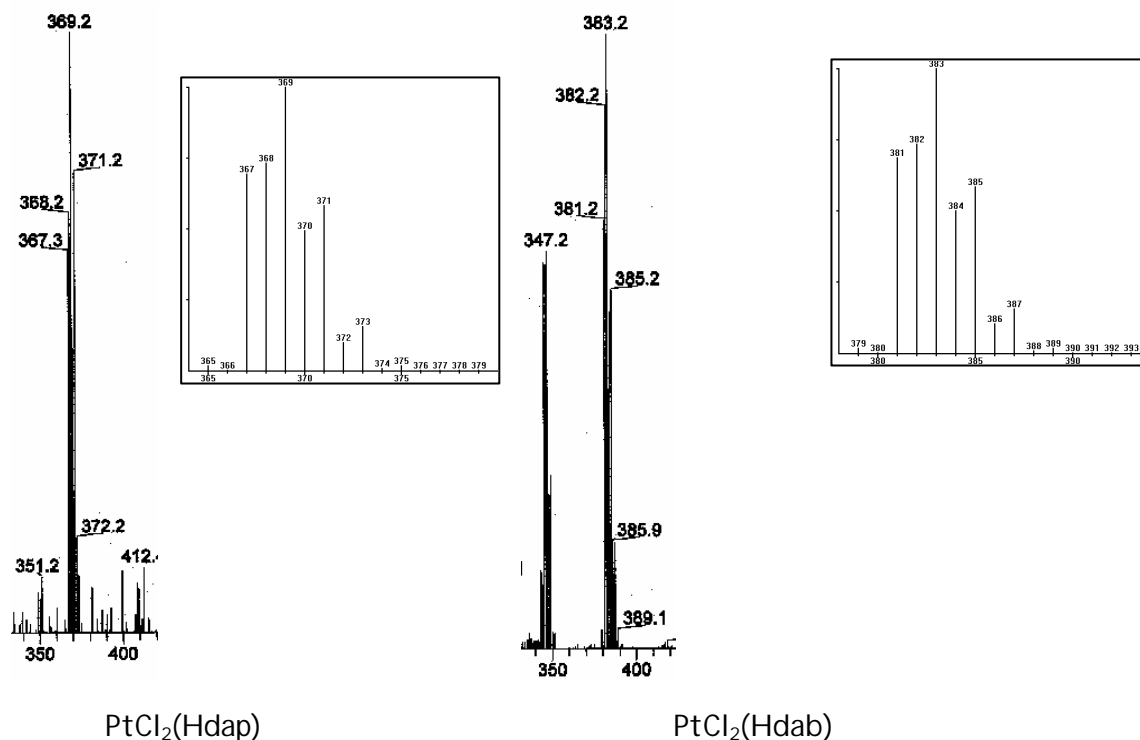


Figura 4. Espectres ESI-MS dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) on s'observa el pic de l'ió molecular amb la corresponent simulació teòrica.

La resta de senyals presents a valors de m/z més baixos corresponen a les diverses fragmentacions que pateixen els complexos.

Els complexos PtCl<sub>2</sub>(Etdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdab) no s'han pogut mesurar a través d'aquesta tècnica degut a problemes de solubilització.

## 4.2. ASSAIGS BIOLÒGICS.

### 4.2.1. Estudi de la interacció Pt-DNA per dicroisme circular.

L'espectre de dicroisme circular, on es representa l'el·lipticitat en front de la longitud d'ona, dona informació a nivell qualitatiu sobre els canvis conformacionals induïts pels compostos en l'estructura secundària del DNA.

Per tal d'assegurar que els complexos de platí interaccionen amb el DNA i modifiquen la seva estructura secundària s'ha enregistrat l'espectre de dicroisme circular de DNA-Calf Thymus incubat durant 48 h a 37 °C amb els lligands lliures (Hdap,

Hdap, Etdap i Etdab) i els respectius complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab), PtCl<sub>2</sub>(Etdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdab), a tres raons molars diferents de compost ( $r_i = 0.1, 0.3, 0.5$ ). Aquests espectres són una representació de la variació de l'el·lipticitat ( $\theta$ ) en funció de la longitud d'ona ( $\lambda$ ).  $\theta$  es defineix com:

$$\Theta = \frac{\Delta \epsilon}{10 \times c \times l}$$

On:

$\theta$  = graus x cm<sup>2</sup> x dmol<sup>-1</sup>

$\Delta \epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$ , en mgraus.

C= molaritat de la dissolució

l= camí òptic en cm.

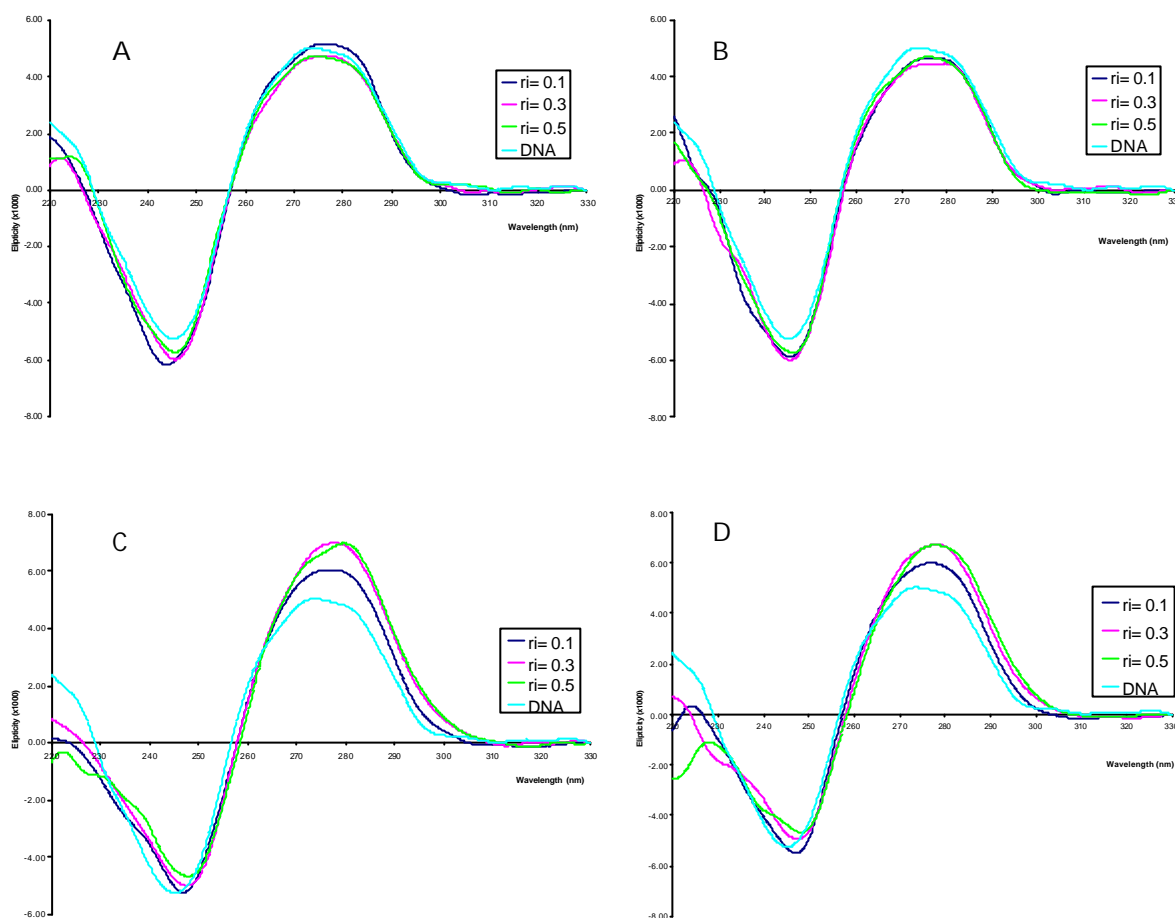
Els espectres obtinguts es mostren en la Figura 5 i Figura 6 i els valors màxims i mínims d'el·lipticitat i longitud d'ona obtinguts per cada raó molar es presenten en la Taula 4. En tots ells es pot observar una banda positiva entre 310 i 260 nm, i una banda negativa entre 260 i 220 nm.

L'espectre del lligand s'enregistra en cada cas per tal de comprovar si aquest interacciona covalentment amb el DNA i per tant si influeix en els canvis observats en els espectres del DNA incubat amb els complexos. Com es pot observar en la Figura 5 i Figura 6 i les dades presentades en la Taula 4, en general els lligands lliures no presenten cap efecte significatiu en l'espectre del DNA-Calf Thymus. No es modifica de forma destacable ni el valor de la longitud d'ona màxima ni el valor de l'el·lipticitat, indicant que el lligand no s'enllaça covalentment al DNA i no modifica la seva estructura.

En canvi, els complexos de platí PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) (Figura 5) provoquen modificacions significatives en l'espectre del DNA-Calf Thymus que poden ser comparables amb les provocades pel cisplatí.<sup>22</sup> En el cas del cisplatí, a concentracions moderades-baixes, a l'augmentar la raó molar de metall (ri) es produeix un increment

gradual de l'el·lipticitat de la banda positiva i una disminució de l'el·lipticitat de la banda negativa, a més d'un desplaçament a longituds d'ona més grans (batocròmic) del màxim i del mínim. En els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab), l'el·lipticitat de la banda positiva augmenta a mesura que s'incrementa el valor de r<sub>i</sub> i els valors de l'el·lipticitat de la banda negativa disminueixen. També s'observa un augment dels valors de  $\lambda_{\max}$  i  $\lambda_{\min}$ . L'augment del valor de l'el·lipticitat de la banda positiva del DNA s'atribueix a la formació d'enllaços de tipus cis-bifuncionals i és conseqüència de distorsions no desnaturalitzants en la doble hèlix provocades per l'obertura de l'hèlix del DNA i pel canvi de l'empaquetament de les bases en la formació d'adductes intra-cadena amb el DNA.<sup>5,23,24</sup>





**Figura 5.** Espectres de DC del DNA-Calf Thymus incubat amb els lligands lliures Hdap i Hdab (figures A i B respectivament) i amb els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  (figures C i D respectivament) a diferents valors de  $r_1$  (0.1, 0.3 i 0.5)

En els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Etdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$  (Figura 6) s'observa un desplaçament batocròmic de  $\lambda_{\text{max}}$  i els valors de  $\theta_{\text{max}}$  són superiors en tots els casos al corresponent al DNA lliure. A diferència dels complexos diaminocarboxílics, els derivats etílics presenten una disminució de  $\theta_{\text{max}}$  a mesura que augmenta el valor de  $r_1$ .

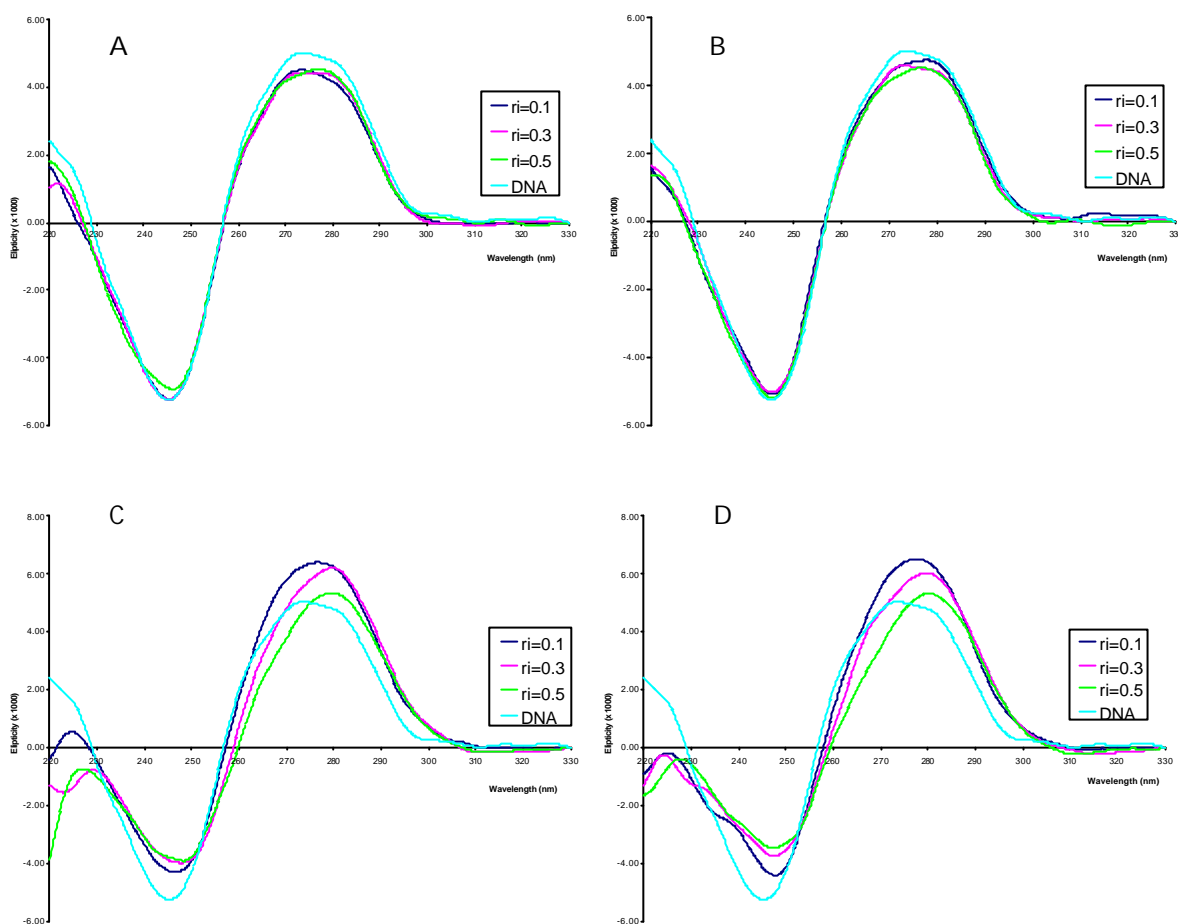


Figura 6. Espectres de DC del DNA-Calf Thymus incubat amb els lligands lliures Etdap i Etdab (figures A i B respectivament) i amb els complexos  $PtCl_2(Etdap)$  i  $PtCl_2(Etdab)$  (figures C i D respectivament) a diferents valors de  $r_i$  (0.1, 0.3 i 0.5)

El desplaçament batocròmic de la longitud d'ona i la disminució del valor de  $\theta_{max}$  i  $\theta_{min}$  a mesura que augmenta la raó molar de complex s'atribueix a un canvi de la conformació del DNA de la forma B a la forma C degut a un desplegament de l'hèlix, de forma similar al transplati.<sup>22,23,25,26</sup>

DNA				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
-	273.6	$5.03 \cdot 10^3$	245.2	$-5.25 \cdot 10^3$
Hdap· HCl				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	276.2	$5.19 \cdot 10^3$	243.8	$-6.18 \cdot 10^3$
0.3	276.6	$4.76 \cdot 10^3$	245.6	$-5.99 \cdot 10^3$
0.5	274.6	$4.74 \cdot 10^3$	245.6	$-5.73 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (Hdap)				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	276.8	$6.05 \cdot 10^3$	246.8	$-5.21 \cdot 10^3$
0.3	277.6	$6.98 \cdot 10^3$	247.4	$-4.99 \cdot 10^3$
0.5	279.6	$6.97 \cdot 10^3$	247.8	$-4.66 \cdot 10^3$
Hdab· 2HCl				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	276.4	$4.63 \cdot 10^3$	245.6	$-5.89 \cdot 10^3$
0.3	279.6	$4.47 \cdot 10^3$	245.6	$-6.00 \cdot 10^3$
0.5	275.6	$4.70 \cdot 10^3$	246	$-5.73 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (Hdab)				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	276.8	$6.00 \cdot 10^3$	247.2	$-5.52 \cdot 10^3$
0.3	278.2	$6.74 \cdot 10^3$	247.4	$-4.95 \cdot 10^3$
0.5	277.8	$6.71 \cdot 10^3$	248.2	$-4.67 \cdot 10^3$
Etdap· 2HCl				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	273.4	$4.51 \cdot 10^3$	245.4	$-5.23 \cdot 10^3$
0.3	275.6	$4.42 \cdot 10^3$	245.4	$-5.23 \cdot 10^3$
0.5	277	$4.53 \cdot 10^3$	246.2	$-4.93 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (Etdap)				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	276.6	$6.39 \cdot 10^3$	246.6	$-4.29 \cdot 10^3$
0.3	279.8	$6.20 \cdot 10^3$	247.6	$-3.98 \cdot 10^3$
0.5	279.6	$5.33 \cdot 10^3$	248.2	$-3.90 \cdot 10^3$
Etdab· 2HCl				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	277.8	$4.75 \cdot 10^3$	245.6	$-5.08 \cdot 10^3$
0.3	273.2	$4.60 \cdot 10^3$	245.4	$-5.03 \cdot 10^3$
0.5	276.8	$4.53 \cdot 10^3$	245.4	$-5.20 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (Etdab)				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	277.6	$6.52 \cdot 10^3$	247.8	$-4.40 \cdot 10^3$
0.3	279.8	$6.01 \cdot 10^3$	247.6	$-3.74 \cdot 10^3$
0.5	280.2	$5.32 \cdot 10^3$	247.2	$-3.46 \cdot 10^3$

Taula 4. Valors de  $l_{\max}$ ,  $l_{\min}$ ,  $q_{\max}$ ,  $q_{\min}$  obtinguts pels espectres de DC dels diferents lligands i complexos i comparació amb els respectius valors del DNA sense tractar. Els valors de  $l$  s'expressen en nm i els valors de  $q$  en graus  $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ .

Amb els resultats obtinguts queda demostrat que tots quatre complexos modifiquen l'estructura secundària del DNA, però l'efecte que provoquen els complexos amb els lligands diaminocarboxílics és diferent al provocat pels derivats etílics. Els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) estableixen la forma B del DNA en les 48 h d'incubació, segurament degut a una millor compactació de la doble hèlix, mentre que els derivats etílics no aconseguen aquesta estabilització. Malgrat que els dos tipus de complexos presenten una estructura similar, la interacció del grup carboxilat amb les bases del DNA segurament és diferent a la interacció del grup éster, explicant la diferent distorsió de la doble hèlix que es genera en cada situació.

En tots els casos, els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab), PtCl<sub>2</sub>(Etdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdab) presenten un tipus d'estructura similar a la del cisplatí, amb dos clorurs en cis i un lligand bidentat, en comptes de dos grups NH<sub>3</sub>, i és adequada per la interacció covalent amb la doble hèlix del DNA. Però, tal i com s'ha demostrat, l'estructura del lligand influeix clarament en el tipus d'interacció i modificació de l'estructura secundària de l'àcid nucleic generada per aquesta unió covalent.

#### 4.2.2. Estudi de la interacció Pt-GMP per RMN-<sup>1</sup>H.

Els estudis realitzats sobre el mecanisme d'acció del cisplatí i els seus derivats sobre el DNA posen de manifest la preferència de coordinació del metall per les bases púriques. Concretament, l'adducte que es forma més freqüentment és aquell en el que l'àtom de platí s'enllaça als N7 de dues guanines adjacents.<sup>10,16,17</sup> Aquesta preferència a la formació d'adductes a través del N7 de la guanina és deguda principalment a la basicitat d'aquest N7 (Figura 7).

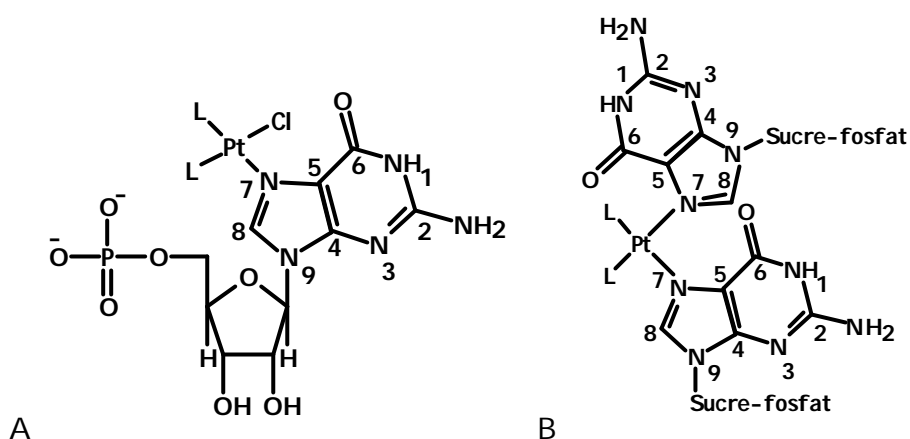
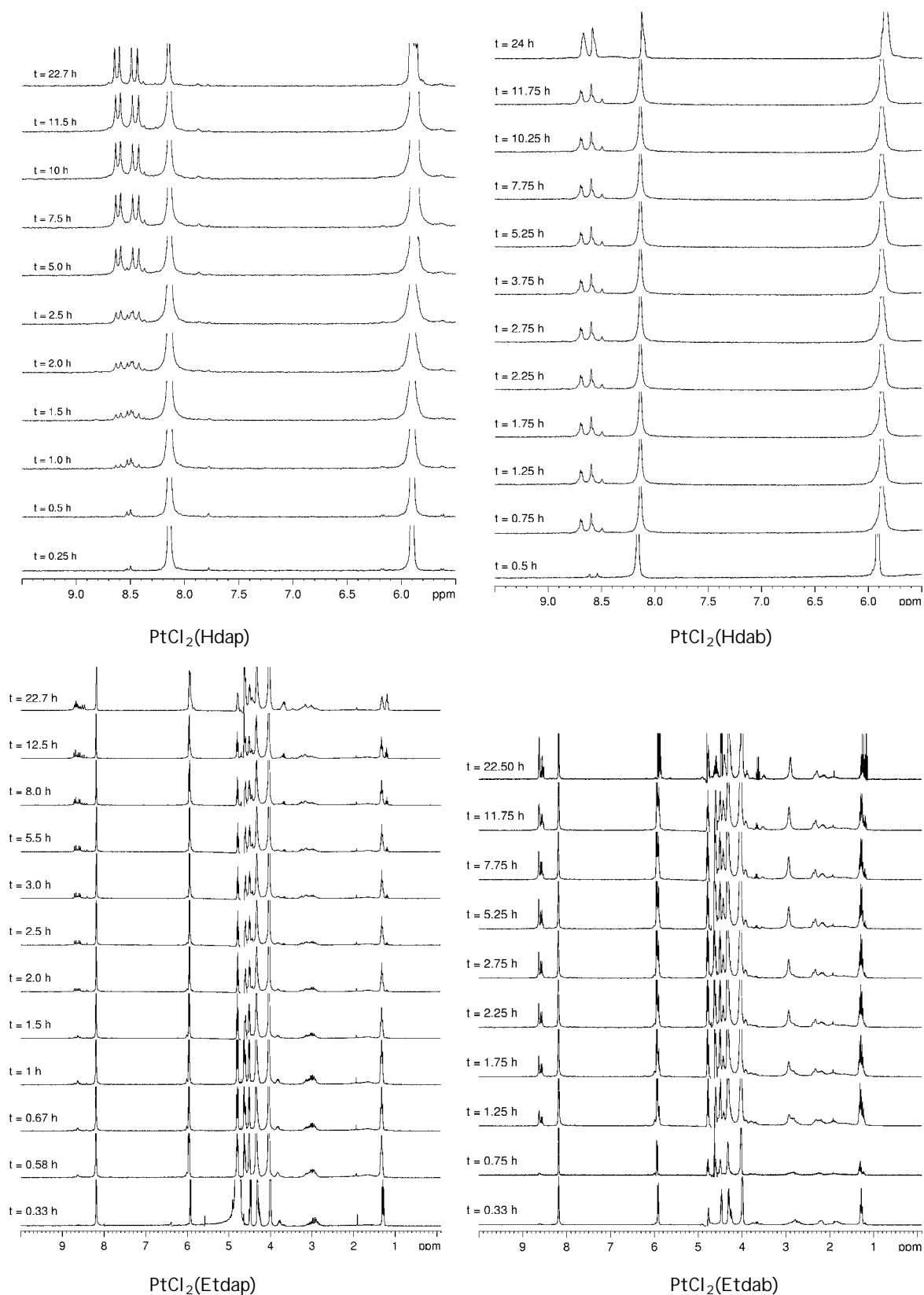
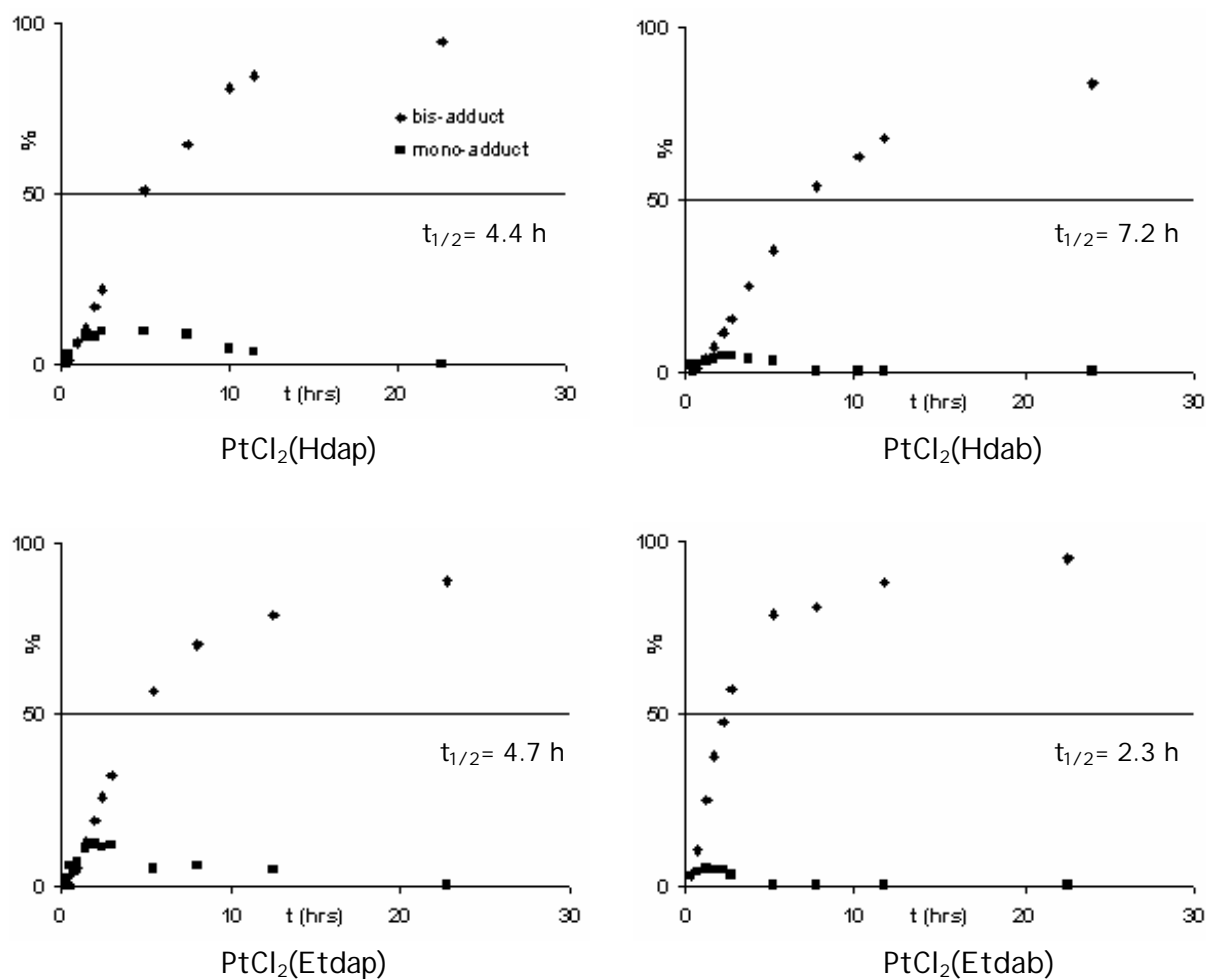


Figura 7. Estructura del mono-adducte (A) i bis-adducte (B) Pt-5'GMP

El mecanisme d'acció de les drogues antitumorals de platí es pot interpretar en termes d'una interacció bifuncional amb el DNA de les cèl·lules tumorals (per exemple amb els N7 de les guanines), donant lloc a la inhibició de la replicació del DNA. L'estudi de la interacció dels complexos antitumorals de platí amb nucleòsids o nucleòtids facilita la determinació del mecanisme d'actuació.<sup>27,28</sup> En aquest sentit, s'ha estudiat el transcurs de la reacció dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab), PtCl<sub>2</sub>(Etdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdab) amb 5'-GMP a través de l'espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 8) i els resultats obtinguts del percentatge d'adducte format en funció del temps es mostren en la Figura 9. Les reaccions s'han seguit controlant la disminució de la intensitat del senyal corresponent al H8 de la 5'-GMP lliure i l'aparició dels senyals corresponents al H8 de la 5'-GMP unida al platí. En tots els casos s'ha observat el desplaçament cap a valors de  $\delta$  (ppm) més elevats del H8 de la 5'-GMP (8.1 ppm pel H8 de la 5'-GMP lliure; 8.5-8.6 ppm pel H8 de la 5'-GMP unida al platí). Aquest fet indica que, en tots els complexos, el punt de coordinació de la 5'-GMP és la posició N7. Els temps de vida mitja determinats ( $t_{1/2}$ ) corresponen al temps que tarda el 50% de la quantitat de complex lliure a formar els bis-adductes.



**Figura 8.** Espectres de RMN- $^1\text{H}$  a diferents temps de mesura obtinguts de l'estudi de la interacció dels complexos de Pt(II) amb 5'-GMP. Els espectres s'han enregistrat a  $37^\circ\text{C}$ , a  $\text{pH}=7$  i utilitzant  $\text{D}_2\text{O}$  amb TMS.



**Figura 9.** Representació gràfica de l'evolució en el temps de la interacció dels complexos amb 5'-GMP, mostrant clarament la formació de l'adducte monofuncional i el bifuncional. Els temps de vida mitja ( $t_{1/2}$ ) de la formació dels adductes bifuncionals s'han determinat gràficament.

Amb els resultats obtinguts, es fa evident que els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdap) tenen uns temps de vida mitja similars ( $t_{1/2}$ =4.4 h i 4.7 h, respectivament), mentre que el complex PtCl<sub>2</sub>(Hdab) presenta clarament un temps de vida mitja més gran que PtCl<sub>2</sub>(Etdab) ( $t_{1/2}$ = 7.2h i 2.3 h, respectivament). Per tant, el complex PtCl<sub>2</sub>(Etdab) presenta una reacció amb 5'-GMP bastant ràpida ( $t_{1/2}$ = 2.3h), mentre que el seu anàleg PtCl<sub>2</sub>(Hdab) reacciona molt lentament. En tots els casos, es forma una petita quantitat del mono-adducte i va disminuint durant les deu primeres hores. No obstant, la quantitat i el temps de durada del mono-adducte format pels complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdap)

és més gran que en el cas dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$ . La reacció es completa transcorregudes 24 hores.

La reacció dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  amb la 5'-GMP dóna lloc a l'aparició de 4 senyals nous corresponents a H8 resultat de la formació dels bis-adductes amb GMP. Les diferents formes possibles que tenen els compostos per enllaçar-se a la 5'-GMP són químicament diferents, degut a la naturalesa no simètrica dels complexos de platí, i haurien de donar lloc a 2 senyals diferents corresponents al H8 en l'espectre de RMN. Malgrat això, la formació de l'adducte entre 5'-GMP i els complexos racèmics de platí dóna lloc a 2 diasteroisòmers, cada un dels quals dóna lloc a 2 senyals H8 per cada punt d'enllaç, proporcionant un total de 4 senyals. En el cas del complex  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$ , els 4 senyals es superposen lleugerament.

Quan s'ha seguit la reacció dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Etdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$  amb la 5'-GMP, primer apareixen 4 senyals nous corresponents al H8. No obstant, després de varies hores un segon grup de 4 senyals de H8 apareix, donant lloc a un total de 8 senyals nous. En el cas de  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$  els 8 senyals nous es superposen lleugerament. Augmentant la temperatura a 54°C no s'observa cap alteració en l'amplada i nombre dels senyals, indicant que els adductes bis-5'-GMP estan rotant lliurement. Conseqüentment, l'aparició de 8 senyals nous en comptes de 4 degut a la presència de rotàmers es pot segurament excloure. Al mateix temps i velocitat en què apareixien el segon grup de 4 senyals, un segon triplet corresponent al  $\text{CH}_3$  de l'éster etílic apareix a camp més alt que el senyal original. El fet que el desplaçament del triplet sigui a camp alt i la velocitat sigui molt més lenta que la velocitat de formació de l'adducte permet considerar que els ésters etílics s'estan hidrolitzant durant la reacció. Per tal de corroborar aquest fenomen, s'han estudiat els espectres de RMN de les solucions dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Etdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$  (pH=7.0, 37°C) sense 5'-GMP durant 24h (Figura 10).



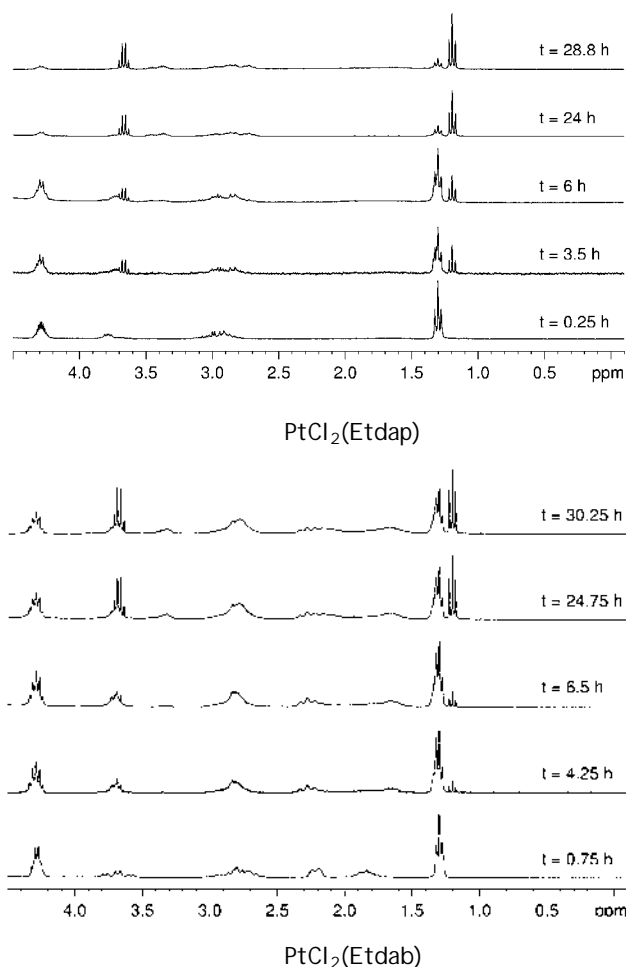


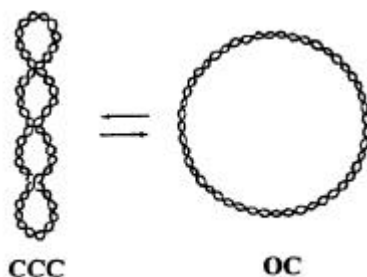
Figura 10. Espectres de RMN-<sup>1</sup>H dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Etdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdab) en el rang de 0-4.5 ppm, on s'observa la hidròlisi dels grups éster al llarg del temps. Els espectres s'han enregistrat a 37°C, pH=7 i utilitzant D<sub>2</sub>O amb TMS.

Altres cops s'observa el desplaçament del triplet cap a camp alt. A més, sense la superposició causada per 5'-GMP, el quartet originat pel CH<sub>2</sub> de l'éster etílic s'observa també desplaçat a camp alt.

#### 4.2.3. Estudi de la interacció Pt-DNA per electroforesi en gel d'agarosa.

El DNA de plasmidi **pBR322** (de procedència bacteriana) utilitzat és circular i pot presentar una estructura terciària definida o superenrotllament. Aquest DNA té un tamany fixe de 4.36 kbp i les molècules es poden trobar en dues formes: forma circular covalentment tancada (**CCC**) que presenta un determinat número de voltes

superhelicoidals, i la forma circular oberta (OC) que no presenta superenrotllament (Figura 11).<sup>29</sup>



**Figura 11.** Representació de les dues conformacions que presenta el plasmidi de DNA pBR322, la circular covalentment tancada (CCC) i la circular oberta (OC).

Per unes condicions experimentals determinades, la velocitat de migració de les dues formes és proporcional al número de voltes superhelicoidals. De manera que, com més voltes, més compacta és l'estructura, i augmenta la mobilitat a través del gel.

En general, els complexos metàl·lics poden provocar una disminució del superenrotllament o una compactació del DNA de plasmidi.<sup>30,31,32,33</sup> En aquests casos, cal esperar una variació en la mobilitat electroforètica de les diferents formes, i per tant, l'electroforesi permet mostrar les modificacions en l'estructura terciària del DNA provocades pels compostos.

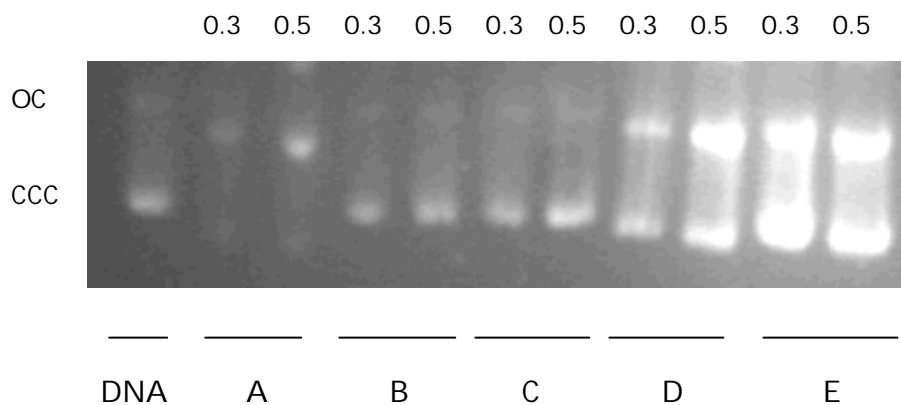
Amb aquesta finalitat, s'han estudiat els canvis electroforètics del DNA pBR322 causats pels lligands Hdap i Hdab i els corresponents complexos de platí (II) després de 24 h d'incubació amb el plasmidi a 37 °C, i s'han comparat amb dos controls:

- a. Control negatiu: plasmidi sol.
- b. Control positiu: plasmidi incubat amb el cisplatí a les mateixes raons molars que els altres compostos ( $r_i = 0.3, 0.5$ ).

El cisplatí s'utilitza com a control positiu perquè les modificacions que causa ja són conegudes.<sup>34</sup> Se sap que per raons molars de complex moderades provoca un retard en la mobilitat electroforètica de la forma CCC degut a una disminució en el número de voltes superhelicoidals, i augmenta lleugerament la mobilitat de la forma OC com a

conseqüència d'una certa compactació de la molècula (formació de microplegaments en la doble hèlix).

Els resultats obtinguts de l'anàlisi electroforètic del DNA tractat amb els lligands Hdap·HCl i Hdab·2HCl i els respectius complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) es mostren en la Figura 12.



**Figura 12.** Patró de mobilitat electroforètica del DNA de pBR322 natiu i incubat amb els compostos, essent A=cisplatí, B=Hdap·HCl, C=Hdab·2HCl, D=PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i E=PtCl<sub>2</sub>(Hdab). El senyal superior correspon a la forma OC del DNA, i el senyal inferior a la forma CCC.

En la imatge del patró de mobilitat es pot veure l'efecte del cisplatí a concentracions moderades, provocant un retard de la mobilitat electroforètica de la forma CCC i un lleuger augment de la mobilitat de la forma OC, de manera que s'observa només un sol senyal.

Com es pot observar, els lligands Hdap·HCl i Hdab·2HCl no modifiquen de forma significativa la mobilitat electroforètica ni de la forma OC ni de la forma CCC. Això pot suggerir que, o bé els lligands no tenen prou capacitat per modificar l'estructura terciària del DNA, o bé que els canvis que produeixen no són prou importants com per detectar-se per electroforesi. En els estudis de dicroisme circular s'havia apreciat que aquests lligands no modificaven l'estructura secundària de la doble hèlix degut a la poca capacitat d'interaccionar covalentment amb el DNA. Aquesta manca d'interacció podria explicar els resultats observats en el patró electroforètic. Els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i

PtCl<sub>2</sub>(Hdap), en canvi, mostren un comportament diferent al dels respectius lligands. En aquests complexos s'observa un lleuger avanç de la forma CCC i de la OC, que es pot interpretar com un augment de la compactació del DNA, ja que a l'augmentar el grau d'enrotllament, les molècules de plàsmid poden circular més fàcilment a través dels porus del gel.

Tot i això, per tal de comprovar que els resultats observats en els complexos són deguts a l'efecte que aquests produeixen sobre l'estructura del DNA i no a l'estat en què es troba el DNA, s'han enregistrat les imatges de AFM d'aquests compostos i dels respectius lligands, incubats amb el plasmidi en les mateixes condicions emprades que en electroforesi.

#### **4.2.4. Imatges de microscopia de forces atòmiques.**

S'ha visualitzat l'efecte que els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) i els corresponents lligands produeixen sobre l'estructura del DNA a través de AFM, utilitzant DNA de plasmidi pBR322, el mateix que s'ha emprat en l'estudi electroforètic.

Com s'ha comentat anteriorment, els complexos metàl·lics poden induir una variació del superenrotllament i una compactació del DNA de plasmidi, fenòmens que queden reflexats en les imatges de AFM.

Els canvis estructurals provocats per la interacció dels complexos de platí amb el DNA transcorregudes 24 hores d'incubació a 37 °C es mostren en la Figura 13. En cada cas, s'ha comparat amb l'efecte provocat pels lligands i el DNA lliure.

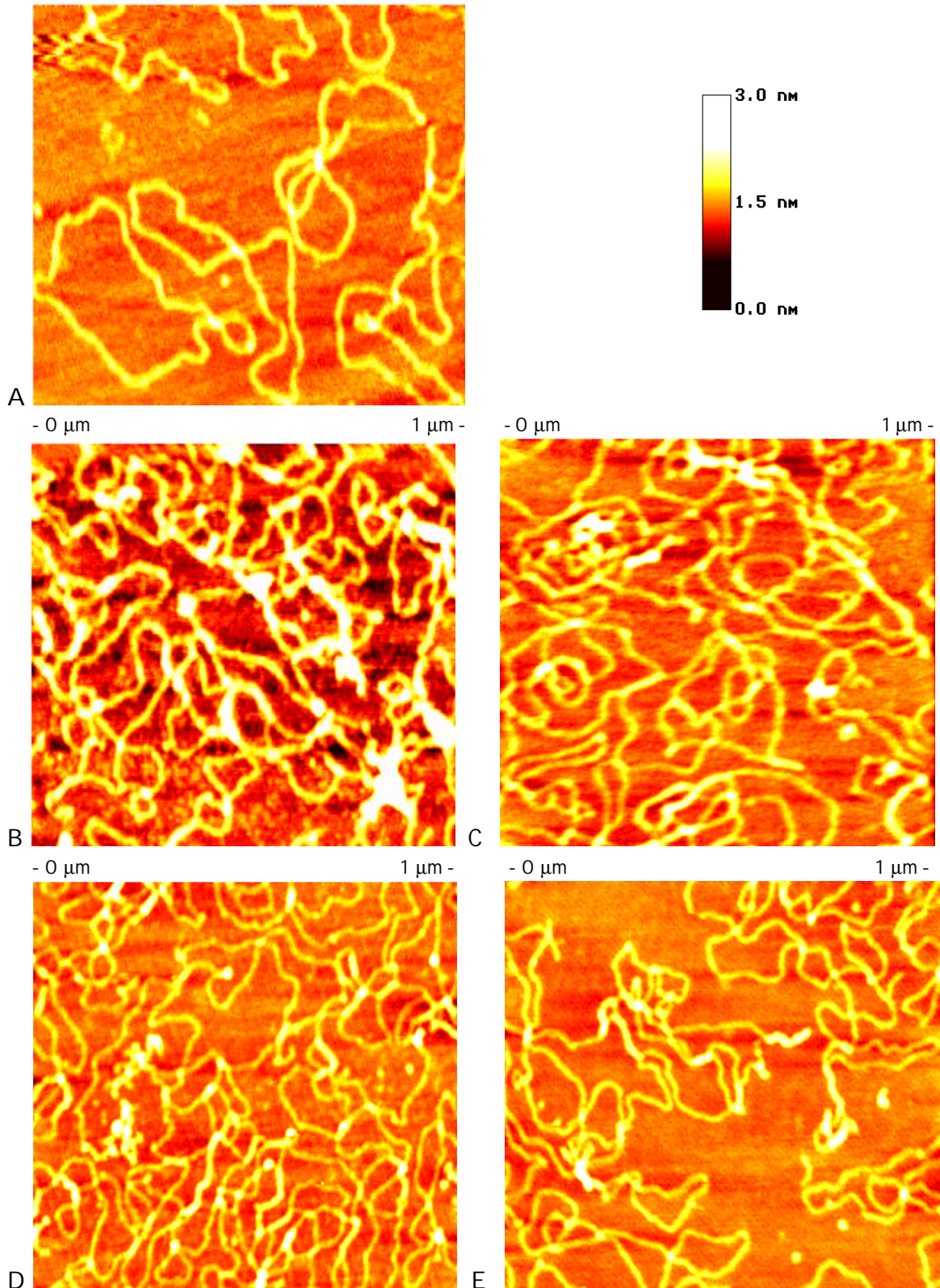


Figura 13. Imatges de AFM del pBR322 sol (figura A) i del pBR322 incubat amb els lligands Hdap·HCl i Hdap·2HCl (figures B i D respectivament) i els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) (figures C i E respectivament) a 37°C i durant 24 hores.

Com es pot observar en les imatges, el DNA no tractat (Figura 13, A) presenta la seva estructura circular covalentment tancada. Les imatges del DNA tractat amb els lligands Hdap i Hdab (Figura 13, B i D) mostren clarament que l'estructura circular pateix un cert enrotllament i a més el DNA es troba agregat de forma molt important. Aquests efectes s'atribueixen a la capacitat que tenen aquests lligands d'interaccionar amb el DNA per unions dèbils de tipus pont d'hidrogen.<sup>2,35</sup> Els lligands Hdap i Hdab presenten en la seva estructura diversos punts possibles per aquest tipus d'interacció, el grup carboxilat i els dos grups amina. Aquest nombre elevat de punts d'interacció explicaria la modificació estructural de la doble hèlix i perquè l'agregació de molècules de DNA és tan important. Existeixen diversos estudis en els que es demostra la formació d'enllaços dèbils per pont d'hidrogen intermoleculars entre els aminogrupos d'amines i àcids nucleics i el grup carboxilat de diaminoàcids, entre ells el 2,3-diaminopropionat i el 2,4-diaminobutirat.<sup>19</sup> Per tant queda demostrat que els lligands Hdap·HCl i Hdab·2HCl poden interaccionar amb el DNA a través d'enllaços dèbils per pont d'hidrogen i modificar l'estructura terciària i la compactació. Tot i això, aquests canvis no són prou importants com per observar-se en l'electroforesi en gel d'agarosa. En les imatges dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) (Figura 13, C i E) s'observa com el DNA pateix una important modificació de la compactació de la seva estructura de forma més intensa que en els respectius lligands, i el que també és remarcable, s'aprecia un augment de l'agregació de les molècules de DNA, en aquest cas de forma menys intensa que en els lligands. Aquest doble efecte es pot explicar, per una banda, per la interacció covalent del platí amb el DNA, de manera que aquesta unió provoca la deformació de l'estructura de la doble hèlix, i per l'altre, l'acció del lligand d'unir entre si diferents molècules de DNA per interaccions dèbils. L'augment de la compactació del DNA explicaria l'avanç de les formes OC i CCC observat en l'electroforesi en gel d'agarosa.

Per tant, a través de les imatges de AFM s'ha evidenciat la capacitat d'interacció dels lligands amb el plasmidi a través d'interaccions per pont d'hidrogen, i la capacitat d'interacció covalent i per pont d'hidrogen dels complexos de platí estudiats, generant-se en tots els casos una variació de la compactació i agregació de les molècules de DNA.

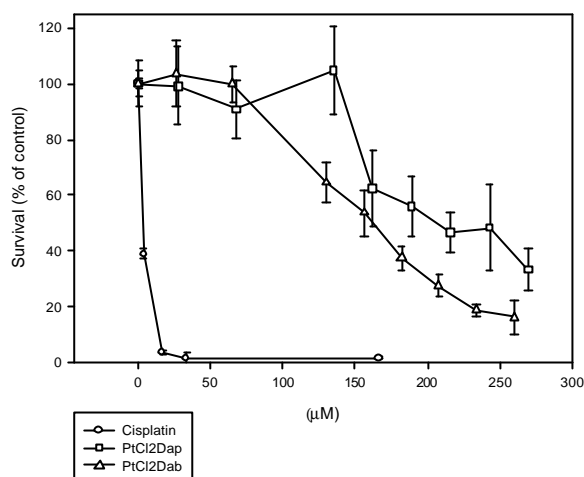
#### 4.2.5. Assaigs de proliferació cel·lular.

La finalitat d'aquests assaigs és l'estudi dels efectes que produeixen els complexos de platí en el creixement in vitro d'una línia cel·lular i determinar el valor de la  $IC_{50}$  (concentració de complex en la qual es produeix el 50% de mort cel·lular).<sup>1,26,36,37</sup>

Per establir el número de cèl·lules vives que queden després del tractament realitzat amb els complexos s'ha utilitzat un reactiu cromòfor basat en sals de tetrazol com a indicador de la viabilitat cel·lular. Aquesta tècnica es basa en el fet que els mitocondris de les cèl·lules vives poden reduir les sals de tetrazol (de color groguenc) a derivats de formazà de color taronja-vermellós. Aquest procés de reducció requereix mitocondris funcionals els quals quedarien inactivats al poc temps de començar el procés de mort cel·lular. Per això, aquest mètode proporciona una eina útil per la discriminació entre cèl·lules vives i mortes.

El temps d'incubació amb aquest reactiu depèn de la capacitat metabòlica de les cèl·lules. Normalment, per obtenir un augment significatiu de la intensitat de color són suficients de dues a cinc hores d'incubació a 37°C. Transcorregut el temps necessari, es comptabilitza el número de cèl·lules vives en funció d'aquesta intensitat, mesurada a través d'un lector ELISA. Com més elevada és la intensitat, més gran és el percentatge de cèl·lules vives.

La citotoxicitat dels complexos de platí s'ha determinat per incubació durant 72h a 37 °C en la línia cel·lular A431 (línia de carcinoma epidermoide), i durant 24, 48 i 72 h en les línies cel·lulars HeLa (línia de carcinoma humà d'úter) i HL60 (línia de leucemia aguda promielocítica). Els resultats obtinguts s'han comparat amb els del cisplatí i carboplatí. Els efectes dels complexos en la proliferació cel·lular es mostren representats com a percentatge (%) de supervivència en front de la concentració de complex ( $\mu$ M), tal i com es pot veure en la Figura 14, la Figura 15, i la Figura 16.



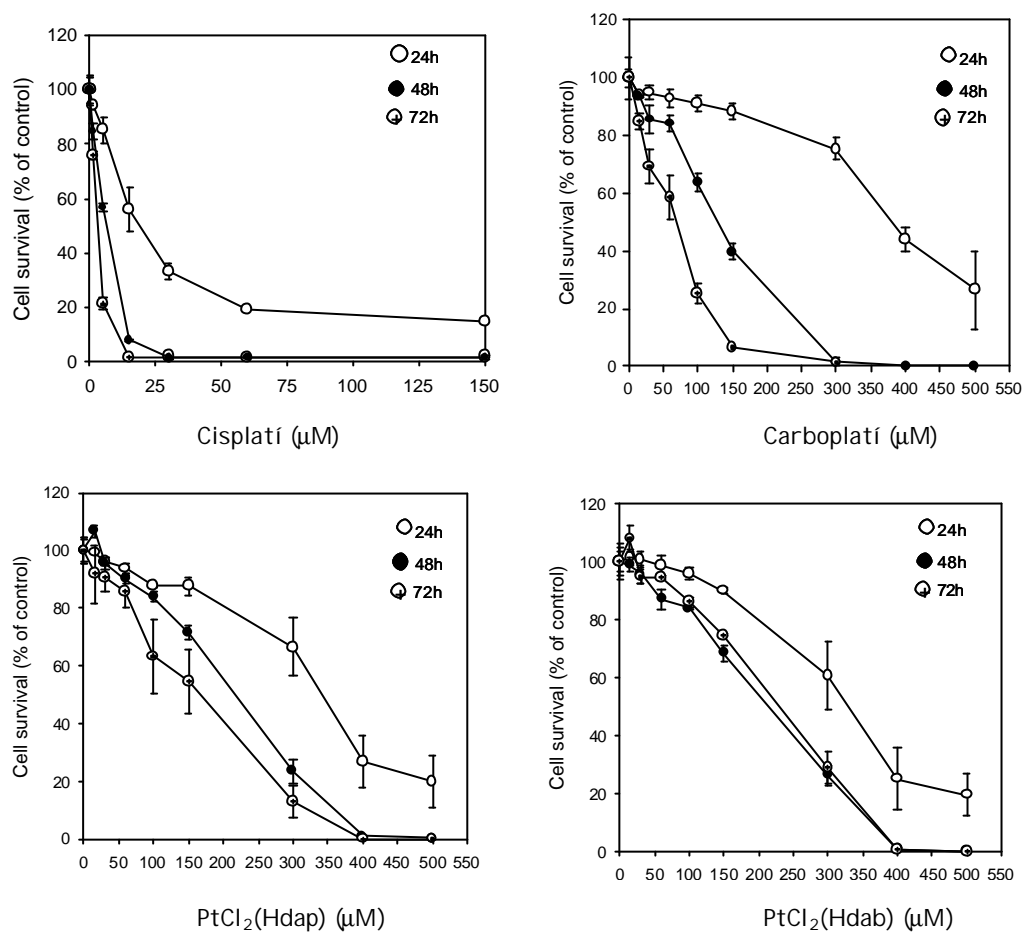
**Figura 14.** Corbes de citotoxicitat de la línia A431 incubada amb els complexos cisplatí, PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab) durant 72 h a 37 °C.

En la línia cel·lular A431<sup>38</sup> s'observa que els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) provoquen una disminució progressiva de la supervivència cel·lular a mesura que la concentració de complex augmenta, essent el complex PtCl<sub>2</sub>(Hdap) més efectiu que el complex PtCl<sub>2</sub>(Hdab) (IC<sub>50</sub> = 161 µM i 208 µM, respectivament) (Taula 5). Per altra banda, el cisplatí presenta un efecte molt més dràstic en la mort cel·lular (IC<sub>50</sub> = 26.5 µM). A partir d'aquests assaigs es posa de manifest que els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) presenten activitat biològica, requerint concentracions de complex bastant més elevades que el cisplatí per assolir els mateixos efectes que aquest. Aquesta diferència d'activitat biològica entre el cisplatí i els complexos de platí sintetitzats podria ser deguda a la diferent solubilitat en aigua i al tamany de l'estructura. Els complexos de Pt(II) estudiats presenten un tamany molecular més gran que el cisplatí i això podria dificultar el transport a través de la membrana cel·lular. A més, els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) al ser més solubles en aigua que el cisplatí poden tenir més dificultat per atravesar la membrana cel·lular, de manera que l'entrada a l'interior de la cèl·lula podria ser més lenta i el seu efecte es veuria retardat respecte al del cisplatí. A més, cal remarcar que el complex PtCl<sub>2</sub>(Hdap) es mostra més efectiu que el PtCl<sub>2</sub>(Hdab) degut segurament a la seva menor hidrosolubilitat com a conseqüència de la longitud més gran de la cadena carbonada.



La línia cel·lular A431 es caracteritza per tenir un temps de duplicació molt gran (90-100h) mentre que altres línies cel·lulars com la HeLa tenen temps de duplicació més baixos (35-40h). Aquest inconvenient de la línia cel·lular A431 va fer que s'optés per utilitzar una línia cel·lular que presentés un creixement més ràpid.

En la línia cel·lular HeLa s'ha realitzat l'estudi de l'activitat citotòxica dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  a diferents temps d'incubació (24 h, 48 h, 72 h) i s'ha comparat amb l'activitat biològica del cisplatí i carboplatí. Tal i com es pot observar en la Figura 15, els dos complexos sintetitzats provoquen una disminució del percentatge de supervivència cel·lular a mesura que augmenta la concentració de complex, assolint una supervivència cel·lular nul·la a una concentració de 400  $\mu\text{M}$  (a 48 h i 72 h), molt similar a l'assolida pel carboplatí (350  $\mu\text{M}$ ) i molt més gran respecte a l'assolida pel cisplatí (25  $\mu\text{M}$ ). Observant les corbes de citotoxicitat corresponents es podria dir que el comportament dels complexos resulta més proper al comportament del carboplatí que al del cisplatí, resultat realment interessant si es té en compte que l'avantatge que presenta el carboplatí respecte al cisplatí és una millor dosificació deguda a la cinètica d'hidròlisi més lenta.



**Figura 15.** Corbes de citotoxicitat de la línia cel·lular HeLa incubada amb el cisplatí, carboplatí i els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) durant 24h, 48h i 72h a 37 °C.

En aquesta línia cel·lular, el comportament del cisplatí i carboplatí està d'acord amb els resultats citats en la bibliografia.<sup>39,40,41,42,43</sup> En tots els casos, l'efecte biològic a 24 hores d'incubació és menor que l'observat a 48 i 72 hores. En el cisplatí, carboplatí i PtCl<sub>2</sub>(Hdap) la mort cel·lular és més important a mesura que augmenta el temps d'incubació, però en canvi en el complex PtCl<sub>2</sub>(Hdab) s'observa una lleugera menor supervivència cel·lular a 48 hores que en 72 hores. Aquest fenomen podria ser degut al fet que les cèl·lules que queden vives, les quals presenten el seu DNA intacte, s'han replicat, augmentant així el percentatge de cèl·lules vives. A més, segons les corbes de citotoxicitat, el complex PtCl<sub>2</sub>(Hdab) es mostra més actiu que el carboplatí i el PtCl<sub>2</sub>(Hdap) a les 24 hores d'incubació, invertint-se aquest efecte al augmentar el temps d'incubació.

En la línia HL60, de la mateixa manera que en HeLa, s'ha estudiat l'activitat citotòxica dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) a tres temps d'incubació diferents (24, 48 i 72 h), i els resultats s'han comparat amb el comportament del cisplatí i carboplatí incubats en les mateixes condicions. Les corbes de supervivència cel·lular obtingudes es mostren en la Figura 16.

Cisplatí (μM)

Carboplatí (μM)

PtCl<sub>2</sub>(Hdap) (μM)

PtCl<sub>2</sub>(Hdab) (μM)

---

**Figura 16. Corbes de citotoxicitat de la línia cel·lular HL60 incubada amb el cisplatí, carboplatí, PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) durant 24, 48 i 72 h a 37 °C.**

A través dels resultats obtinguts es pot observar que tots els complexos presenten activitat citotòxica en aquesta línia cel·lular i que en tots quatre compostos l'efecte citotòxic més gran s'assoleix a 72 h. En aquesta línia cel·lular, com en les altres ja estudiades, el cisplatí provoca un efecte molt important de manera que a concentracions baixes el percentatge de mort cel·lular ja és molt gran, tal i com reflecteixen els valors de IC<sub>50</sub> (Taula 5).

El comportament dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) segueix la mateixa tendència que el carboplatí, ja que el percentatge de supervivència cel·lular disminueix gradualment a l'augmentar la concentració de complex, requerint-se més quantitat de compost per assolir el mateix resultat que el cisplatí. Després de 24 h d'incubació, el complex PtCl<sub>2</sub>(Hdab) és el que es mostra més actiu amb un valor de IC<sub>50</sub> =150 µM, essent els valors de IC<sub>50</sub> del carboplatí i PtCl<sub>2</sub>(Hdap) de 243 µM i 265 µM respectivament. Després de 48 i 72 h d'incubació, el carboplatí és el que mostra un efecte més remarcable. Comparant l'activitat dels dos complexos sintetitzats, el PtCl<sub>2</sub>(Hdab) és més actiu que el seu anàleg, degut segurament a la seva major hidrofobicitat, la qual li permet atravesar la membrana cel·lular i accedir a l'interior de la cèl·lula més fàcilment.

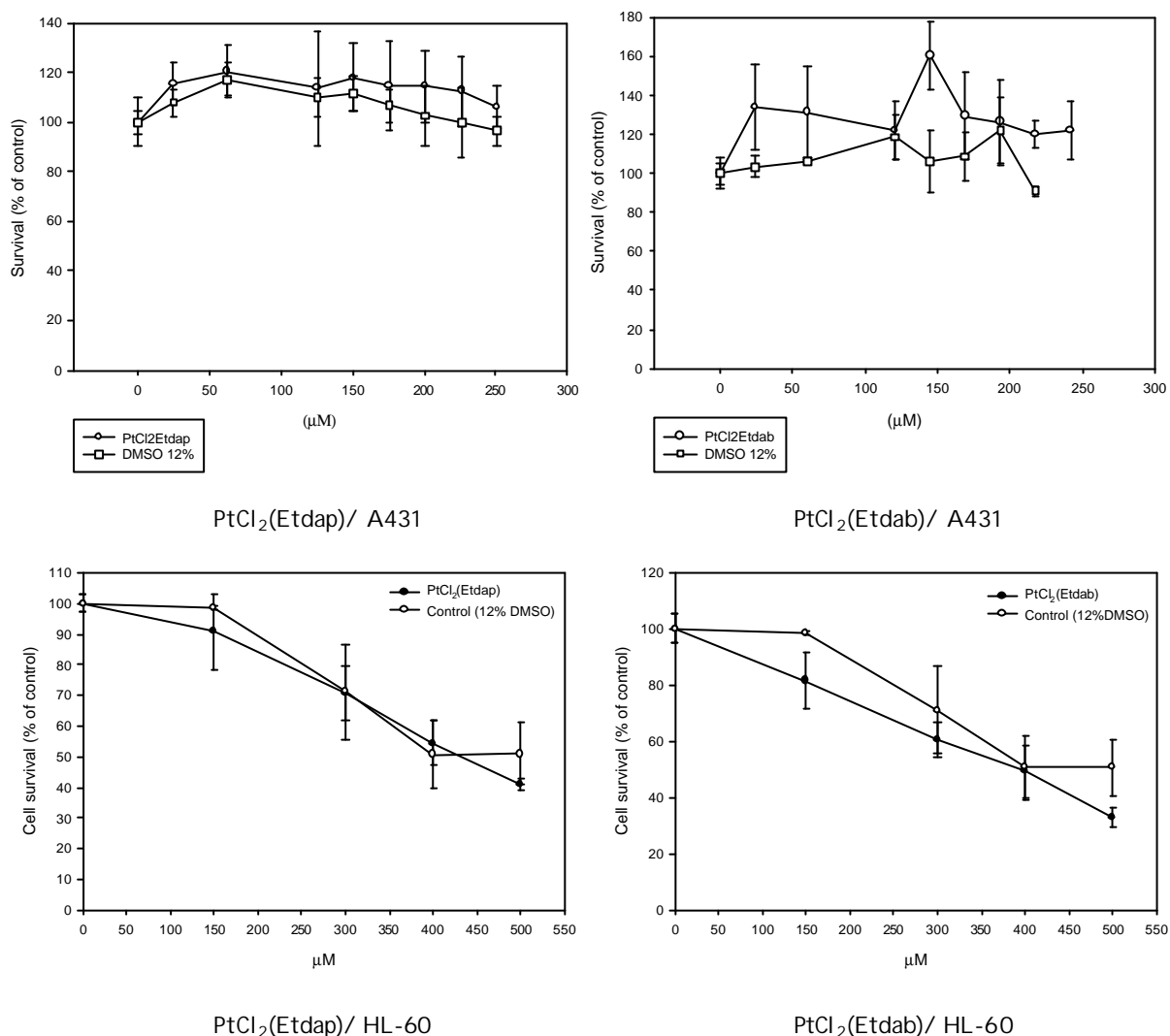
<b>A431</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
Cisplatí			26.64
PtCl <sub>2</sub> (Hdap)			207.9
PtCl <sub>2</sub> (Hdab)			161
<b>HeLa</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
Cisplatí	20	8	4
Carboplatí	380	125	70
PtCl <sub>2</sub> (Hdap)	340	220	165
PtCl <sub>2</sub> (Hdab)	330	230	215
<b>HL-60</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
Cisplatí	12.5	3	2.5
Carboplatí	243	60	30
PtCl <sub>2</sub> (Hdap)	265	200	160
PtCl <sub>2</sub> (Hdab)	150	113	95

Taula 5. Valors de IC<sub>50</sub> (concentració de complex en la qual es produeix el 50% de mort cel·lular) expressats en mM per cada un dels complexos de Pt (II) estudiats, en les línies A431, HeLa i HL60.

L'activitat dels complexos és diferent segons la línia cel·lular i el temps d'incubació. En temps d'incubació alts (72h), el complex PtCl<sub>2</sub>(Hdab) és més actiu en les

línies cel·lulars A431 i HL60, mentre que  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$  és més actiu en HeLa. En temps d'incubació baixos (24h) la diferència d'activitat entre aquests dos complexos és més remarcable i significativa en la línia cel·lular HL60. A més, la línia HL-60 sembla més sensible als tractaments amb els complexos de platí segurament pel diferent origen cel·lular. La línia HL-60 és una línia hematopoiètica, mentre que les altres dues són línies epitelials. La naturalesa epitelial pot fer que les cèl·lules resisteixin més a les agressions fisico-químiques, ja que normalment els epitelis hi estan més exposats.

L'activitat dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Etdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$  s'ha hagut d'estudiar utilitzant un 12% de DMSO per poder-los solubilitzar. L'inconvenient d'utilitzar aquest dissolvent és que pot resultar tòxic per les cèl·lules ja que provoca efectes nocius en la membrana cel·lular. Per aquest motiu, de forma paral·lela s'ha hagut de realitzar un estudi control utilitzant només una dissolució de DMSO del 12%. Els assaigs de proliferació cel·lular s'han realitzat en les línies cel·lulars A431 i HL-60 a 37°C i 72 h d'incubació. Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 17.

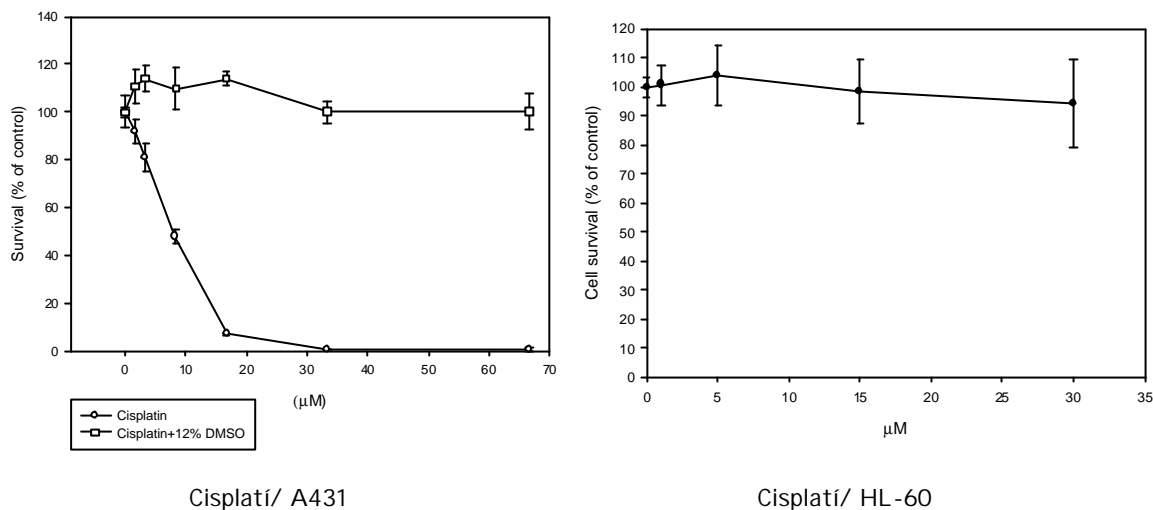


**Figura 17.** Corbes de citotoxicitat de les línies A431 i HL-60 incubades amb els complexos PtCl<sub>2</sub>(Etdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdab) durant 72h a 37°C.

Tal i com es pot veure en la Figura 17 els complexos PtCl<sub>2</sub>(Etdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdab) en la línia A431 no presenten activitat biològica sota les condicions d'assaig emprades ja que no produeixen una disminució de la supervivència cel·lular. De la mateixa manera, el control de 12% DMSO tampoc sembla afectar la mort cel·lular. En la línia HL-60 s'observa una disminució de la supervivència cel·lular tant en el tractament dels complexos com en els controls. Això suggereix que el percentatge del 12% de DMSO emprat resulta tòxic per la cèl·lula, de manera que probablement l'efecte antitumoral dels complexos en aquesta línia cel·lular queda emmascarat per l'efecte del dissolvent.

Per tal de comprovar si la inactivitat dels complexos observada en la línia cel·lular A431 i l'efecte observat en la línia HL-60 és degut a la presència del DMSO s'ha

mesurat l'activitat del cisplatí incubat en les mateixes condicions i línies cel·lulars que  $PtCl_2(Etdap)$  i  $PtCl_2(Etdab)$ . Els resultats es mostren en la Figura 18.



**Figura 18.** Corbes de citotoxicitat de les línies cel·lulars A431 i HL-60 incubades amb cisplatí en presència d'un 12% de DMSO, durant 72h a 37°C.

Com es pot observar, l'activitat del complex queda totalment anul·lada. Aquest fet indica que la presència d'un 12% de DMSO provoca un canvi en l'activitat dels complexos. Aquest fenomen es pot associar a la capacitat del platí a coordinar-se amb l'àtom de sofre del DMSO, desplaçant-se els lligands clorur i obtenint un bloqueig de l'activitat del complex ja que l'àtom metàl·lic no té cap posició lliure per unir-se amb el DNA. El fet que s'observi toxicitat del control de DMSO en la línia cel·lular HL-60 i no en la línia A431 pot ser degut a la major sensibilitat que presenta la línia HL-60 als tractaments i agressions.

#### 4.2.6. Determinació de la mort cel·lular per apoptosi.

##### 4.2.6.1. Citometria de flux.

Per conèixer la causa de la mort cel·lular observada en els assaigs de proliferació s'ha realitzat un estudi de determinació del número de cèl·lules apoptòtiques mitjançant la citometria de flux.<sup>44,45,46</sup>

En les cèl·lules vives els fosfolípids de la membrana plasmàtica es distribueixen asimètricament, i la fosfatidilserina es localitza en la cara interna de la membrana. Durant el procés d'apoptosi, les cèl·lules modifiquen la distribució dels fosfolípids de la membrana passant la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana. Per determinar el número (percentatge) de cèl·lules apoptòtiques s'utilitza un doble marcatge amb annexina V (An) i iodur de propidi (PI). Les cèl·lules vives tenen la capacitat d'excloure la coloració amb PI del seu DNA, mentre que l'annexina V s'uneix a la fosfatidilserina de la cara externa de la membrana. Així, tenint les cèl·lules amb una combinació d'annexina V i PI és possible detectar:

- Cèl·lules vives no apoptòtiques: **An -/ PI -**
- Cèl·lules en apoptosi recent: **An +/ PI -**
- Cèl·lules en apoptosi tardana i/o necrosi: **An +/ PI +**
- Cèl·lules necròtiques (generalment produïdes en resposta a una gran lesió deguda a una sobredosi d'agent citotòxic): **An -/ PI +**.

Aquests percentatges s'obtenen del tractament informàtic de les dades que dona el citòmetre a partir de la dispersió de la població cel·lular. En tots els casos cal un control previ amb cèl·lules sense tractar.

Els citogrames obtinguts de les cèl·lules tractades amb els diferents complexos, PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab) i carboplatí a una concentració de 150 µM i amb cisplatí a una concentració de 15 µM, durant 48 hores d'incubació, es mostren en la Figura 19. Com a control s'utilitza cèl·lules HL60 sense tractar. Les cèl·lules vives (An-/PI-) apareixen en el quadrant baix-esquerre (R1), les cèl·lules apoptòtiques recents (An+/PI-) apareixen en el quadrant baix-dreta (R2), i les cèl·lules apoptòtiques tardanes (An+/PI+) apareixen en el quadrant dalt-dreta (R3). El quadrant dalt-esquerre (R4) correspon a cèl·lules necròtiques PI-, les quals presenten la membrana molt degradada o fins i tot la cèl·lula ja està fragmentada, de manera que només incorporen PI.



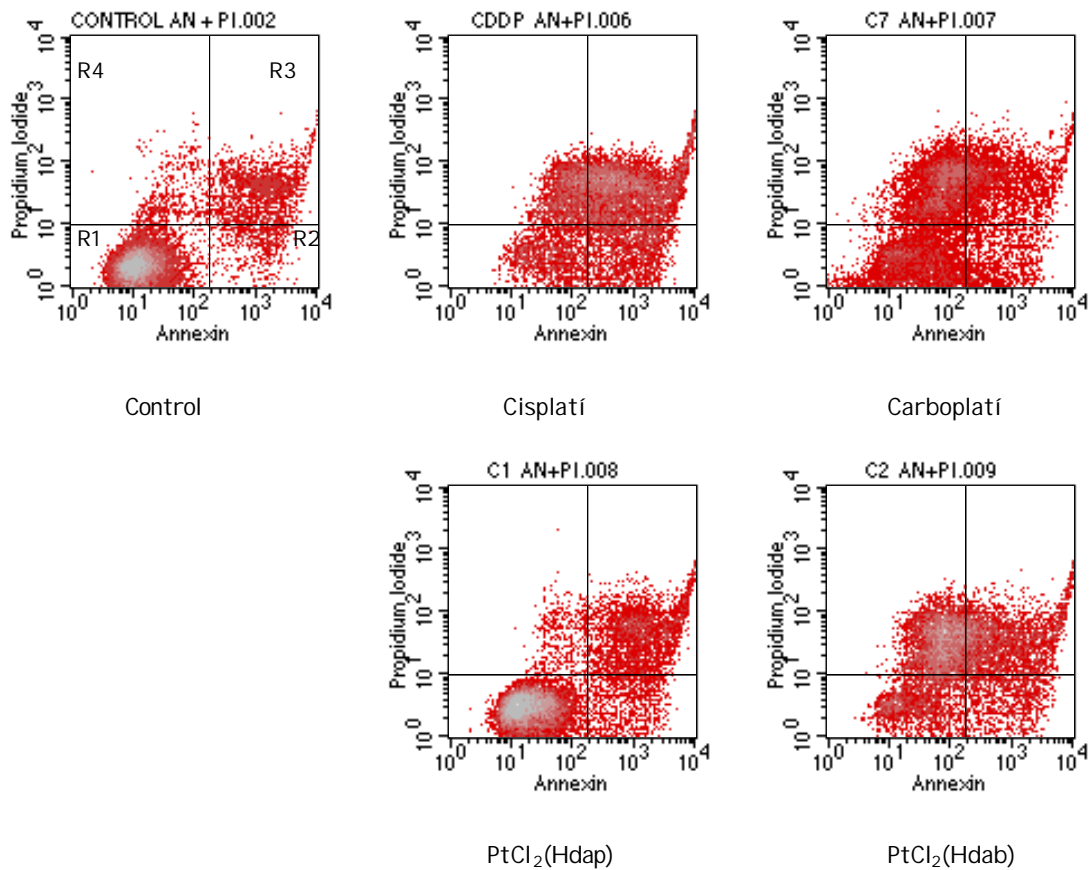


Figura 19. Citogrames obtinguts de les cèl·lules HL60 incubades durant 48h amb els complexos cisplati (15 mM), carboplati (150 mM), PtCl<sub>2</sub>(Hdap) (150 mM), i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) (150 mM). El control correspon a les cèl·lules HL60 sense tractar.

Els percentatges de les cèl·lules, respecte el total de la població, que es troben en les diferents fases de mort cel·lular es mostren en la Taula 6.

<b>Tractament</b>	<b>% cèl·lules vives (R1)</b>	<b>% cèl·lules apoptòtiques (R2)</b>	<b>% cèl·lules en apoptosi tardana (R3)</b>	<b>% cèl·lules necròtiques (R4)</b>
<b>Control</b>	83.21	2.99	10.82	2.99
<b>Cisplatí</b>	14.18	16.56	47.04	21.92
<b>Carboplatí</b>	43.0	8.15	16.89	31.96
<b>PtCl<sub>2</sub>(Hdap)</b>	71.02	6.18	20.04	2.76
<b>PtCl<sub>2</sub>(Hdab)</b>	17.46	8.55	26.98	26.98

**Taula 6.** Valors del % de cèl·lules apoptòtiques (An+/PI-) i cèl·lules necròtiques o en apoptosi tardana (An+/PI+) obtinguts en la incubació d'una població de cèl·lules HL60 durant 48 h amb els complexos cisplatí (15 mM), carboplatí (150 mM), PtCl<sub>2</sub>(Hdap) (150 mM), i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) (150 mM).

Aquests percentatges s'obtenen del tractament informàtic de les dades que dona el citòmetre a partir de la dispersió de la població cel·lular. Com es pot observar en les dades presentades, el cisplatí és el complex que mostra un nombre més gran de cèl·lules apoptòtiques (16.56%) després de 48 h d'incubació, tot i estar en una concentració molt més baixa que els altres complexos. Cal tenir en compte que el cisplatí és molt actiu, i si s'hagués utilitzat una concentració molt elevada d'aquest compost s'hauria obtingut un elevat grau de mort cel·lular en estat de necrosi, de manera que no s'haurien pogut observar les cèl·lules en apoptosi recent.

El carboplatí i els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) mostren un percentatge de cèl·lules apoptòtiques recents més baix, de l'ordre del 8%. D'aquests tres complexos, el que presenta un número més gran de cèl·lules vives és el PtCl<sub>2</sub>(Hdap) (71.02%), mentre que PtCl<sub>2</sub>(Hdab) és el que mostra un percentatge més baix de cèl·lules vives (17.46%). Aquest efecte de la supervivència cel·lular ja s'havia observat en els assaigs de proliferació cel·lular, on per una concentració de 150 μM de compost i amb un temps d'incubació de 48h, el percentatge de supervivència cel·lular era més gran pel complex PtCl<sub>2</sub>(Hdap). El complex PtCl<sub>2</sub>(Hdab) és el que presenta un percentatge més gran de cèl·lules ja degradades a les 48 h d'incubació.

Amb aquests resultats s'ha pogut demostrar que els complexos sintetitzats provoquen una mort cel·lular per apoptosi i que es segueix el procediment de degradació cel·lular típic d'aquest fenomen fins a arribar a una fragmentació total de la cèl·lula.

Per tal de corroborar el fenomen d'apoptosi, en les cèl·lules control i les tractades s'ha realitzat una extracció del DNA i s'ha analitzat per electroforesi en gel d'agarosa per tal d'observar el patró típic de fragments de 200 pb que produeix l'apoptosi. Els resultats es mostren en l'apartat següent.

#### 4.2.6.2. Electroforesi en gel d'agarosa del DNA cel·lular.

El patró electroforètic obtingut del DNA extret de les cèl·lules tractades amb una concentració de 150  $\mu$ M dels complexos durant 72 hores es mostra en la Figura 20. Els resultats es comparen amb un control de DNA extret de cèl·lules HL60 sense tractar (C) i un marcador molecular (MM).

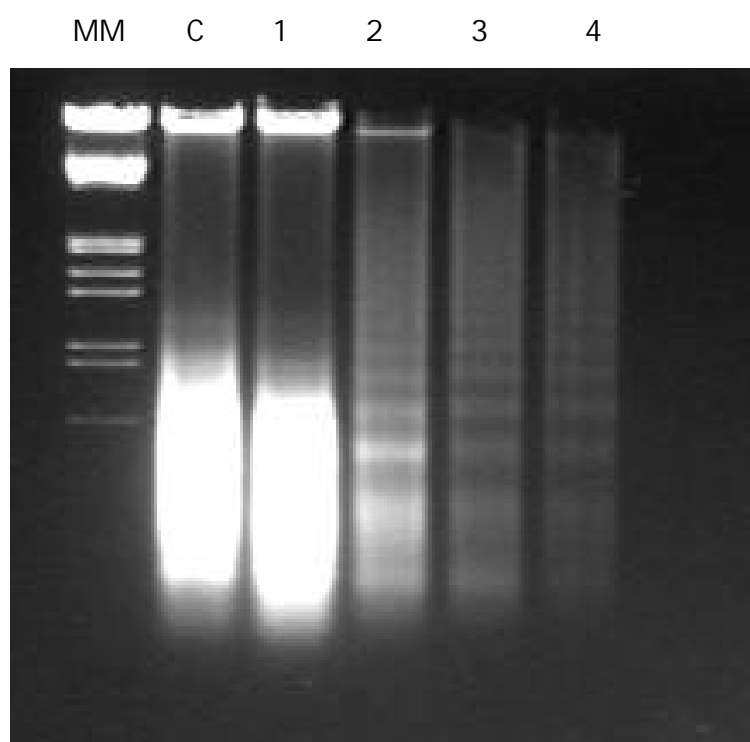


Figura 20. Patró electroforètic del DNA extret de les cèl·lules HL60 tractades amb els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$  (1) i  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  (2) a una concentració de 150  $\mu$ M durant 72 h, carboplatí (3) a una concentració de 150  $\mu$ M, i cisplatí (4) a una concentració de 15  $\mu$ M. MM= marcador molecular, C= control.

Com es pot veure, el control presenta una banda d'alt pes molecular (21 KDa) corresponent al DNA genòmic sense fragmentar i una banda molt intensa a la part inferior, que correspon majoritàriament a RNA i una mica de DNA de baix pes molecular. En les cèl·lules apoptòtiques aquesta banda tan intensa ja no apareix perquè el RNA està degradat i surt del gel.

En les condicions emprades i comparant amb l'efecte del carboplatí i cisplatí, s'observa que el complex  $PtCl_2(Hdap)$  no genera apoptosi, mentre que el complex  $PtCl_2(Hdab)$  provoca una fragmentació del DNA generant fragments de 200 pb característics de l'apoptosi. Es va repetir l'experiment augmentant la concentració dels complexos  $PtCl_2(Hdap)$  i  $PtCl_2(Hdab)$  a 300  $\mu M$ , i en aquest cas, es va observar el patró típic de l'apoptosi per tots dos complexos (Figura 21).

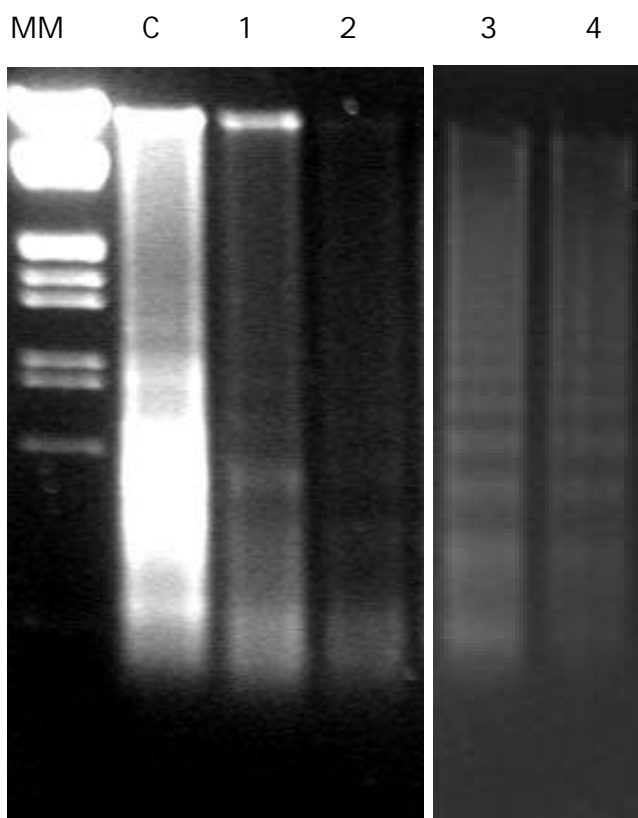


Figura 21. Patró electroforètic del DNA extret de les cèl·lules HL60 tractades amb els complexos  $PtCl_2(Hdap)$  (1) i  $PtCl_2(Hdab)$  (2) a una concentració de 300  $\mu M$  durant 72 h, carboplatí (3) a una concentració de 150  $\mu M$ , i cisplatí (4) a una concentració de 15  $\mu M$ . MM= marcador molecular, C= control.

Amb aquests resultats es demostra que el complex  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  es mostra més efectiu que el seu anàleg, generant de forma més ràpida la fragmentació del DNA de les cèl·lules apoptòtiques.

## 5. CONCLUSIONS.

- S'han sintetitzat i caracteritzat quatre complexos de Pt(II),  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{Etdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$ , els quals presenten geometria cis, dos lligands làbils de tipus clorur i un lligand diaminoquelatant.

- Els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  són parcialment solubles en aigua, ja que presenten un grup carboxílic, mentre que els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Etdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$  són solubles en dissolvents com DMSO i DMF.

- Els estudis de DC han demostrat que els lligands  $\text{Hdap}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{Hdab}\cdot 2\text{HCl}$ ,  $\text{Etdap}\cdot 2\text{HCl}$  i  $\text{Etdab}\cdot 2\text{HCl}$  no interaccionen covalentment amb el DNA i per tant no modifiquen la seva estructura secundària, ja que no generen canvis significatius en l'espectre del DNA-Calf Thymus.

- Els estudis de DC han mostrat, en canvi, que els quatre complexos de Pt(II) presenten la capacitat d'interaccionar amb el DNA, modificant la seva estructura secundària. Els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  formen adductes intracadena cis-bifuncionals generant l'obertura de l'hèlix degut al canvi d'empaquetament de les bases nitrogenades. Els adductes que formen els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Etdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$  generen un canvi en la conformació del DNA de la forma B a la forma C. Per tant, el tipus de substituent que conté el lligand influeix en el tipus d'interacció complex-DNA.

- Amb l'estudi per RMN-<sup>1</sup>H de la interacció Pt-5'GMP s'ha comprovat que el mecanisme d'interacció dels quatre complexos és a través d'un enllaç Pt- N7 de la guanina, i que els grups éster etílic s'hidrolitzen en les condicions de l'assaig.

- A través de les imatges de AFM i del patró electroforètic s'ha comprovat que els lligands Hdap·HCl i Hdab·2HCl generen un lleuger augment de la compactació del DNA pBR322 i una agregació important de les molècules del plasmidi degut probablement a la capacitat de generar interaccions dèbils per pont d'hidrogen amb l'àcid nucleic.

- A través de AFM i electroforesi en gel d'agarosa s'ha comprovat que els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) modifiquen l'estructura terciària del plasmidi pBR322 augmentant de forma important la seva compactació i agregació. Aquest efecte és degut a la capacitat d'aquests complexos de formar per una banda enllaços covalents amb el DNA a través del metall i per altra banda enllaços per pont d'hidrogen a través del lligand.

- S'ha estudiat l'activitat in vitro dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) en les línies cel·lulars A431, HeLa i HL60. Els dos compostos són actius en les tres línies cel·lulars essent llur activitat més baixa que la del cisplatí i carboplatí. Tot i això el comportament general dels dos complexos sintetitzats segueix la tendència del carboplatí.

- L'activitat citotòxica depèn de la línia cel·lular i del temps d'incubació. En temps d'incubació baixos (24h) és el complex PtCl<sub>2</sub>(Hdab) el que es mostra més actiu en les línies HeLa i HL60, ja que al ser més lipofílic que PtCl<sub>2</sub>(Hdap) pot atravesar més fàcilment la membrana cel·lular i accedir més ràpidament al DNA. En temps d'incubació alts (72h), el complex PtCl<sub>2</sub>(Hdab) és més actiu en les línies cel·lulars A431 i HL60, mentre que PtCl<sub>2</sub>(Hdap) és més actiu en la línia HeLa.

-L'activitat dels complexos PtCl<sub>2</sub>(Etdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdab) s'ha estudiat en la línia cel·lular A431 i HL-60 en presència d'un percentatge de DMSO del 12% per tal de millorar la

solubilització dels compostos. En aquestes condicions els complexos es mostren inactius. Aquest efecte s'ha comparat amb el presentat pel cisplatí sota les mateixes condicions, i s'ha observat que l'activitat d'aquesta droga esdevé nul·la. La capacitat d'interacció del DMSO amb el platí pot bloquejar les posicions que té el complex disponibles per interaccionar amb el DNA i inactivar-lo.

- A través de la citometria de flux s'ha comprovat que la mort cel·lular causada per aquests complexos és principalment per apoptosi i no per necrosi, essent el complex  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  el que mostra mort cel·lular per apoptosi a una concentració més baixa que el seu anàleg  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$ . L'electroforesi en gel d'agarosa del DNA tractat amb aquests complexos dona lloc al patró típic que genera l'apoptosi, observant-se la fragmentació del DNA en fragments de 200 pb.





## 6. REFERÈNCIES

---

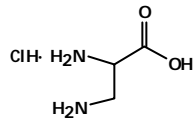
- <sup>1</sup> E. Lindauer, E. Holler. *Biochem. Pharm.* **1996**, 52, 7-14.
- <sup>2</sup> G.B. Onoa, G. Cervantes, V. Moreno, M.J. Prieto. *Nucl. Acids Res.*, **1998**, 26, 6.
- <sup>3</sup> C. Molenaar, J-M. Teuben, R.J. Heetebrij, H.J. Tanke, J. Reedijk. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**, 5, 655-665.
- <sup>4</sup> E.G. Talman, W. Bruning, J. Reedijk, A.L. Spek, N. Veldman. *Inorg. Chem*, **1997**, 36, 854-861.
- <sup>5</sup> P.M. Takahara, A.C. Rosenzweig, C.A. Frederick, S.J. Lippard. *Nature*, **1995**, 377, 19, 649-652.
- <sup>6</sup> H. Brunner, P. Hankofer, U. Holzinger, B. Treitinger, H. Schonenberger. *Eur. J. Med. Chem.*, **1990**, 25, 35.
- <sup>7</sup> T.W. Hambley. *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, 166, 181-223.
- <sup>8</sup> G. Faraglia, L. Sindellari, S. Sitran. *Thermochim. Acta*, **1987**, 115, 229.
- <sup>9</sup> V. Cherchi, G. Faraglia, L. Sindellari, G. Voltarel, S. Sitren, A. Furlani, L. Ravalico, V. Scarzia. *Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy*. M. Niconi (ed.), Boston, **1988**.
- <sup>10</sup> M.S. Robillard, M. Galanski, W. Zimmermann, B.K. Keppler, J. Reedijk. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 88, 254-259.
- <sup>11</sup> J. Reedijk. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2499-2510.
- <sup>12</sup> M. Merovech, J. Kjellstrom, K.S.M. Martensson, S.K.C. Elmroth, C.S. Chow. *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 297, 145-155.
- <sup>13</sup> C.J. van Garderen, M.J. Bloemink, E. Richardson, J. Reedijk. *J. Inorg. Biochem.*, **1991**, 42, 199-205.
- <sup>14</sup> N.G. Di Masi, F.P. Intini, C. Pacifico, L. Maresca, G. Natile. *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 310, 27-33.
- <sup>15</sup> Y. Qu, J.A. Fitzgerald, H. Rauter, N. Farrel. *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 24, 6324-6327.
- <sup>16</sup> A.T.M. Marcelis, C.G. van Kralinger, J. Reedijk. *J. Inorg. Biochem.*, **1980**, 13, 213-222.

- 
- <sup>17</sup> E.L.M. Lempers, M. J. Bloemink, J. Brouwer, Y. Kidani, J. Reedijk. *J. Inorg. Biochem.*, **1990**, 40, 23-35.
- <sup>18</sup> a) M.J. Cleare, J.D. Hoeschele, *Plat. Met. Rev.*, **1973**, 17, 3. b) M.J. Cleare, J.D. Hoeschele. *Bioinorg. Chem.*, **1973**, 2, 187.
- <sup>19</sup> a) M.L. González, J.M. Tercero, A. Matilla, J. Niclós-Gutiérrez, M. T. Fernández, M.C. López, C. Alonso, S. González. *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 1806-1812. b) C.F. Liu, M.K. Yoo. *Inorg. Chem.*, **1976**, 15, 10, 2415-2418. c) H. Masuda, A. Odani, T. Yamazaki, T. Yajima, O. Yamauchi. *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 1111-1118. d) L. Lomozik. *Inorg. Chim. Acta*, **1994**, 219, 107-114.
- <sup>20</sup> E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon. *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos.*, **1995**, Alhambra Longman.
- <sup>21</sup> K. Nakamoto. *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds.*, **1986**, 4<sup>th</sup> Edition. Wiley. New York.
- <sup>22</sup> J.P. Macquet, J.L. Butour. *Biochimie*, **1978**, 60, 901.
- <sup>23</sup> a) V. Brabec, V. Kleinwächter, J. Butour, M.P. Johnson. *Biophys. Chem.*, **1990**, 35, 129. b) R. Zaludová, A. Zakovská, J. Kaspárová, Z. Balcarová, V. Kleinwächter, O. Vrána, N. Farrell, V. Brabec. *Eur. J. Chem.*, **1997**, 246, 508.
- <sup>24</sup> D. Yang, S.S.G.E. van Boom, J. Reedijk, J.H. van Boom, A.H.J. Wang. *Biochemistry*, **1995**, 34, 12912.
- <sup>25</sup> W.C. Johnson, M.S. I tzkowitz, Y. Tinoco. *Biopolymers*, **1972**, 11, 225.
- <sup>26</sup> G. Cervantes, M.J. Prieto, V. Moreno. *Metal Based Drugs*, **1997**, 4, 9.
- <sup>27</sup> M. Vives, R. Tauler, V. Moreno, R. Gargallo. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 446, 439-450.
- <sup>28</sup> M. Green, M. Garner, D. Morton. *Transition Met. Chem.*, **1992**, 17, 164-176.
- <sup>29</sup> S.J. Lippard. *Acc. Chem. Res.*, **1978**, 11, 211.
- <sup>30</sup> B.E. Bowler, L.S. Holis, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 6102.
- <sup>31</sup> R.T. Espejo, J. Lebowitz. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 95.
- <sup>32</sup> G.L. Cohen, W.R. Bauer, J.K. Barton, S.J. Lippard. *Science*, **1979**, 203, 1014.
- <sup>33</sup> S. Mong, Y. Daskal, A.W. Prestayko, S.T. Crooke. *Cancer Res.*, **1981**, 41, 4020.

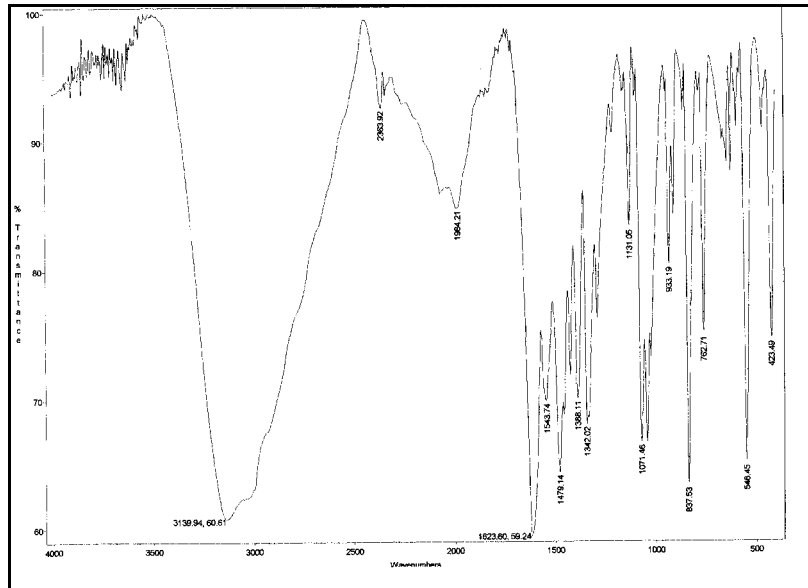
- <sup>34</sup> M.V. Keck, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3386.
- <sup>35</sup> D. Anselmetti, J. Fritz, B. Smith, X. Fernández-Busquets. *Single Molecules*, **2000**, 1, 1, 53-58.
- <sup>36</sup> H. Mese, A. Sasaki, R.E. Alcalde, S. Nakayama, T. Matsumura. *Chemotherapy*, **1998**, 44, 414-420.
- <sup>37</sup> M.S. Newman, G.T. Colbern, P.K. Working, C. Engbers, M.A. Amantea. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, **1999**, 43, 1-7.
- <sup>38</sup> H. Mese, A. Sasaki, R.E. Alcalde, S. Nakayama, T. Matsumura. *Chemotherapy*, **1998**, 44, 414-420.
- <sup>39</sup> C. Navarro-Ranninger, J. López-Solera, V.M. González, J.M. Pérez, A. Álvarez-Valdés, A. Marín, P.R. Raithby, J.R. Masaguer, C. Alonso. *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 5181.
- <sup>40</sup> G.B. Onoa, V. Moreno, M. Font-Bardia, X. Solans, J.M. Pérez, C. Alonso. *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, 75, 205.
- <sup>41</sup> G. Cervantes, S. Marchal, M.J. Prieto, J.M. Pérez, V.M. González, C. Alonso, V. Moreno. *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, 77, 197.
- <sup>42</sup> A.G. Quiroga, J.M. Pérez, I. López-Solera, E.I. Montero, J.R. Masaguer, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger. *J. Inorg. Biochem*, **1998**, 69, 275.
- <sup>43</sup> A.G. Quiroga, J.M. Pérez, E.I. Montero, J.R. Masaguer, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger. *J. Inorg. Biochem*, **1998**, 70, 117.
- <sup>44</sup> Z. Darzynkiewitzs, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota, F. Traganos. *Cytometry*, **1992**, 13, 795-808.
- <sup>45</sup> S. Kumar. *TIBS*, **1995**, 20, 198-202.
- <sup>46</sup> J.V. Lee, R. Hosotani, M. Wada, R. Doi, T. Kosiba, K. Fujimoto, Y. Miyamoto, C. Mori, N. Nakamura, K. Shiota, M. Imamura. *Anticancer Res.*, **1997**, 17, 3445-3450.



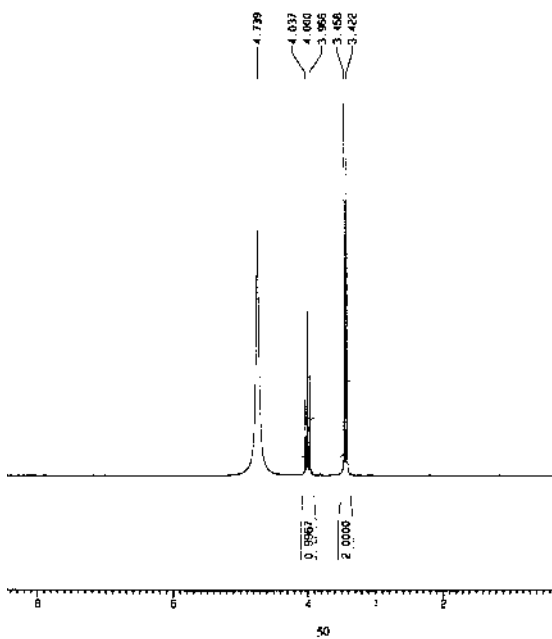
## 7. MATERIAL SUPLEMENTARI



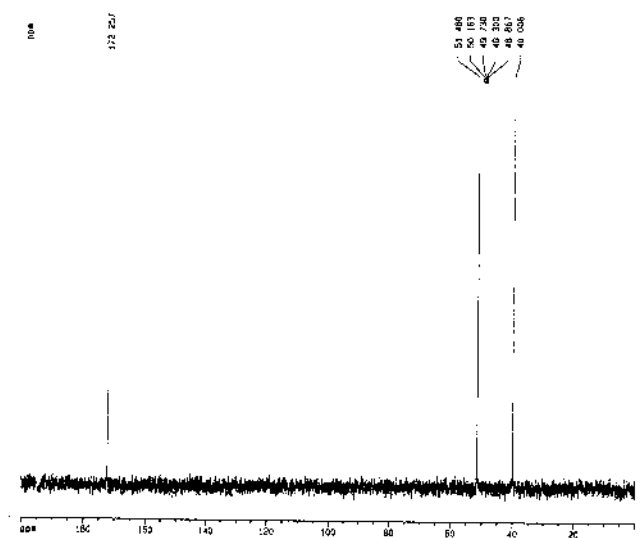
Hdap·HCl



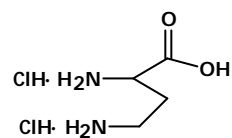
IR



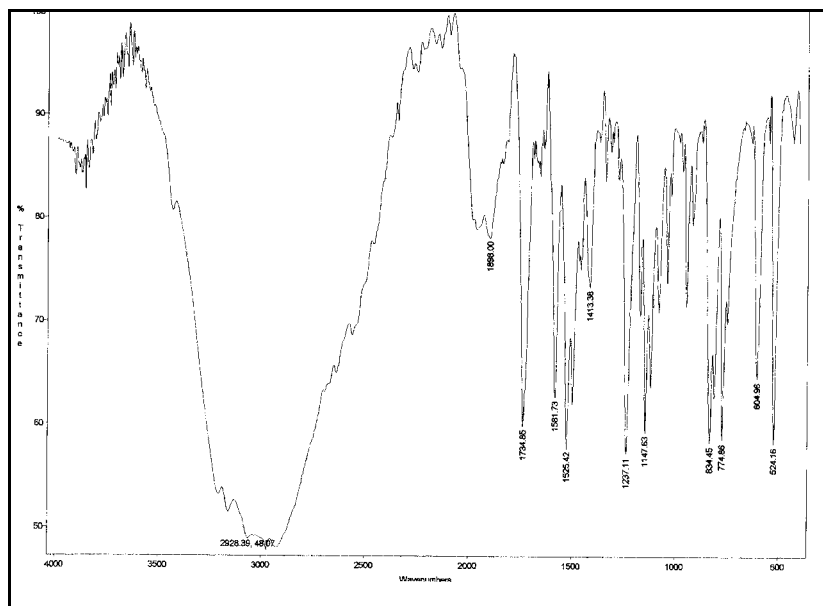
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



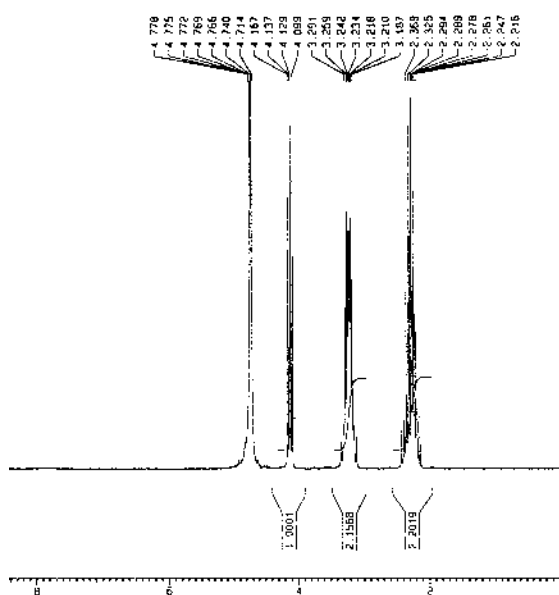
RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)



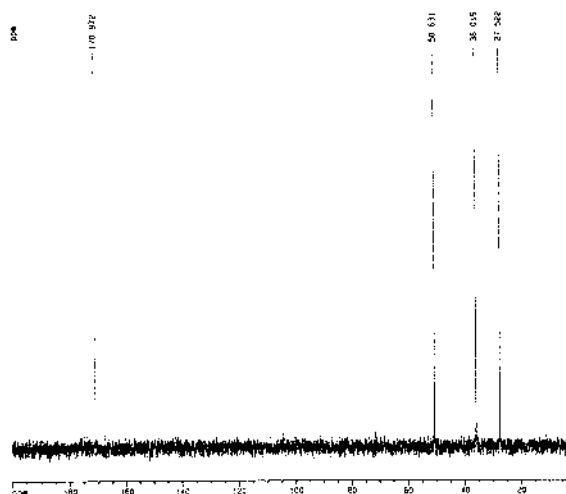
Hdab·2HCl



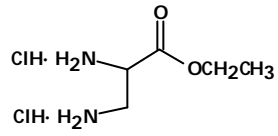
IR



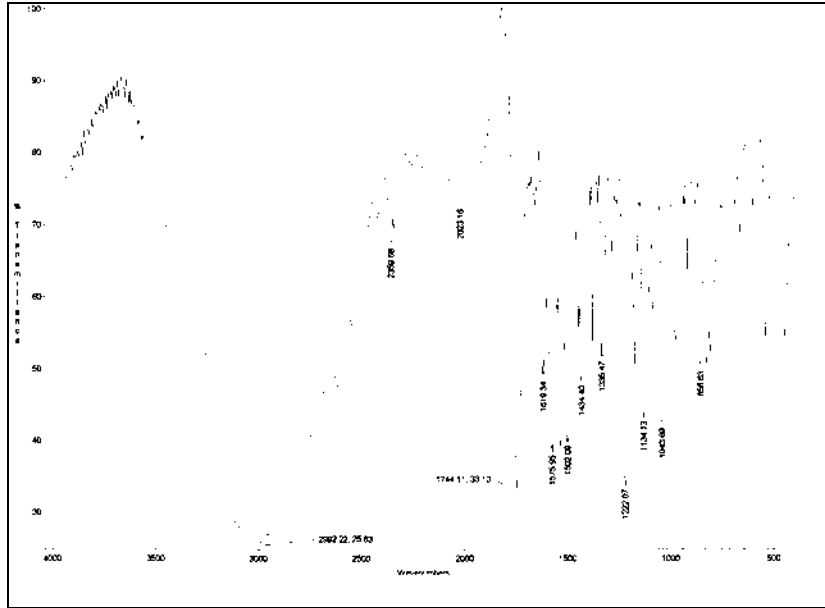
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



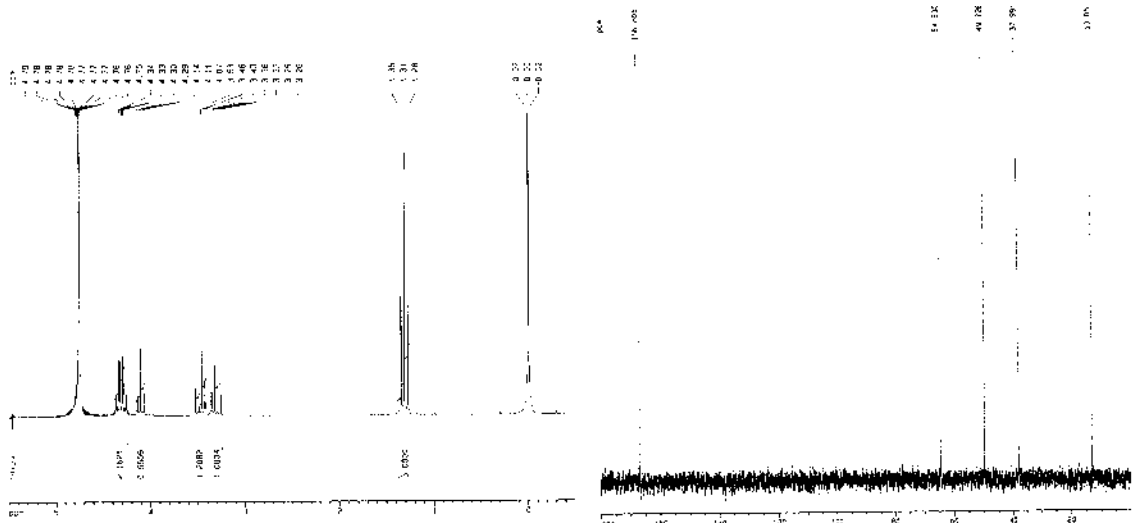
RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)



Etdap·2HCl

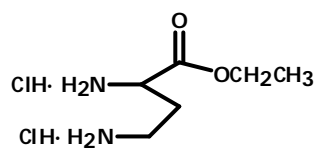


IR

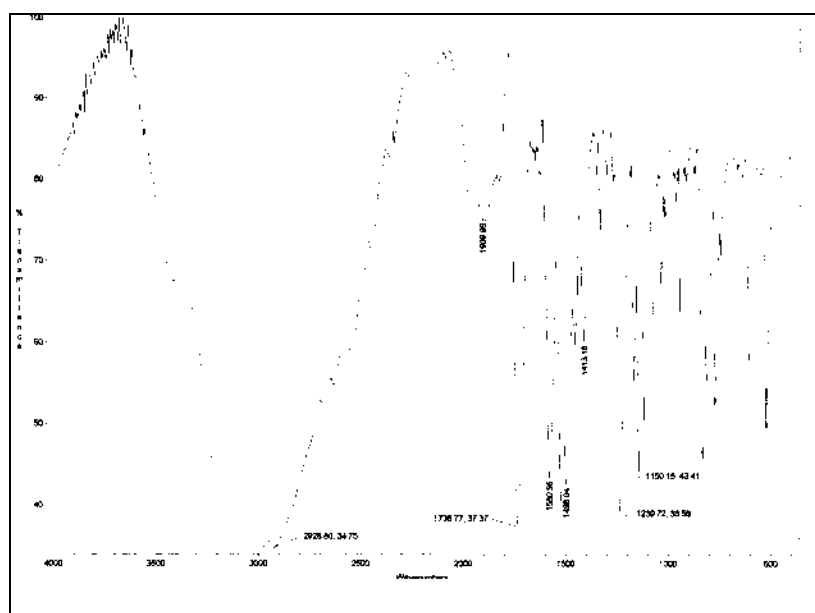


RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)

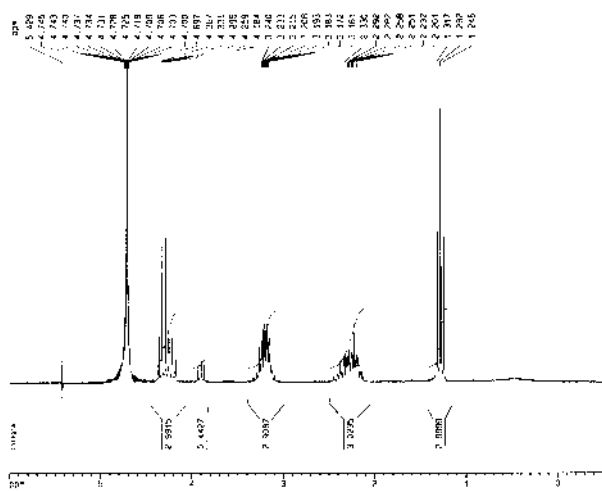
RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)



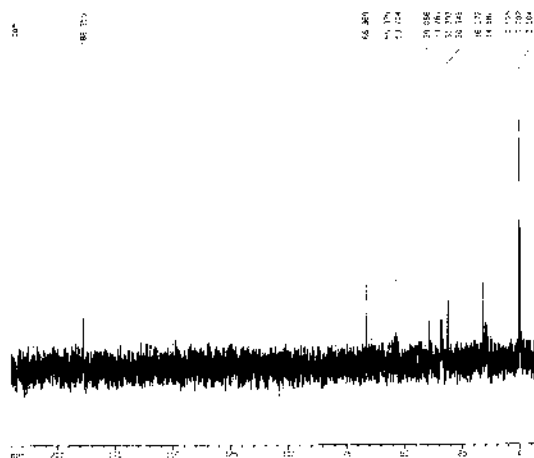
Etdab-2HCl



IR

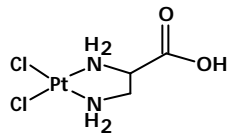


RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)

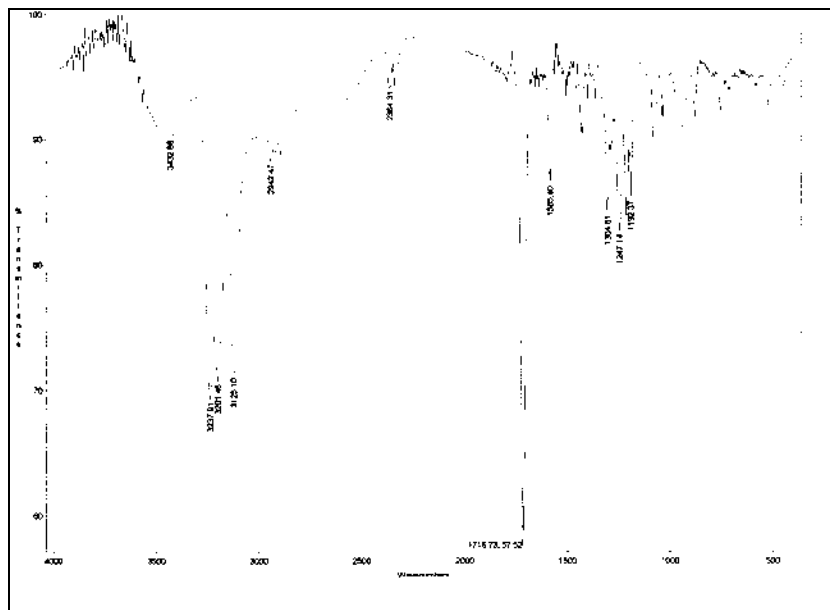


RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)

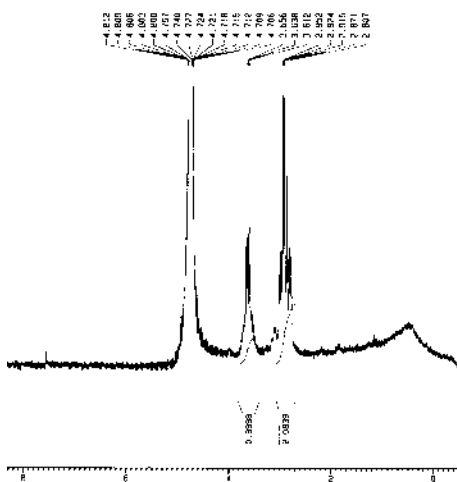




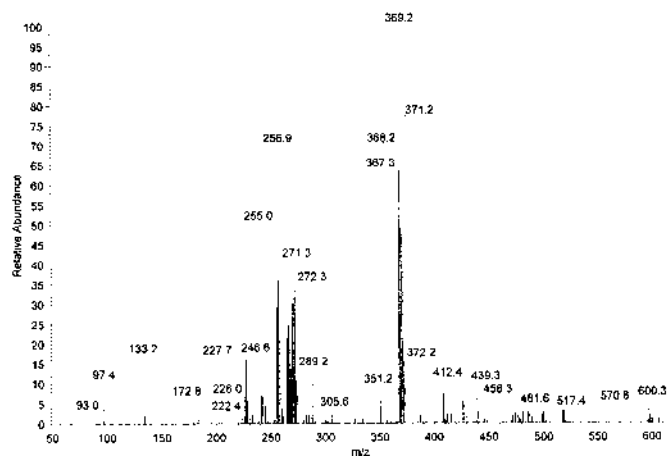
PtCl<sub>2</sub>(Hdap)



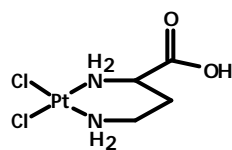
IR



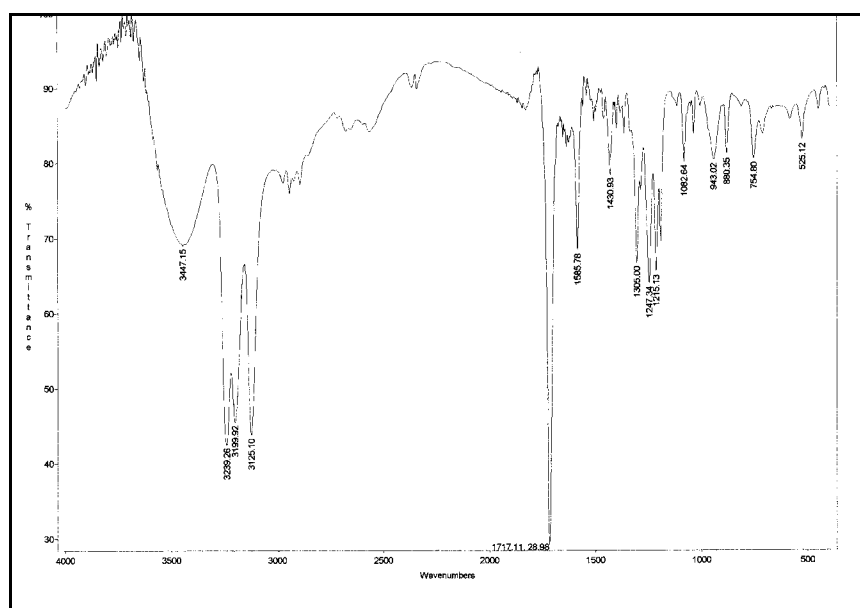
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



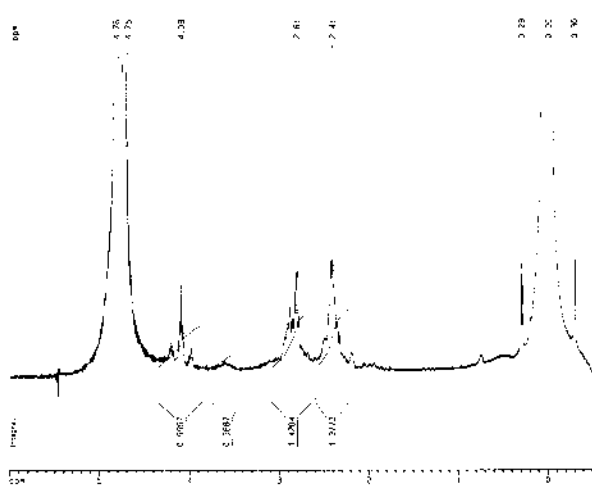
ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH)



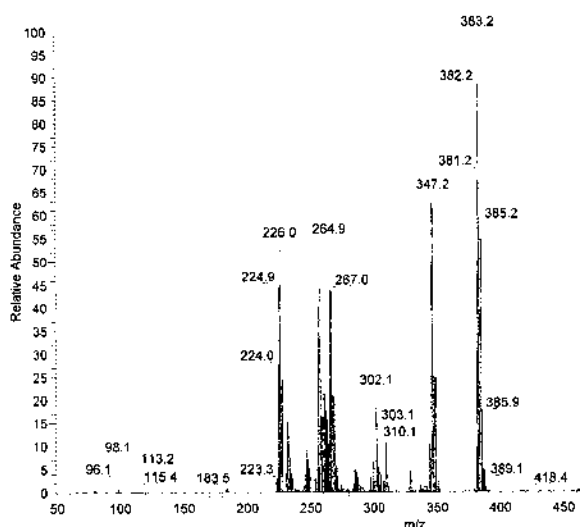
PtCl<sub>2</sub>(Hdab)



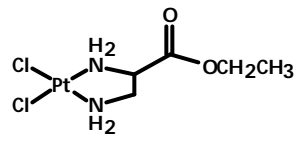
IR



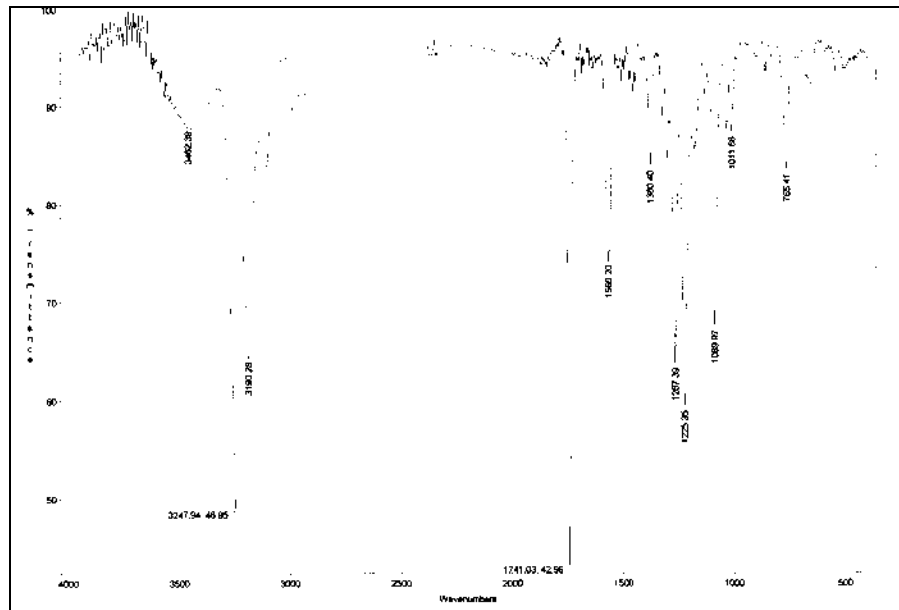
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



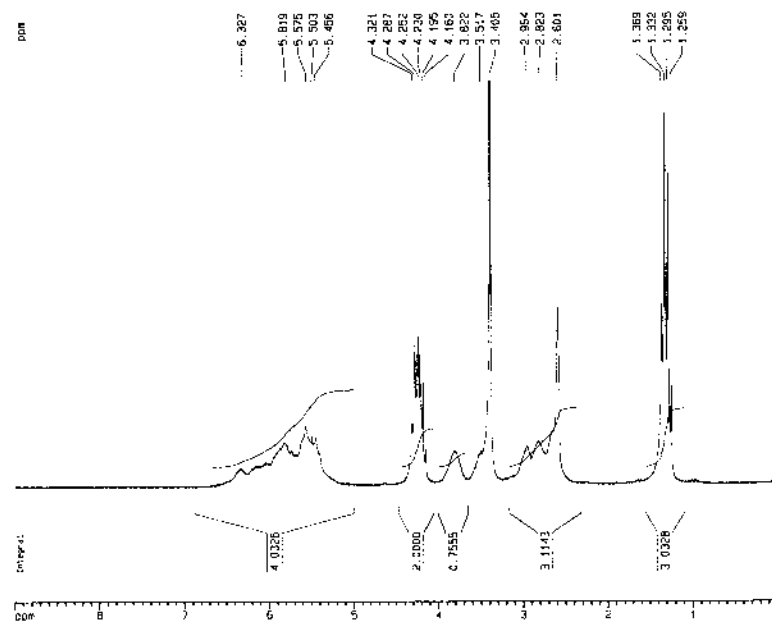
ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH)



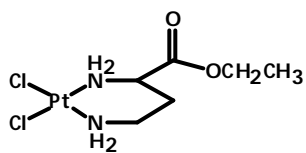
PtCl<sub>2</sub>(Etdap)



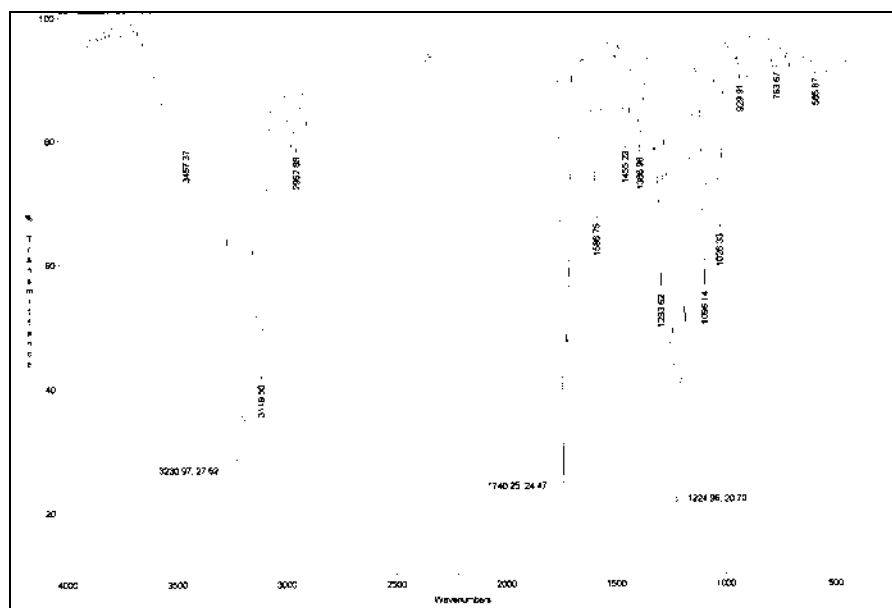
IR



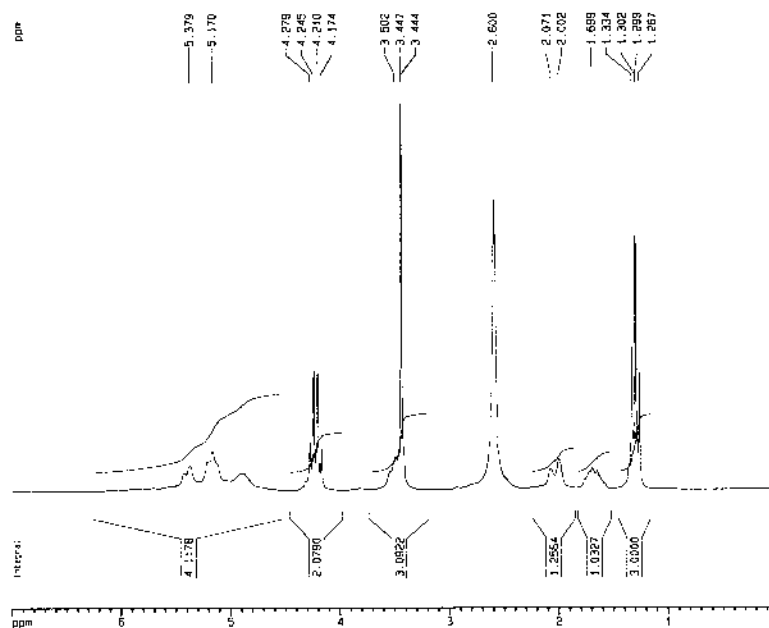
RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)



PtCl<sub>2</sub>(Etdab)



IR

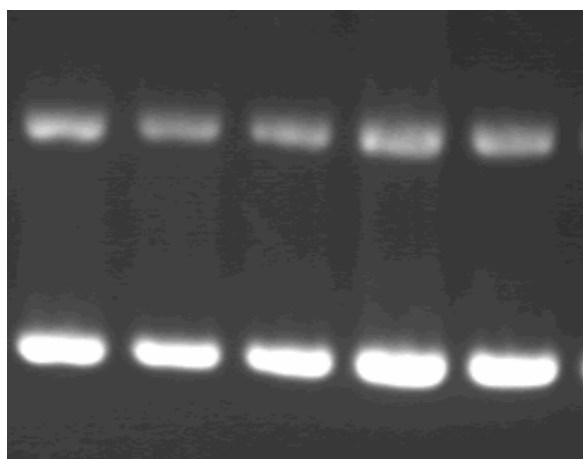


RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)

## CAPÍTOL 4

---

**SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DE NOUS COMPLEXOS DE Pt  
(II) AMB LLIGANDS DIAMINOQUELATANTS CONTENINT  
AMINOÀCIDS COM A SUBSTITUENTS. ESTUDI DE LLUR  
INTERACCIÓ AMB EL DNA I DE L'ACTIVITAT  
ANTITUMORAL.**



**Síntesi i caracterització de nous complexos de Pt(II) amb lligands diaminoquelatants contenint aminoàcids com a substituents. Estudi de llur interacció amb el DNA i de l'activitat antitumoral.**

## **ÍNDIX.**

1. RESUM	147
2. INTRODUCCIÓ	148
3. EXPERIMENTAL	150
3.1. Material i instrumentació	150
3.2. Síntesi dels lligands i complexos	152
3.3. Assaigs biològics	165
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	167
4.1. Síntesi i caracterització química dels lligands i complexos	167
4.1.1. Síntesi dels lligands.	167
4.1.2. Síntesi dels complexos.	172
4.1.3. Caracterització química dels lligands i complexos.	174
4.2. Assaigs biològics	183
4.2.1. Estudi de la interacció Pt-DNA per dicroisme circular	183
4.2.2. Estudi de la interacció Pt-GMP per RMN- <sup>1</sup> H	189
4.2.3. Estudi de la interacció Pt-DNA per electroforesi en gel d'agarosa	194
4.2.4. Imatges de microscopia de forces atòmiques	198
4.2.5. Assaigs de proliferació cel·lular	202
4.2.6. Determinació de la mort cel·lular per apoptosi	207
5. CONCLUSIONS	213
6. REFERÈNCIES	215
7. MATERIAL SUPLEMENTARI	219



## 1. RESUM.

En aquest capítol es descriu la síntesi i caracterització de vuit nous complexos de Pt(II) amb lligands diaminoquelatants que contenen **substituents de tipus aminoàcid** (éster metílic de L-alanina, L-alanina, L-fenilalanina i éster metílic de L-triptofà). L'activitat biològica d'alguns d'aquests compostos s'avalua en varies etapes: 1. interacció amb el DNA; 2. mecanisme d'actuació a través de la interacció Pt-GMP; 3. percentage de supervivència cel·lular; 4. tipus de mort cel·lular. A través dels espectres de dicromisme circular es demostra com la majoria d'aquests tipus de compostos interaccionen amb el DNA de forma similar al carboplatí després de 48 h d'incubació, i a través de les variacions del desplaçament electroforètic en gel d'agarosa s'aprecia com aquests complexos també modifiquen l'estructura terciària de l'àcid nucleic després de 24 h d'incubació. La interacció Pt-DNA es visualitza a través de les imatges de microscopia de forces atòmiques (AFM). El mecanisme d'actuació d'aquesta classe de complexos s'ha estudiat a través de la interacció Pt-5'GMP per RMN-<sup>1</sup>H, mostrant-se clarament que l'enllaç de l'adducte format és a través de la posició N7 de la guanina. S'ha determinat el temps de vida mitja ( $t_{1/2}$ ) de la formació dels adductes bifuncionals Pt-5'GMP.

Els complexos que tenen l'alanina com a substituent inhibeixen de forma remarcable la supervivència cel·lular en les línies HeLa (línia de carcinoma humà d'úter) i HL60 (línia de leucèmia aguda promielocítica), mostrant una tendència similar al carboplatí. L'efecte citotòxic dels complexos que contenen la fenilalanina no és tan important, i a més la disminució de la supervivència cel·lular que provoquen en funció de la concentració de complex és poc intensa. Aquests dos tipus de complexos serveixen d'exemple per poder veure com la voluminositat dels lligands afecta el transport d'aquests compostos a través de la membrana cel·lular, i en definitiva a llur activitat antitumoral. Els estudis realitzats per citometria de flux permeten comprovar que la mort cel·lular observada en els assaigs de proliferació es produeix per apoptosi i no per necrosi.

Els complexos del triptofà es mostren tan insolubles en medi aquós i en molts dissolvents orgànics, que no han estat escollits per l'estudi de l'activitat biològica.



## 2. INTRODUCCIÓ

L'èxit del cisplatí en la teràpia del càncer prové de la seva habilitat per unir-se covalentment al DNA i els canvis estructurals que produeix sobre aquest han pogut ser observats per microscopia de forces atòmiques.<sup>1,2,3,4</sup> En els darrers anys s'han desenvolupat nous complexos de Pt(II) menys tòxics que el cisplatí i alguns d'ells han estat estudiats satisfactòriament com a agents antitumorals actius.<sup>5,6,7,8</sup> La unió de grups bioactius a complexos de platí representa una bona aproximació al desenvolupament de nous compostos de platí amb una activitat més alta sobre cèl·lules tumorals i/o menor toxicitat sobre cèl·lules sanes. Com a grups bioactius s'han utilitzat intercal·ladors de DNA, aminoàcids, entre altres, obtenint-se resultats interessants respecte a l'activitat i/o especificitat.<sup>9,10</sup>

En aquesta línia d'estudi, des de l'any 1975 s'han descrit diversos complexos de Pt(II) amb aminoàcids.<sup>11,12</sup> Els compostos de Pt amb aminoàcids, pèptids i llurs derivats han atret l'atenció de molts científics des de fa molt de temps, i després del descobriment de les propietats antitumorals dels complexos de platí, llur estudi ha generat un interès addicional.<sup>13</sup> Tota una gran varietat de compostos d'aquest metall amb lligands  $\text{NH}_3$  i aminoàcids han estat preparats i analitzats,<sup>14</sup> de manera que s'ha detectat activitat antitumoral en alguns compostos en els quals l'estructura cis-PtCl<sub>2</sub> ha estat enllaçada a molècules portadores com a lligands inerts (per exemple terc-butilamina i aminoàcids N-coordinats). La síntesi de nous compostos de platí amb aminoàcids es basa en la possibilitat de transportar de forma selectiva i fàcil la fracció antitumoral Pt(NH<sub>3</sub>)<sup>2+</sup> a través de la membrana cap a l'interior de les cèl·lules tumorals, ja que els aminoàcids són utilitzats com a nutrients pel creixement cel·lular.<sup>13</sup>

Per tant, els aminoàcids són lligands interessants, no només per llur importància biològica, sinó també per la gran varietat de complexos que formen amb els metalls, i a més poden transportar espècies de platí a través de la membrana cel·lular.<sup>15,16,17,18</sup>

Tenint en compte aquestes propietats, s'ha realitzat la síntesi de nous complexos de Pt(II) amb lligands diaminoquelatants (de 2C i 3C) contenint tres tipus d'aminoàcids diferents com a substituents (L-alanina, L-fenilalanina i L-triptofà) (Figura 1). S'ha

estudiat l'activitat citotòxica de cada compost soluble en aigua i s'ha estudiat el mecanisme d'actuació a través de la interacció amb el DNA i 5'-GMP. En cada cas s'ha analitzat quines diferències s'observen en els resultats obtinguts segons la longitud de la cadena del lligand diaminoquelatant i segons el tipus de substituent de l'aminoàcid.

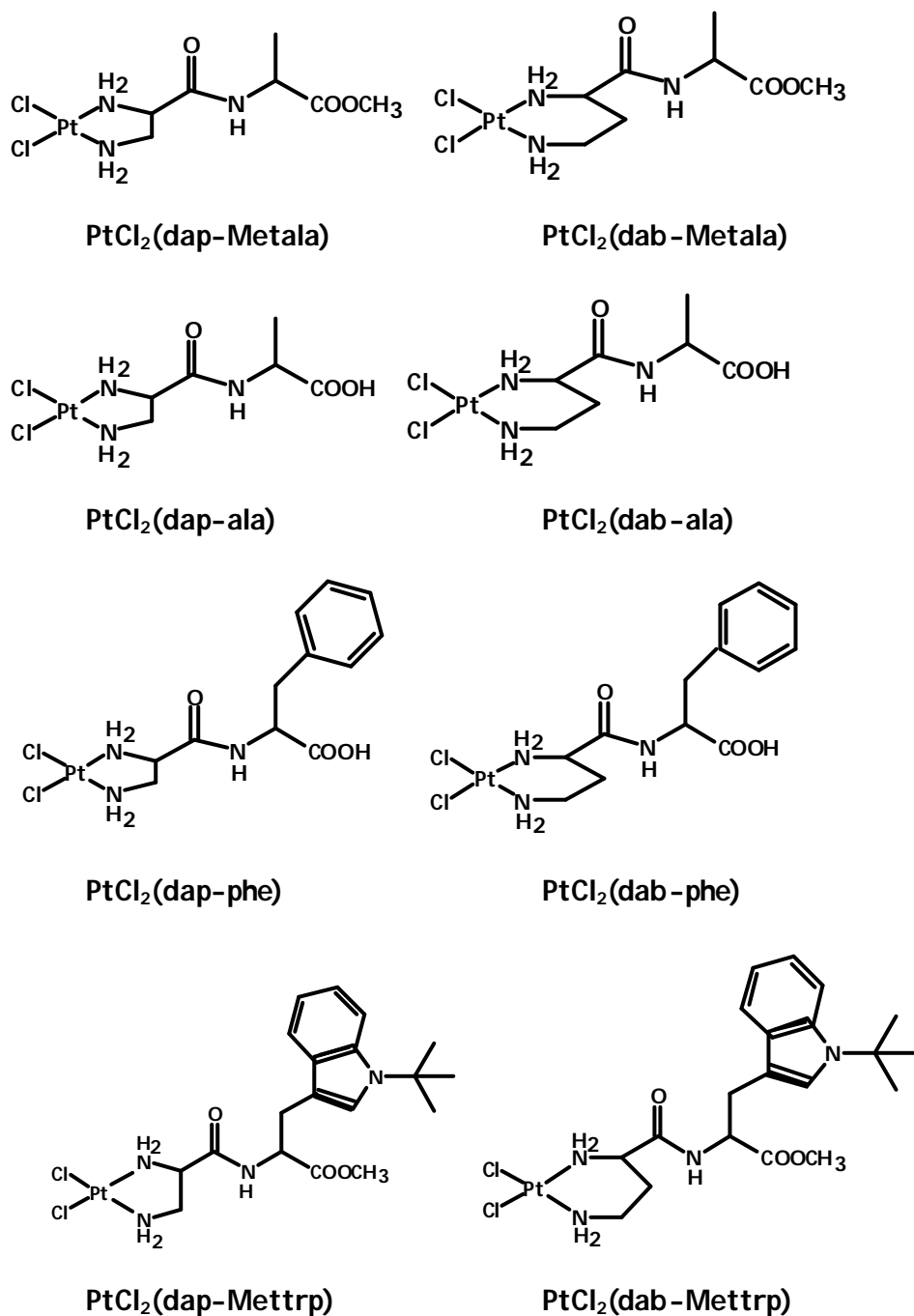


Figura 1. Estructura dels complexos de Pt(II) sintetitzats i estudiats.

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIAL I INSTRUMENTACIÓ

##### 3.1.2. Material.

Els reactius comercials han estat emprats sense purificació prèvia: àcid d,l-2,3-diaminopropiònic monohidroclorat 98% (Aldrich), àcid d,l-2,4-diaminobutíric dihidroclorat (Aldrich), bicarbonat sòdic (Panreac), àcid clorhídric 37% (Aldrich), di-terc-butil dicarbonat 97% (Aldrich), N-metilmorfolina 98% (Aldrich), cloroformiat d'isobutil 97% (Aldrich), àcid cítric (Panreac), sulfat magnèsic anhidre (Panreac), àcid trifluoroacètic 99% (Aldrich), éster metílic de L-alanina (Sigma), L-fenilalanina 97% (Aldrich), éster metílic de L-triptofà (Sigma), anisola 98% (Aldrich), la sal disòdica de 5'-GMP (Sigma), dihidrogenfosfat de potassi (J.T. Baker Chemicals), Calf Thymus-DNA (Sigma), plasmidi pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH).

El tetraclorplatínat de potassi,  $K_2PtCl_4$ , ha estat proporcionat per gentilesa de Johnson Matthey.

Els dissolvents de qualitat PS han estat obtinguts de Panreac i SDS.

El nitrogen gas ha estat subministrat per Abelló Linde.

El tampó TE (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH=7.4) i el DNA Calf-Thymus (Sigma) necessaris per la preparació de les mostres de dicroisme circular han estat proporcionats per la Universitat de Barcelona.

El tampó HEPES (40 mM HEPES, 10 mM  $MgCl_2$ , pH=7.4) i el plasmidi pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH) utilitzats per la preparació de les mostres de microscopia de forces atòmiques han estat proporcionats per la Universitat de Barcelona.

El tampó TBE (45 mM tris-[hidroximetil]aminometà, 45 mM àcid bòric, 1 mM EDTA, pH=8), l'agarosa (Ecogen) i el bromur d'etidi (ICN Biomedicals) necessaris pels gels d'electroforesi han estat proporcionats per l'àrea de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Girona.

Les dissolucions i medis pels assaigs de proliferació cel·lular i de detecció d'apoptosi han estat proporcionats per l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona: Solució del 0.4 % de blau de tripà (Gibco BRL,

USA), DMSO (Sigma), PBS (Gibco BRL, USA), suero fetal boví FBS (Gibco BRL, USA), solució antibiòtic-antimicòtic 100x (Gibco BRL, USA), piruvat 100 mM (Sebak, Alemanya), DMEM líquid amb GLUTAMAX (Gibco BRL, USA), IMDM líquid amb GLUTAMAX (Gibco BRL; USA), tripsina-EDTA solució (Gibco BRL, USA), kit EZ4U (Biomédica, Alemanya), kit Roche Annexin-V-Fluos Staining, tampó de lisis (10 mM Tris-HCl, pH=8.0, 100 mM EDTA pH= 8.0, 20 mg/mL RNAsa A), proteinassa K 10 mg/mL, NaCl 5M, gel d'agarosa al 1.5 %, 50x TAE, tampó d'aplicació de mostres 4x (45 mL formamida, 5 mL EDTA 0.1 M, 0.15 g blau de bromofenol, 0.15 g xilencianol, H<sub>2</sub>O fins a 100 mL), bromur d'etidi (Amresco, USA))

Medi complet amb FBS: medi + antibiòtic + 10% FBS.

Medi de congelació: 90% FBS + 10% DMSO.

### 3.1.2. Instrumentació.

Els espectres IR han estat enregistrats en estat sòlid (pastilla de KBr) en un espectròmetre FT-IR Mattson Satellite en el rang de 400-4000 cm<sup>-1</sup>. Els espectres de RMN-<sup>1</sup>H i RMN-<sup>13</sup>C han estat enregistrats en un espectròmetre Bruker DPX 200 utilitzant D<sub>2</sub>O i DMSO-d<sub>6</sub> com a dissolvents. Els espectres de RMN-<sup>1</sup>H per l'estudi de les interaccions Pt-GMP han estat enregistrats en un espectròmetre Bruker DPX 300 utilitzant D<sub>2</sub>O com a dissolvent i TMS com a referència externa a δ= 0 ppm. Els anàlisis elementals s'han portat a terme en un microanalitzador Carlo Erba 1108. Els espectres ESI-MS s'han realitzat en un espectròmetre Navigator Thermo Quest Finigan utilitzant MeOH/H<sub>2</sub>O com a fase mòbil. Les mesures de pH s'han realitzat a 298 °K amb un pHmetre Radiométer PHM 80.

Els espectres de dicroisme circular s'han obtingut en un espectropolarímetre J-600 (Jasco Europe) utilitzant una cel·la de quars rectangular de 1 cm. Els resultats han estat analitzats utilitzant el programari Jasco.

Les electroforesis en gel d'agarosa s'han realitzat en un tanc horitzontal Danaphor connectat a una font de voltatge variable Apelex Electrophoresis Power Supply st. 304. Els gels es fotografien en un sistema d'imatge Bio Rad Gel Doc 1000.

Les imatges de microscopia de forces atòmiques han estat preses a través d'un Nanoscope III Multimode AFM (Digital Instrumentals) operant a una velocitat de scan de 1-3 Hz. La sonda de AFM ha estat de 125  $\mu\text{m}$  de longitud i amb una punta de silici (Nanosensors GmbH) amb un freqüència de ressonància de  $f_0 = 330$  kHz i una constant de  $K = 50$  N/m.

En els assaigs de proliferació cel·lular in vitro, les mesures d'absorbància de les plaques de pouets s'han pres amb un lector Labsystems iEMS Reader MF a 450 nm i amb un filtre de referència de 620 nm. Com a indicador cromòfor s'ha utilitzat el Kit EZ4U basat en sals de tetrazol. Les mesures de citometria de flux s'han realitzat en el citòmetre FACSCALIBUR Becton Dickinson utilitzant el Kit Roche Annexina-V-Fluos Staining i l'aplicació simultània de iodur de propidi.

### 3.2. SÍNTESI DELS LLIGANDS I COMPLEXOS.

#### 3.2.1. Àcid di(terc-butil)-2,3-diaminopropiònic. [(BOC)<sub>2</sub>Hdap].

S'addicionen 17 mL (17 mmols) d'una dissolució de  $\text{NaHCO}_3$  1 M a l'àcid Hdap·2HCl (0.6 gr, 4.268 mmols). La solució resultant s'agita i es refreda en un bany de gel a 0°C i seguidament s'afegeix di-terc-butil dicarbonat ( $\text{BOC}_2\text{O}$ ) (2.32 gr, 10.630 mmols) dissolt en 10.6 mL de dioxà. La mescla resultant s'agita enèrgicament a 0°C durant 30 minuts i posteriorment es deixa en agitació a temperatura ambient durant 12 hores. Un cop transcorregut aquest temps, es torna a refredar la mescla a 0°C i s'acidifica amb HCl 3N fins a pH=2-3. La suspensió obtinguda s'extreu amb acetat d'etil (3x3 mL/mmol). La fase orgànica es renta amb aigua destil·lada i una solució saturada de NaCl i finalment s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre i es filtra. El dissolvent s'elimina per rotavaporació fins a obtenir un oli incolor, que un cop assecat al buit dona lloc a un sòlid blanc.

La formació del producte es segueix per cromatografia de capa prima, utilitzant sílica com a fase estacionària i una barreja de butanol/ $\text{H}_2\text{O}$ /àcid acètic (8:1:1) com a fase mòbil. Com a revelador s'empra una solució del 2% de ninhidrina en etanol.

**Rendiment:** 1.109 gr (3.644 mmols), 87.1%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3312 (st. NH), 2977-2931 (st.CH), 1741 (st. C=O àcid), 1695 (st. C=O BOC), 1527 ( $\delta_s$  NH, st.si. N-C=O), 1443 ( $\delta_{ip}$  NH), 1367 ( $\delta_s$  -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1280-1160 (st. CN,  $\gamma$ -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1.48 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 3.6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.33 (m, 1H, CH), 5.25-6.3 (m, 2H, NH), 8.22 (s, 1H, OH).

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 28 (CH<sub>3</sub>), 42 (CH<sub>2</sub>), 54 (CH), 156 (HN-C=O), 173 (C=O àcid).

**AE:** 7.75 %N, 51.87 %C, 8.15 %H. Calculat per C<sub>3</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>·1/2 EtOAc. (Mm= 348.40 gr/mol): 8.10 %N, 51.71 %C, 8.04 %H.

### 3.2.2. Àcid di(terc-butil)-2,4-diaminobutíric. [(BOC)<sub>2</sub>Hdab].

Seguint el mateix procediment que la síntesi de [(BOC)<sub>2</sub>Hdap] (Apartat 3.2.1., pàg. 152), s'addicionen 10.6 mL d'una dissolució de NaHCO<sub>3</sub> 1M a l'àcid Hdab·2HCl (0.412 gr, 2.113 mmols). Un cop agitada i refredada la barreja, s'afegeix (BOC)<sub>2</sub>O (1.172 gr, 5.369 mmols) dissolt en 5.4 mL de dioxà. Finalment s'obté un oli incolor, que un vegada assecat al buit dona lloc a un sòlid blanc.

**Rendiment:** 0.497gr (1.561 mmols), 73.9%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3343-3375 (st. NH), 2977 (st.CH), 1725 (st. C=O àcid), 1689 (st. C=O BOC), 1529 ( $\delta_s$  NH, st.si. N-C=O), 1453 ( $\delta_{ip}$  NH), 1366 ( $\delta_s$  -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1295-1252 (st. CN,  $\gamma$ -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1.45 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.1 (m, 1H, CH), 5.46 (m, 2H, NH), 6.6 (s, 1H, OH).

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 28.3 (CH<sub>3</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 36.8 (N-CH<sub>2</sub>), 67.1 (CH), 157 (HN-C=O), 174 (C=O àcid).

**AE:** 8.39 %N, 52.56 %C, 8.26 %H. Calculat per C<sub>4</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> (Mm= 318.37 gr/mol): 8.80 %N, 52.82 %C, 8.23 %H.

### 3.2.3. Éster 2-(1,2-diaminoetilcarboxiamida)propionat de metil di(trifluoroacetilat). [(dap-Metala)· 2CF<sub>3</sub>COOH].

S'addicionen 15 mL de THF anhidre a [(BOC)<sub>2</sub>Hdap] (0.471 gr, 1.548 mmols) sota atmosfera de nitrogen. La dissolució s'agita i es refreda a -15 °C en un bany de gel/NaCl. Un cop refredada, s'addicionen 0.186 mL de N-metilmorfolina (1.692 mmols) i 0.206 mL de cloroformiat d'isobutil (1.588 mmols). La mescla es deixa en agitació durant 5 minuts.

Posteriorment, s'afegeix una dissolució aquosa de l'hidroclorur de l'èster metílic de L-alanina (0.169 gr, 1.211 mmols) prèviament neutralitzada amb una dissolució de NaHCO<sub>3</sub> (0.152 gr, 1.809 mmols). La mescla obtinguda es deixa en agitació a 0°C durant 4 hores.

La formació del producte es segueix per cromatografia de capa prima en sílica i utilitzant com a fase mòbil una barreja H<sub>2</sub>O/àcid acètic (9:1) i CHCl<sub>3</sub>/metanol (95:5). Com a revelador s'empra una solució del 2% de ninhidrina en etanol.

Una vegada finalitzat el temps de reacció, s'elimina el dissolvent per rotavaporació. El residu obtingut es dissol en EtOAc, quedant part del residu sense solubilitzar-se. La suspensió s'extreu amb una dissolució d'àcid cítric 10% (3x3 mL), H<sub>2</sub>O (3x3 mL), NaHCO<sub>3</sub> 10% (3x3 mL) i una solució saturada de NaCl (3x3 mL), observant-se que el residu inicialment insoluble en la fase orgànica es solubilitza en la fase aquosa. La fase orgànica s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora a sequetat obtenint-se un oli incolor, el qual és finalment assecat al buit donant lloc a un sòlid blanc.

Per portar a terme la desprotecció dels grups amina, es dissol el producte obtingut amb 3 mL d'una dissolució de CF<sub>3</sub>COOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40:60) i es deixa en agitació durant 1 hora. Es rotavapora el dissolvent contenint part del CF<sub>3</sub>COOH i sobre el residu obtingut es fa passar un corrent continu de nitrogen gas, per tal de poder eliminar el trifluoroacètic restant. L'oli obtingut es dissol en aigua i es realitzen extraccions successives amb éter dietílic. Finalment s'evapora la fase aquosa i s'asseca el producte obtingut al buit per tal d'eliminar tota l'aigua i es conserva tapat amb atmosfera de nitrogen i en un dessecador.

**Rendiment:** 0.288 gr (0.690 mmols), 60.84%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3073 ba (st. NH, st. CH), 1750-1600 (st. C=O éster, amida,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ), 1560 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1458 ( $\delta_{\text{si}}$   $\text{NH}_3^+$ ), 1438 ( $\delta_{\text{ip}}$  NH), 1204 (st. CN, st. CO), 1138 (st. CF), 723 (st.si. COO,  $\text{CF}_3\text{COO}$ ).

**RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1.35 (d, 3H, C- $\text{CH}_3$ ,  $J=3\text{Hz}$ ), 3.48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.68 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  éster), 4.28 (m, 1H, CH alanina), 4.55 (M, 1H, CH).

**RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300K):**  $\delta$  (ppm)= 18.7 ( $\text{CH}_3$ alanina), 43.9 ( $\text{CH}_2$ ), 51.82 (CH), 54.34 (CH alanina), 56.3 ( $\text{CH}_3$  éster), 110-127 ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ), 165.6 (C=O,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ), 173.49 (C=O amida), 177.7 (C=O éster).

**AE:** 9.48 %N, 31.83 %C, 4.77 %H. Calculat per  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{N}_3\text{F}_6 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$  (Mm= 426.26 gr/mol): 9.86 %N, 30.99 %C, 4.26 %H.

**ESI -MS ( $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ ):**  $[\text{M}-2\text{CF}_3\text{COO}-\text{H}]^+ = 190.4 \text{ m/z}$

### 3.2.4. Éster 2-(1,3-diaminopropilcarboxiamida)propionat de metil di(trifluoroacetilat) [(dab-Metala)· $2\text{CF}_3\text{COOH}$ ].

S'addicionen 10 mL de THF anhidre a  $[(\text{BOC})_2\text{Hdab}]$  (0.296 gr, 0.929 mmols) sota atmosfera de nitrogen. La dissolució s'agita i es refreda a  $-15^\circ\text{C}$  en un bany de gel/ $\text{NaCl}$ . Un cop refredada, s'addicionen 0.110 mL de N-metilmorfolina (1.000 mmols) i 0.120 mL de cloroformiat d'isobutil (0.925 mmols). La mescla es deixa en agitació durant 5 minuts.

Posteriorment, s'afegeix una dissolució aquosa de l'hidroclorur de l'èster metílic de L-alanina (0.100 gr, 0.716 mmols) prèviament neutralitzada amb una dissolució de  $\text{NaHCO}_3$  (0.060 gr, 1.716 mmols). La mescla obtinguda es deixa en agitació a  $0^\circ\text{C}$  durant 4 hores.

Per l'obtenció final del producte, es segueix el mateix procediment que  $[(\text{dap-Metala})\cdot 2\text{CF}_3\text{COOH}]$  (Apartat 3.2.3., pàg. 154), obtenint un sòlid blanc que es conserva sec i sota atmosfera de nitrogen.

**Rendiment:** 0.252 gr (0.584 mmols), 81.84%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3400-2900 (st. NH, st. CH), 1750-1600 (st. C=O éster, amida,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ), 1559 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1450 ( $\delta_{\text{si}}$   $\text{NH}_3^+$ ), 1437 ( $\delta_{\text{ip}}$  NH), 1202 (st. CN, st. CO), 1140 (st. CF), 724 (st.si. COO,  $\text{CF}_3\text{COO}$ ).



**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1.60 (d, 3H, C-CH<sub>3</sub>, J=3Hz), 2.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub> éster), 3.85 (t, 1H, CH alanina, J=3Hz), 4.2 (m, 1H, CH).

**RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 18.7 (CH<sub>3</sub>alanina), 31.5 (CH<sub>2</sub>), 38.18 (N-CH<sub>2</sub>), 51.82 (CH), 53.5 (CH alanina), 55.9 (CH<sub>3</sub> éster), 116.3-122.1 (CF<sub>3</sub>COOH), 171.5 (C=O amida), 177.2 (C=O éster).

**AE:** 9.25 %N, 33.14 %C, 4.91 %H. Calculat per G<sub>2</sub>H<sub>19</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>F<sub>6</sub>·1/2 H<sub>2</sub>O (Mm= 440.29 gr/mol): 9.54 %N, 32.70 %C, 4.76 %H.

**ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O):** [M-2CF<sub>3</sub>COO-H<sup>+</sup>]<sup>+</sup> = 204.2 m/z

### 3.2.5. Àcid 2-(1,3-diaminoetilcarboxiamida)-3-fenilpropioníc di(trifluoroacetilat). [(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH].

S'addicionen 10 mL de THF anhidre a [(BOC)<sub>2</sub>Hdap] (0.284 gr, 0.932 mmols) sota atmosfera de nitrogen. La dissolució s'agita i es refreda a -15 °C en un bany de gel/NaCl. Un cop refredada, s'addicionen 0.112 mL de N-metilmorfolina (1.008 mmols) i 0.126 mL de cloroformiat d'isobutil (0.940 mmols). La mescla es deixa en agitació durant 5 minuts.

Posteriorment, s'afegeix una dissolució aquosa de L-fenilalanina (0.120 gr, 0.718 mmols), i la mescla obtinguda es deixa en agitació a 0°C durant 4 hores.

Per l'obtenció final del producte, es segueix el mateix procediment que [(dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH] (Apartat 3.2.3., pàg. 154), obtenint-se un sòlid blanc que es conserva sec i sota atmosfera de nitrogen.

**Rendiment:** 0.246 gr (0.514 mmols), 70.73%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3234-3000 (st. NH, st. CH arom., CH alif.), 1750-1600 (st. C=O àcid, amida, CF<sub>3</sub>COOH), 1569 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1439 ( $\delta_{si}$  NH<sub>3</sub><sup>+</sup>,  $\delta_{ip}$  NH), 1205 (st. CN, st. CO), 1140 (st. CF), 724 (st.si. COO<sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**RMN-<sup>1</sup>H (Acetona d<sub>6</sub>, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 3.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub> phe), 3.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.16 (m, 1H, CH), 4.75 (m, 1H, CH phe), 7.30 (m, 5H, CH arom.)

**RMN-<sup>13</sup>C (Acetona d<sub>6</sub>, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 36.77 (CH<sub>2</sub> phe), 39.37 (CH<sub>2</sub>), 50.58 (CH), 55.94 (CH phe), 113.33-119.12 (CF<sub>3</sub>COOH), 127.04-136.9 (C arom.), 161.5 (C=O CF<sub>3</sub>COOH), 165.90 (C=O amida), 175.64 (C=O àcid).

**AE:** 7.14 %N, 35.21 %C, 3.90 %H. Calculat per  $C_{16}H_{19}O_7N_3F_6 \cdot 4H_2O$  (Mm= 533.38 gr/mol):  
7.88 %N, 36.03 %C, 4.72 %H.

**ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O):**  $[M-2CF_3COO-H]^+ = 252.1$  m/z

### 3.2.6. Àcid 2-(1,3-diaminopropilcarboxiamida)-3-fenilpropioníc di(trifluoroacetilat). [(dab-phe)· 2CF<sub>3</sub>COOH].

S'addicionen 10 mL de THF anhidre a [(BOC)<sub>2</sub>Hdab] (0.250 gr, 0.785 mmols) sota atmosfera de nitrogen. La dissolució s'agita i es refreda a -15 °C en un bany de gel/NaCl. Un cop refredada, s'addicionen 0.092 mL de N-metilmorfolina (0.837 mmols) i 0.102 mL de cloroformiat d'isobutil (0.786 mmols). La mescla es deixa en agitació durant 5 minuts.

Posteriorment, s'afegeix una dissolució aquosa de L-fenilalanina (0.100 gr, 0.605 mmols), i la mescla obtinguda es deixa en agitació a 0°C durant 4 hores.

Per l'obtenció final del producte, es segueix el mateix procediment que [(dap-Metala)-2CF<sub>3</sub>COOH] (Apartat 3.2.3., pàg. 154), obtenint-se un sòlid blanc que es conserva sec i sota atmosfera de nitrogen.

**Rendiment:** 0.171 gr (0.346 mmols), 57.28%.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3403-2900 (st. NH, st. CH arom., CH alif), 1750-1600 (st. C=O àcid, amida, CF<sub>3</sub>COOH), 1547 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1438 ( $\delta_{si}$  NH<sub>3</sub><sup>+</sup>,  $\delta_{ip}$  NH), 1203-1140 (st. CN, st. CO, st. CF), 724 (st.si. COO<sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 2.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.33-3.40 (m, 4H, CH<sub>2</sub> phe, N-CH<sub>2</sub>), 3.94 (m, 1H, CH), 7.25 (m, 5H, CH arom.)

**RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 31.49 (CH<sub>2</sub>), 37.98 (CH<sub>2</sub> phe), 40.31 (CH<sub>2</sub>), 53.72 (CH), 59.81 (CH phe), 116.34-122.14 (CF<sub>3</sub>COOH), 129.73-140.95 (C arom.), 161.5 (C=O CF<sub>3</sub>COOH), 170.85 (C=O amida), 180.45 (C=O àcid).

**AE:** 7.31 %N, 37.02 %C, 4.48 %H. Calculat per  $C_{17}H_{21}O_7N_3F_6 \cdot 3H_2O$  (Mm= 547.41 gr/mol):  
7.68 %N, 37.30 %C, 4.97 %H.

**ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O):**  $[M-2CF_3COO-H]^+ = 266.3$  m/z

### 3.2.7. Éster 3-[1-(terc-butil)-1H-3-indolil]-2-(1,2-diaminoetilcarboxiamida) - propionat de metil di(trifluoroacetilat). [(dap-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH]

S'addicionen 10 mL de THF anhidre a [(BOC)<sub>2</sub>Hdap] (0.284 gr, 0.933 mmols) sota atmosfera de nitrogen. La dissolució s'agita i es refreda a -15 °C en un bany de gel/NaCl. Un cop refredada, s'addicionen 0.110 mL de N-metilmorfolina (1.000 mmols) i 0.120 mL de cloroformiat d'isobutil (0.925 mmols). La mescla es deixa en agitació durant 5 minuts.

Posteriorment, s'afageix una dissolució aquosa de l'hidroclorur de l'éster metílic de L-triptofà (0.182 gr, 0.714 mmols) prèviament neutralitzada amb una dissolució de NaHCO<sub>3</sub> (0.152 gr, 1.785 mmols). La mescla obtinguda es deixa en agitació a 0 °C durant 4 hores.

Per l'obtenció final del producte, es segueix el mateix procediment que [(dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH] (Apartat 3.2.3, pàg 154), però addicionant en l'etapa de desprotecció del grup BOC un 1% d'anisola a la mescla de trifluoroacètic. Finalment s'obté un sòlid blanc que es conserva sec i sota atmosfera de nitrogen.

**Rendiment:** 0.160 gr (0.300 mmols), 42.1 %.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3232-3059 (st. NH, st. CH arom.), 2961 (st.CH), 1750-1600 (st. C=O éster, amida, CF<sub>3</sub>COOH), 1549 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1450-1439 ( $\delta_{si}$  NH<sub>3</sub><sup>+</sup>,  $\delta_{ip}$  NH), 1204-1138 (st. CN, st. CO, st. CF), 724 (st.si. COO<sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**RMN-<sup>1</sup>H (Acetona d<sub>6</sub>, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1-2 (m, N<sub>arom</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 3.2 (m, 2H, CH<sub>2</sub> trp), 3.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.72 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.5 (m, 1H, CH), 4.78 (m, 1H, CH trp), 7.02-7.59 (m, 5H, CH arom.)

**RMN-<sup>13</sup>C (Acetona d<sub>6</sub>, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 28.2 (CH<sub>2</sub> trp), 29 (CH<sub>3</sub> terc-butil), 44.0 (CH<sub>2</sub>), 53.0(CH<sub>3</sub>), 55.0 (CH), 57.8 (CH trp), 112.1-137.8 (CH arom), 161.07 (C=O CF<sub>3</sub>COOH), 161.8 (C=O amida), 172.6 (C=O éster).

**AE:** 10.18%N, 42.78 %C, 4.61 %H. Calculat per C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub>F<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O (Mm= 642.55 gr/mol): 8.72 %N, 42.99 %C, 5.65 %H.

**ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O):** [M-2CF<sub>3</sub>COO-H<sup>+</sup>]<sup>+</sup> = 361 m/z

**3.2.8. Éster 3-[1-(terc-butil)-1H-3-indolil]-2-(1,3-diaminopropilcarboxiamida) - propionat de metil di(trifluoroacetilat). [(dab-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH].**

S'addicionen 20 mL de THF anhidre a [(BOC)<sub>2</sub>Hdab] (0.324 gr, 1.018 mmols) sota atmosfera de nitrogen. La dissolució s'agita i es refreda a -15 °C en un bany de gel/NaCl. Un cop refredada, s'addicionen 0.120 mL de N-metilmorfolina (1.090 mmols) i 0.132 mL de cloroformiat d'isobutil (1.018 mmols). La mescla es deixa en agitació durant 5 minuts.

Posteriorment, s'afageix una dissolució aquosa de l'hidroclorur de l'éster metílic de L-triptofà (0.200 gr, 0.786 mmols) prèviament neutralitzada amb una dissolució de NaHCO<sub>3</sub> (0.064 gr, 0.760 mmols). La mescla obtinguda es deixa en agitació a 0 °C durant 4 hores.

Per l'obtenció final del producte, es segueix el mateix procediment que [(dap-trp)·2CF<sub>3</sub>COOH] (Apartat 3.2.7, pàg. 158), obtenint-se un sòlid blanc que es conserva sec i sota atmosfera de nitrogen.

**Rendiment:** 0.308 gr (0.510 mmols), 65.2 %.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3249-2959 (st. NH, st. CH arom., st.CH), 1750-1600 (st. C=O éster, amida, CF<sub>3</sub>COOH), 1543 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1437 ( $\delta_{si}$  NH<sub>3</sub><sup>+</sup>,  $\delta_{ip}$  NH), 1203-1137 (st. CN, st. CO, st. CF), 723 (st.si. COO<sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1-2 (m, N<sub>arom</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 2.13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub> trp), 3.18 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 3.3 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.9 (m, 1H, CH), 4.9 (m, 1H, CH trp), 7.07-7.6 (m, 5H, CH arom.)

**RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 29.2 (CH<sub>2</sub>), 31.2 (CH<sub>2</sub> trp), 37.5 (N-CH<sub>2</sub>), 53.5 (CH<sub>3</sub>), 55.9 (CH), 56.8 (CH trp), 111.6-139.0 (CH arom), 171.4 (C=O amida), 176.4 (C=O éster).

**AE:** 9.68 %N, 43.53 %C, 4.82 %H. Calculat per C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub>F<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O (Mm= 656.58 gr/mol): 8.53 %N, 43.90 %C, 5.83 %H.

**ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O):** [M-2CF<sub>3</sub>COO-H]<sup>+</sup> = 375 m/z

### 3.2.9. Cis-diclor-(2-(1,2-diaminoetil carboxiamida)propionat de metil)platí (II).

#### [PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala)]

S'addicionen 3 mL d' una dissolució de NaHCO<sub>3</sub> (0.126gr, 1.785 mmols) a una solució aquosa (2 mL) de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (0.27 gr, 0.648 mmols). Seguidament, s'afegeix lentament una dissolució aquosa de [(dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH] (0.3 gr, 0.717 mmols), i la mescla resultant es deixa en agitació a temperatura ambient durant 2 dies, en el transcurs dels quals s'observa la formació d'un precipitat taronja. El producte es filtra i es renta amb aigua , etanol i éter dietílic, per finalment assecar-lo al buit.

**Rendiment:** 0.105 gr (0.231 mmols), 36%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3259-3207 (st. NH), 3104-2940 (st. CH), 1741 (st. C=O éster), 1669 (st. C=O amida), 1567 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1453 ( $\delta_{ip}$  NH), 1219-1152 (st. CN, st. CO).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1.3 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, J= 3Hz), 2.6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.7 (s, 3H, CH<sub>3</sub> éster), 4.36 (m, 1H, CH), 5.15 (m, 1H, CH), 5.59-5.95 (m, 4H, NH), 8.7 (d, 1H, NH amida, J=3Hz)

**AE:** 8.61 %N, 18.90 %C, 3.93 %H. Calculat per PtCl<sub>2</sub>C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>·1/2 H<sub>2</sub>O (Mm= 469.22 gr/mol): 8.96 %N, 17.92 %C, 3.44 %H.

### 3.2.10. Cis-diclor-(2-(1,3-diaminopropilcarboxiamida)propionat de metil)platí (II).

#### [PtCl<sub>2</sub>(dab-Metala)]

S'addicionen 3 mL d' una dissolució de NaHCO<sub>3</sub> (0.120gr, 0.93 mmols) a una solució aquosa (2 mL) de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (0.20 gr, 0.48 mmols). Seguidament, s'afegeix lentament una dissolució aquosa de [(dab-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH] (0.25 gr, 0.58 mmols), i la mescla resultant es deixa en agitació a temperatura ambient durant 2 dies, en el transcurs dels quals s'observa la formació d'un precipitat taronja. El producte es filtra i es renta amb aigua , etanol i éter dietílic, per finalment assecar-lo al buit.

**Rendiment:** 0.055 gr (0.011 mmols), 20.6%.

**IR (KBr):**  $\text{cm}^{-1}$  = 3293-3196 (st. NH), 3127-2955 (st. CH), 1740 (st. C=O éster), 1665 (st. C=O amida), 1578 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1455 ( $\delta_{\text{ip}}$  NH), 1236-1154 (st. CN, st. CO).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO, 300K):**  $\delta$  (ppm) = 1.38 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, J = 3Hz), 1.8 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub> éster), 4.39 (m, 1H, CH), 4.6-6 (m, 4H, NH), 8.66 (d, 1H, NH amida, J=3Hz)

**AE:** 8.36 %N, 19.92 %C, 3.77 %H. Calculat per PtCl<sub>2</sub>C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O (Mm = 487.24 gr/mol): 8.62 %N, 19.72 %C, 3.93 %H.

### 3.2.11. Cis-diclor-(2-(1,2-diaminoetilcarboxiamida)-3-fenilpropionic)platí(II). [PtCl<sub>2</sub>(dap-phe)].

S'addicionen 3 mL d'una dissolució de NaHCO<sub>3</sub> (0.155gr, 1.845 mmols) a una solució aquosa (2 mL) de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (0.18 gr, 0.435 mmols). Seguidament, s'afegeix lentament una dissolució aquosa de [(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH] (0.25 gr, 0.525 mmols), i la mescla resultant es deixa en agitació a temperatura ambient durant 24 hores. Passat aquest temps, s'acidifica la mescla amb HCl 3N fins a pH = 1-2 i es manté l'agitació durant unes hores. El producte obtingut es filtra i es renta amb etanol absolut i éter dietílic, per finalment assecar-lo al buit.

**Rendiment:** 0.095 gr (0.185 mmols), 35.9%.

**IR (KBr):**  $\text{cm}^{-1}$  = 3218-2900 (st. NH, st. CH arom, st. CH alif), 1724 (st. C=O àcid), 1670 (st. C=O amida), 1548 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1448 ( $\delta_{\text{ip}}$  NH), 1223 ba (st. CN, st. CO).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO, 300K):**  $\delta$  (ppm) = 2-2.3 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.9-3 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.5-5.9 (m, 4H, NH), 7.33-7.35 (m, 5H, CH arom.), 8.55 (m, 1H, NH amida)

**AE:** 7.35 %N, 26.63 %C, 3.65 %H. Calculat per PtCl<sub>2</sub>C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (Mm = 517.27 gr/mol): 8.12 %N, 27.86 %C, 3.31 %H.

**ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O):** [M-H<sup>+</sup>]<sup>-</sup> = 516 m/z

**3.2.12. Cis-diclor-(2-(1,3-diaminopropilcarboxiamida)-3-fenilpropioníc)platí (II). [PtCl<sub>2</sub>(dab-phe)].**

S'addicionen 3 mL d'una dissolució de NaHCO<sub>3</sub> (0.145gr, 1.725 mmols) a una solució aquosa (2 mL) de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (0.21 gr, 0.505 mmols). Seguidament, s'afegeix lentament una dissolució aquosa de [(dab-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH] (0.25 gr, 0.505 mmols), i la mescla resultant es deixa en agitació a temperatura ambient durant 24 hores. Passat aquest temps, s'acidifica la mescla amb HCl 3N fins a pH= 1-2 i es manté l'agitació durant unes hores. El producte obtingut es filtra i es renta amb etanol absolut i éter dietílic, per finalment assecar-lo al buit.

**Rendiment:** 0.100 gr (0.185 mmols), 37.7%.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3218-2955 (st. NH, st. CH arom, st. CH alif), 1722 (st. C=O àcid), 1663 (st. C=O amida), 1544 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1438 ( $\delta_{ip}$  NH), 1234 ba (st. CN, st. CO).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 2.3 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub> phe), 4.58-5.9 (m, 5H, 2NH<sub>2</sub>, CH), 7.33-7.35 (m, 5H, CH arom.), 8.55 (m, 1H, NH amida)

**AE:** 7.18 %N, 27.99 %C, 3.94 %H. Calculat per PtCl<sub>2</sub>C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O (Mm= 567.33 gr/mol): 7.41 %N, 27.52 %C, 4.09 %H.

**ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O):** [M-H<sup>+</sup>]<sup>-</sup> = 530 m/z

**3.2.13. Cis-diclor-(2-(1,2-diaminoetilcarboxiamida)propioníc)platí (II). [PtCl<sub>2</sub>(dap-ala)].**

Una suspensió del complex [PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala)] (0.1 gr, 0.220 mmols) en 10 mL de tampó fosfat pH=7 s'escalfa a 37 °C durant 24h. La solució resultant es filtra i es rotavapora a sequetat i el residu es dissol en aigua i s'acidifica amb HCl 3N fins a pH=2. La solució es concentra i es refreda fins a observar la formació d'un precipitat de color groc. El producte es filtra i es renta amb acetona i éter dietílic, per finalment assecar-lo al buit.

**Rendiment:** 0.032gr (0.077 mmols), 34.58%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3500-3300 (st. OH), 3300-3200 (st. NH), 3120-2940 (st. CH), 1734 (st. C=O àcid), 1675 (st. C=O amida), 1568 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1457 ( $\delta_{\text{ip}}$  NH), 1230-1150 (st. CN, st. CO).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 2.17 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, J= 3Hz), 3.54-3.67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.21-4.46 (m, 1H, CH), 5.17 (m, 1H, CH).

**AE:** 8.47 %N, 17.78 %C, 3.61 %H. Calculat per PtCl<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>·1/3 (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (Mm= 460.53 gr/mol): 9.12 %N, 18.25 %C, 3.28 %H.

**ESI -MS (MeOH/H<sub>2</sub>O):** [M-H<sup>+</sup>]<sup>-</sup>= 440 m/z

### 3.2.14. Cis-diclor-(2-(1,3-diaminopropilcarboxiamida)propionic)platí(II). [PtCl<sub>2</sub>(dab-ala)].

Una suspensió del complex [PtCl<sub>2</sub>(dab-Metala)] (0.07 gr, 0.149 mmols) en 7 mL de tampó fosfat pH=7 s'escalfa a 37 °C durant 24h. La solució resultant es filtra i es rotavapora a sequetat i el residu es dissol en aigua i s'acidifica amb HCl 3N fins a pH=2. La solució es concentra i es refreda fins a observar la formació d'un precipitat de color groc pàl·lid. El producte es filtra i es renta amb acetona i éter dietílic, per finalment assecat-lo al buit.

**Rendiment:** 0.028gr (0.061 mmols), 41.25%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3500-3300 (st. OH), 3240-3190 (st. NH), 3100-2900 (st. CH), 1741 (st. C=O àcid), 1664 (st. C=O amida), 1577 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1457 ( $\delta_{\text{ip}}$  NH), 1238-1150 (st. CN, st. CO).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1.18 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, J= 3Hz), 1.54-1.91 (m, 2H, CH<sub>2</sub>) 2.52-2.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.38 (m, 1H, CH), 4.17 (m, 1H, CH).

**AE:** 8.12 %N, 18.41 %C, 3.73 %H. Calculat per PtCl<sub>2</sub>C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>·1/2 H<sub>2</sub>O (Mm= 460.53 gr/mol): 9.05 %N, 18.11 %C, 3.05 %H.

**ESI -MS (MeOH/H<sub>2</sub>O):** [M-H<sup>+</sup>]<sup>-</sup>= 454 m/z



**3.2.15. Cis-diclor-(3-[1-(terc-butil)-1H-3-indolil]-2-1,2-diaminoetilcarboxiamida) propionat de metilplatí (II). [PtCl<sub>2</sub>(dap-Mettrp)].**

S'addicionen 2 mL d'una dissolució de NaHCO<sub>3</sub> (0.054 gr, 0.66 mmols) a una solució aquosa (2 mL) de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (0.09 gr, 0.222 mmols). Seguidament, s'afageix lentament una dissolució aquosa de [(dap-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH] (0.141 gr, 0.267 mmols), i la mescla resultant es deixa en agitació a temperatura ambient durant 2 dies, en el transcurs dels quals s'observa la formació d'un precipitat taronja. El producte es filtra i es renta amb aigua, etanol i éter dietílic, per finalment assecar-lo al buit.

**Rendiment:** 0.084 gr (0.147 mmols), 67.8%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3368-3247 (st. NH), 3119 (st. CH arom.), 2954 (st.CH), 1734 (st. C=O éster), 1672 (st. C=O amida), 1568 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1455 ( $\delta_{ip}$  NH), 1223-1099 (st. CN, st. CO).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO d, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1-2 (m, N<sub>arom</sub>-C-CH<sub>3</sub>), 3.2 (m, 2H, CH<sub>2</sub> trp), 3.6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.2 (m, 1H, CH), 4.6 (m, 1H, CH trp), 5.51 (m, 4H, NH), 7.05-7.6 (m, 5H, CH arom.), 9.0 (d, 1H, NH amida, J=3 Hz)

**AE:** 9.76 %N, 35.68 %C, 4.47 %H. Calculat per PtCl<sub>2</sub>C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>·1/2H<sub>2</sub>O (Mm= 635.44 gr/mol): 8.82 %N, 35.91 %C, 4.61 %H.

**3.2.16. Cis-diclor-(3-[1-(terc-butil)-1H-3-indolil]-2-(1,3-diaminopropilcarboxiamida)propionat de metilplatí (II). [PtCl<sub>2</sub>(dab-Mettrp)].**

S'addicionen 2 mL d'una dissolució de NaHCO<sub>3</sub> (0.051 gr, 0.606 mmols) a una solució aquosa (2 mL) de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (0.084 gr, 0.201 mmols). Seguidament, s'afageix lentament una dissolució aquosa de [(dap-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH] (0.150 gr, 0.249 mmols), i la mescla resultant es deixa en agitació a temperatura ambient durant 2 dies, en el transcurs dels quals s'observa la formació d'un precipitat taronja. El producte es filtra i es renta amb aigua, etanol i éter dietílic, per finalment assecar-lo al buit.

**Rendiment:** 0.084 gr (0.132 mmols), 64.4%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3367-3232 (st. NH), 3131 (st. CH arom.), 2954 (st.CH), 1736 (st. C=O éster), 1669 (st. C=O amida), 1580-1544 ( $\delta$  NH, st.si. N-C=O), 1439 ( $\delta_{\text{ip}}$  NH), 1221 (st. CN, st. CO).

**RMN- $^1\text{H}$  (DMSO d, 300K):**  $\delta$  (ppm)= 1-2 (m,  $\text{N}_{\text{arom}}\text{-C-CH}_3$ ), 2.2 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.3 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  trp), 3.6-3.7 (senyals emmascarats pel dissolvent: N- $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ , CH), 4.7 (m, 1H, CH trp), 5.1-6.3 (m, 4H, NH), 7.13-7.62 (m, 5H, CH arom.), 8.91 (m, 1H, NH amida)

**AE:** 8.78 %N, 31.70 %C, 4.31 %H. Calculat per  $\text{PtCl}_2\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{N}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Mm= 730.47 gr/mol): 7.67 %N, 32.88 %C, 5.53 %H.

### 3.3. ASSAIGS BIOLÒGICS.

#### 3.3.1. Estudi de la interacció Pt-DNA per dicroisme circular.

Per la preparació de les mostres i la realització de les mesures de dicroisme circular es segueix la mateixa metodologia que la descrita en el Capítol 3, apartat 3.3.1. pàg 81.

#### 3.3.2. Estudi de la interacció Pt-GMP per RMN- $^1\text{H}$ .

La preparació de les mostres i la realització dels espectres s'ha portat a terme segons el mètode descrit en el Capítol 3, apartat 3.3.2, pàg. 82, utilitzant però una concentració dels complexos de 4 mM i una concentració de 5'-GMP de 8 mM. En els complexos amb problemes de solubilització ha calgut addicionar un 10% DMF- $d_7$ .

#### 3.3.3. Estudi de la interacció Pt-DNA per electroforesi en gel d'agarosa.

La preparació de les mostres i llur aplicació en el gel, així com la preparació del gel d'agarosa es realitza segons el mètode ja descrit en el Capítol 3, apartat 3.3.3, pàg. 83.

El voltatge aplicat i el temps emprat per cada mostra ha estat de: 0.7 V/cm durant 16 h en el cas dels compostos de l'alanina, i 5 V/cm durant 4h en el cas dels compostos de la fenilalanina.

### **3.3.4. Microscopia de forces atòmiques (AFM).**

La preparació i incubació de les mostres, i la visualització de les imatges de AFM s'ha realitzat segons la metodologia ja descrita en el capítol 3, apartat 3.3.4, pàg. 83.

### **3.3.5. Línies cel·lulars tumorals, condicions de cultiu i activitat citotòxica.**

La línia **HeLa** (línia de carcionoma humà d'uter) ha estat cultivada en medi complet DMEM suplementat amb 10% FBS, 2 mM L-glutamina i antibiòtic en flascons de cultiu estèrils. Els flascons s'han mantingut a 37 °C, 10% de CO<sub>2</sub> i 90% d'humitat en l'incubador. Les cèl·lules es deixen créixer fins que aconseguen un 90% de confluència, canviant el medi segons les necessitats de cultiu (cada 2-4 dies). Un cop aconseguida la monocapa cel·lular, les cèl·lules es tripsinitzen per realitzar nous subcultius. Es sembra entre 1:2 a 1:10 segons la proporció de subcultiu de la línia cel·lular. Es congela una alíquota amb nitrogen líquid.

La línia **HL60** (línia de leucèmia aguda promielocítica ATCC n° CLL-240) ha estat cultivada en RPMI -1640 suplementat amb 2 mM de L-glutamina i 10% FBS en flascons de cultiu estèrils. Els flascons es mantenen en l'incubador a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> i 95% d'humitat. La línia HL60 creix en suspensió i per aquest motiu no requereix tripsinització.

La preparació i aplicació de les mostres es realitza de la mateixa manera que la descrita en el Capítol 3, apartat 3.3.5, pàg. 84.

### **3.3.6. Detecció d'apoptosi.**

#### **3.3.6.1. Citometria de flux.**

Es segueix el mateix procediment que el descrit en el Capítol 3, apartat 3.3.6, pàg. 86.

#### **3.3.6.2. Electroforesi en gel d'agarosa.**

Es segueix el mateix procediment que el descrit en el Capítol 3, apartat 3.3.6.2., pàg. 87.

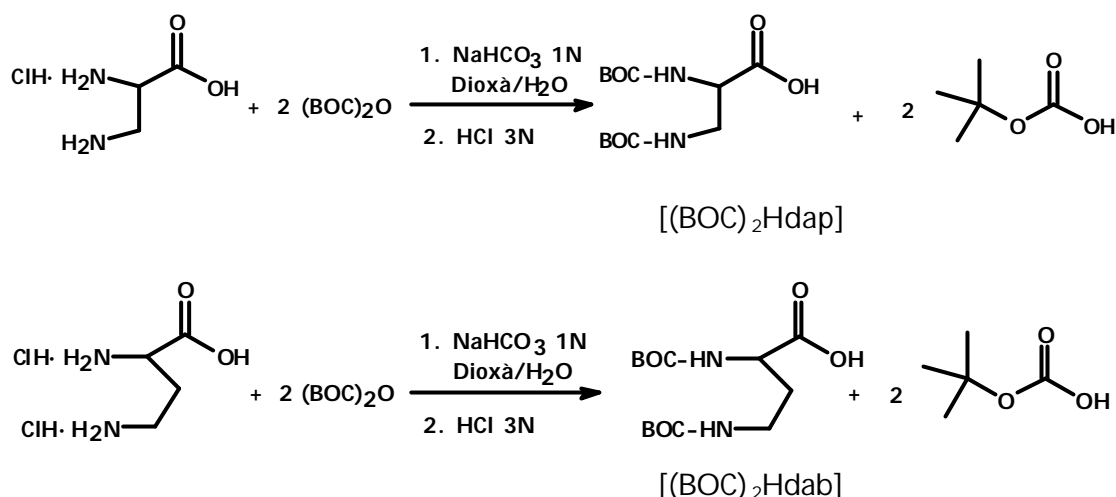
## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.

### 4.1. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ QUÍMICA DELS LLIGANDS I COMPLEXOS.

#### 4.1.1. Síntesi dels lligands.

La síntesi dels lligands [(dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH], s'ha realitzat seguint el mètode descrit per Loulodi et al.<sup>19</sup> En aquest mètode es genera un enllaç tipus amida entre un grup carboxílic terminal d'una molècula (del diaminoàcid Hdap i Hdab, en aquest cas) i un grup amina terminal d'una altra molècula (en aquets cas, un aminoàcid com l'alanina, la fenilalanina i el triptofà) a través d'un atac nucleofílic en condicions bàsiques. Tenint en compte l'estructura dels reactius que s'utilitzen, és necessari que reaccioni únicament el grup amina terminal de l'aminoàcid amb el grup carboxílic del diaminoàcid (Hdap i Hdab). Els grups amina dels diaminoàcids Hdap i Hdab poden interferir com a nucleòfils en aquesta reacció, per tant es fa necessari la protecció d'aquests grups amb el protector terc-butoxicarbonil (BOC). Aquest protector és ideal per les condicions que s'utilitzen en la reacció sintètica esmentada, perquè és extremadament resistent davant reactius bàsics i nucleofílics.

La reacció de protecció s'ha portat a terme segons el mètode descrit per Garner i Park,<sup>20</sup> i es mostra en l'Esquema 1.



**Esquema 1.** Esquema de la reacció de protecció dels grups amina dels lligands Hdap· 2HCl i Hdab· 2HCl amb BOC.

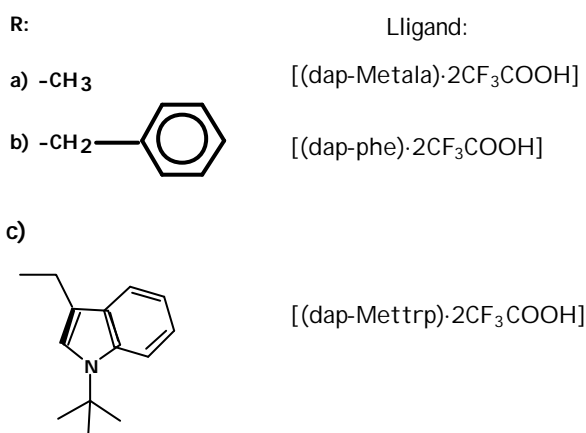
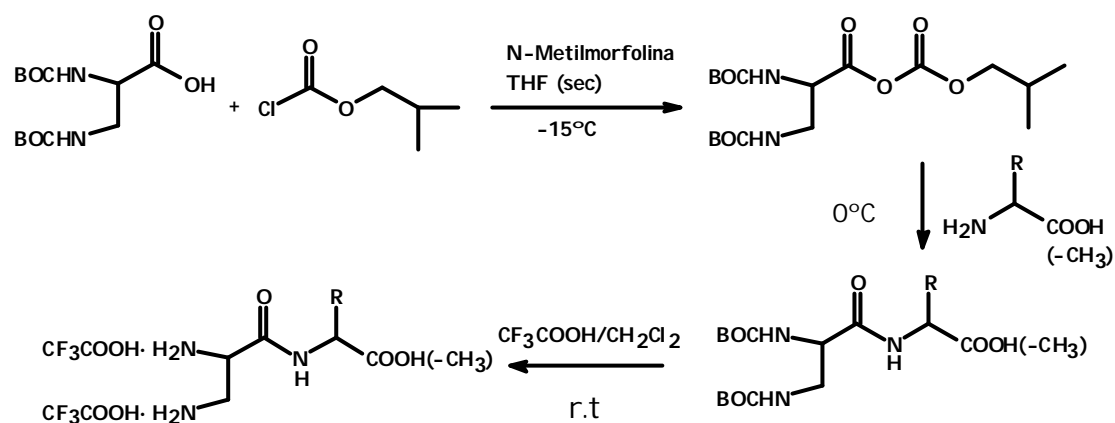
Per portar a terme la reacció de protecció cal neutralitzar els protons àcids amb una base i així activar aquest reactiu com a nucleòfil per poder atacar el grup carbonil de  $(\text{BOC})_2\text{O}$ . Un cop els grups amina estan bloquejats, s'acidifica el medi fins a  $\text{pH}=2-3$  per poder protonar el grup carboxilat. El producte final s'extreu amb un dissolvent orgànic per poder-lo separar de la petita quantitat de diaminoàcid inicial no reaccionat.

Els productes amino protegits,  $[(\text{BOC})_2\text{Hdap}]$  i  $[(\text{BOC})_2\text{Hdab}]$ , han estat caracteritzats per espectroscopia IR, RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$  i anàlisi elemental (Apartat 7, pàg. 219).

En l'espectre IR s'observa, de forma general per a tots dos compostos, la presència de dos senyals corresponents a la vibració st. C=O dels dos grups carbonil de la molècula (1730-1740 C=O àcid, 1680-1690 C=O BOC), assignats segons les dades bibliogràfiques.<sup>21</sup> A través dels respectius espectres de RMN- $^1\text{H}$  es pot distingir un singlet proper a 1.5 ppm corresponent als protons metílics del grup BOC, la presència del qual queda confirmada també per RMN- $^{13}\text{C}$  amb l'aparició d'un senyal a 155 ppm corresponent al senyal del carboni N-C=O.

Seguint la metodologia de formació d'enllaços tipus amida descrita per Louloudi et al,<sup>19</sup> els diaminoàcids Hdap i Hdab protegits amb BOC es fan reaccionar, en medi

bàsic, amb cloroformiat d'isobutil per donar un intermedi actiu capaç d'interaccionar amb el grup amino terminal de l'aminoàcid. Un aspecte a tenir en compte és que el cloroformiat d'isobutil descomposa gradualment en presència d'aigua i alcohol, i per aquest motiu cal treballar amb dissolvents secs. La reacció que té lloc es mostra en l'Esquema 2.

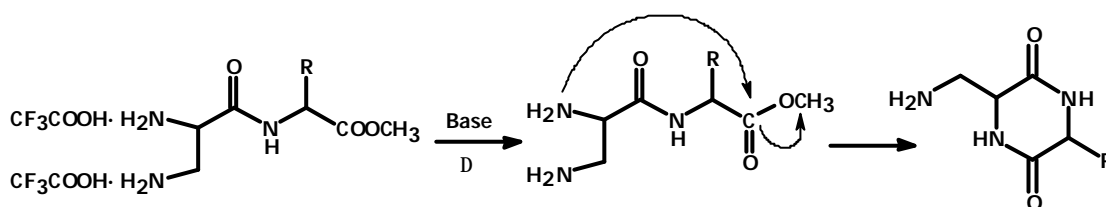


**Esquema 2.** Esquema de la reacció d'acoblament entre el lligand Hdap i un aminoàcid [a] alanina, b) fenilalanina, c) triptofà] a través de la formació d'un grup amida. La reacció és igual per l'anàleg [(BOC)<sub>2</sub>Hdab].

En el transcurs de la reacció es formen diversos subproductes, com per exemple: N-metil morfolina hidrocloorada, 2-metilpropanol, excés de base i de cloroformiat. Tots ells són eliminats a través d'una sèrie d'extraccions àcides i bàsiques, excepte el 2-metilpropanol que s'elimina per evaporació.

Un cop completada la reacció de formació de l'enllaç amida, cal desprotegir els grups amina per tal d'obtenir el producte final. El grup BOC es desprotegeix en condicions àcides, utilitzant una barreja de  $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Aquest tipus de desprotecció del grup BOC dóna lloc a la formació de cations terc-butil i terc-butil trifluoroacetat, que poden provocar la terc-butilació de l'anell indol del triptofà. Aquesta alteració es pot minimitzar utilitzant un *scavenger* efectiu com l'anisola.<sup>22</sup> Tot i la utilització d'un 1% d'anisola en la reacció de desprotecció del grup BOC de  $[(\text{BOC})_2(\text{dap-Mettrp})]$  i  $[(\text{BOC})_2(\text{dab-Mettrp})]$ , s'ha detectat la terc-butilació de l'anell indol. Per tal que això no passi, caldria l'addició d'un *scavenger* addicional, com el trietilsilà o el dodecantiol, però aquests reactius són solubles en medi aquós i difícils d'eliminar en fase homogènia. De manera que finalment s'han aïllat els lligands de triptofà amb l'anell indol terc-butilat.

És important no tractar amb una base i en calent el lligands obtinguts, ja que es pot produir una ciclació intramolecular per reacció del grup NH terminal i el C=O terminal, formant-se una **dicetopiperazina**, tal i com es mostra en Esquema 3.



**Esquema 3.** Reacció de ciclació intramolecular entre el grup NH terminal i el grup C=O terminal del lligands sintetitzats, quan es tracten amb una base i en calent.

La formació d'aquesta dicetopiperazina s'ha detectat en el cas del lligand  $[(\text{dap-ala})\cdot 2\text{CF}_3\text{COOH}]$ , quan aquest s'ha tractat en medi bàsic escalfant a uns 50 °C. S'ha confirmat la seva formació per espectroscopia IR, RMN- $^1\text{H}$  i RMN- $^{13}\text{C}$ . Els respectius espectres es mostren en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 219) i dels quals es pot destacar diversos aspectes.

En l'espectre IR de la dicetopiperazina formada apareix una banda a  $1685\text{ cm}^{-1}$  molt més estreta que la que apareix en el lligand [(dap-Metala) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH], la qual s'atribueix a la vibració st. N-C=O dels compostos de tipus lactama.<sup>21</sup> No existeix la vibració st. C=O ni de l'éster ni del contraió CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>. Tampoc s'observa la banda corresponent a la vibració  $\delta$  NH ni st.si. N-C=O en la zona espectral 1530-1540  $\text{cm}^{-1}$ , i això és una característica típica dels compostos cíclics tipus lactama (Figura 2).

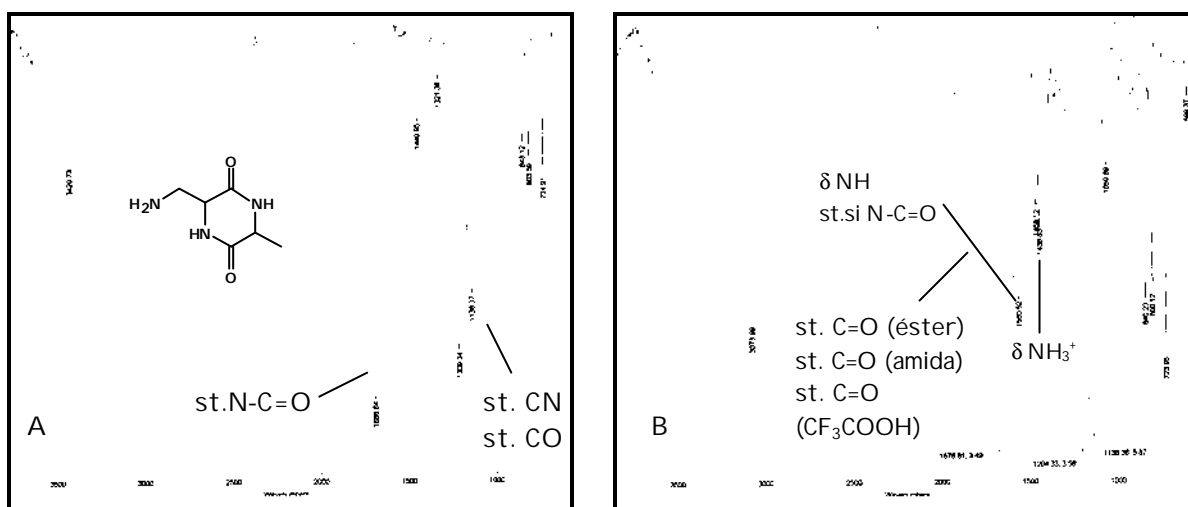


Figura 2. Espectres IR de la dicetopiperazina formada a partir de [(dap-Metala) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH] (A) i del lligand [(dap-Metala) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH] (B) on es pot observar diferències significatives.

En l'espectre RMN-<sup>1</sup>H de la dicetopiperazina no s'observa a 3.68 ppm el singlet corresponent als protons de l'éster metílic (O-CH<sub>3</sub>), i els senyals dels protons metilènics apareixen com a dobles dobles a 3-3.4 ppm. Els protons metilènics no són equivalents ja que la ràpida rotació del grup CH<sub>2</sub> dona lloc a entorns diferents, produint l'aparició de senyals en desplaçaments químics diferents.



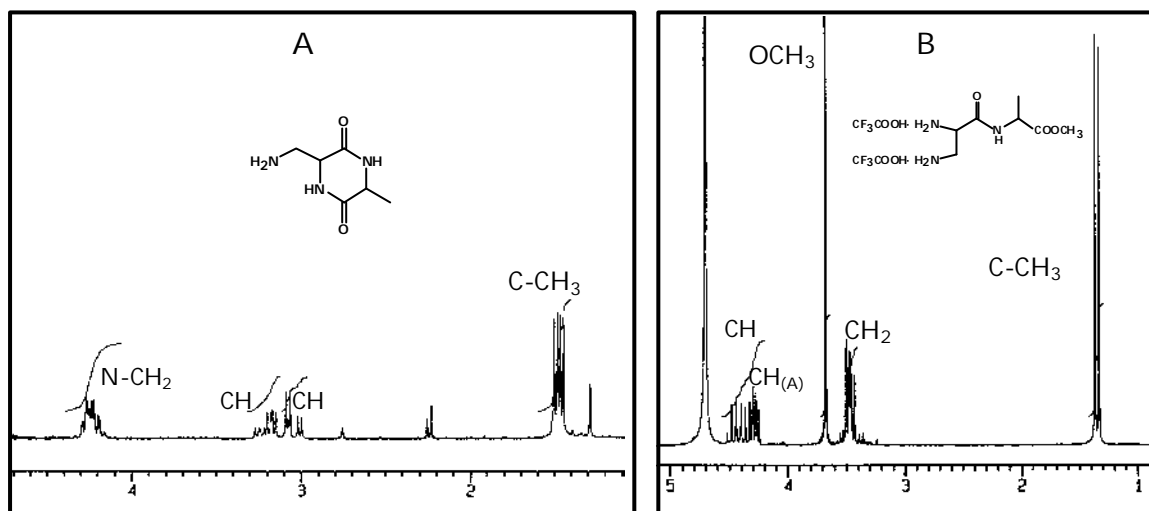
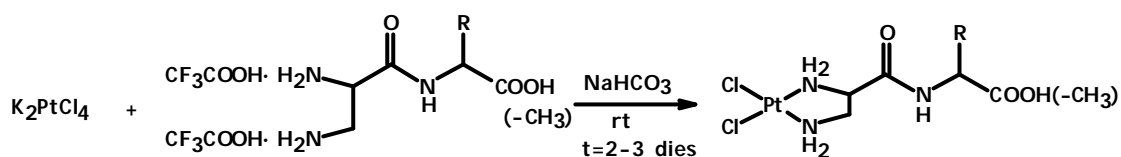


Figura 3. Espectres de RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300K) de la dicetopiperazina derivada de [(dap-Metala)· $2\text{CF}_3\text{COOH}$ ] (A) i del lligand [(dap-Metala)· $2\text{CF}_3\text{COOH}$ ] (B), on s'observa clarament les diferències.

#### 4.1.2. Síntesi dels complexos.

Seguint la metodologia descrita per González et al.,<sup>23</sup> la síntesi dels complexos s'ha realitzat fent reaccionar, a temperatura ambient, quantitats equimolars dels lligands [(dap-Metala)· $2\text{CF}_3\text{COOH}$ ], [(dab-Metala)· $2\text{CF}_3\text{COOH}$ ], [(dap-phe)· $2\text{CF}_3\text{COOH}$ ], [(dab-phe)· $2\text{CF}_3\text{COOH}$ ], [(dap-Mettrp)· $2\text{CF}_3\text{COOH}$ ] i [(dab-Mettrp)· $2\text{CF}_3\text{COOH}$ ] amb  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ . La presència d'una base és necessària per neutralitzar les molècules de l'àcid trifluoroacètic i permetre la coordinació dels nitrogens al platí. Un esquema d'aquestes reaccions es mostra en l'Esquema 4.




R:

Complexos:

a) -CH<sub>3</sub>

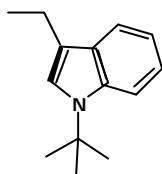
PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala)

b) -CH<sub>2</sub>-

PtCl<sub>2</sub>(dap-phe)

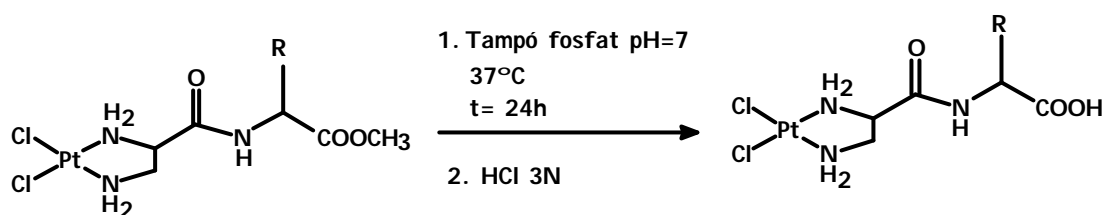
c)

PtCl<sub>2</sub>(dap-Mettrp)



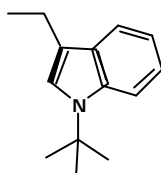
**Esquema 4.** Esquema de la reacció de complexació dels lligands [(dap-Metala)· 2CF<sub>3</sub>COOH] (a), [(dap-phe)· 2 CF<sub>3</sub>COOH] (b) i [(dap-Mettrp)· 2CF<sub>3</sub>COOH]. La reacció és la mateixa pels lligands anàlegs del dab.

Els complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) i PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) requereixen una acidificació del medi a pH= 2-3 per poder-los aïllar i no són gaire solubles en medi aquós, excepte en alguns tampons a pH=7, com el tampó fosfat. Els complexos de l'alanina i el triptofà són insolubles en medi aquós, podent-se solubilitzar en dissolvents com DMSO i DMF. Per tal de poder-los fer solubles en aigua, s'ha realitzat la hidròlisi de l'éster metílic en tampó fosfat a pH=7, escalfant a 37°C durant 24h, tal i com es mostra en l' Esquema 5.



a)  $-\text{CH}_3$

b)



**Esquema 5.** Esquema de la reacció d'hidrolització dels complexos de Pt(II) esterificats derivats de l'alanina (a) i triptofà (b). La reacció és idèntica pels anàlegs del dab.

Pels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{dap-Metala})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{dab-Metala})$  s'observa que, un cop transcorregudes les 24 h de reacció, el compost s'ha anat solubilitzant en el medi aquós de reacció i una posterior acidificació amb HCl permet l'obtenció del complex en forma d'àcid. Pels complexos derivats del triptofà no s'aconsegueix la solubilització sota aquestes condicions, ni deixant transcórrer més temps ni augmentant la temperatura. Aquesta gran insolubilitat en medi aquós ha sigut el motiu que ha fet que els complexos derivats del triptofà no s'escollissin per realitzar els diferents estudis d'activitat biològica, i es prenguessin els complexos de la fenilalanina com a exemples d'estudi de complexos de Pt(II) contenint lligands de tipus aminoàcid amb substituents aromàtics.

#### 4.1.3. Caracterització espectroscòpica dels lligands i complexos.

L'**espectroscopia d'infraroig (IR)** ha permès identificar els grups funcionals de les molècules, mesurant l'excitació vibracional dels àtoms al voltant dels enllaços quan la molècula absorbeix l'energia de la regió de l'infraroig. La posició de les bandes d'absorció depèn del tipus de grups funcionals presents, i l'espectre en el seu conjunt representa una identificació única de la molècula. En la Taula 1 es mostren els valors de les freqüències ( $\text{cm}^{-1}$ ) més destacables dels lligands i els respectius complexos de Pt(II),

i els espectres es presenten en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 219)

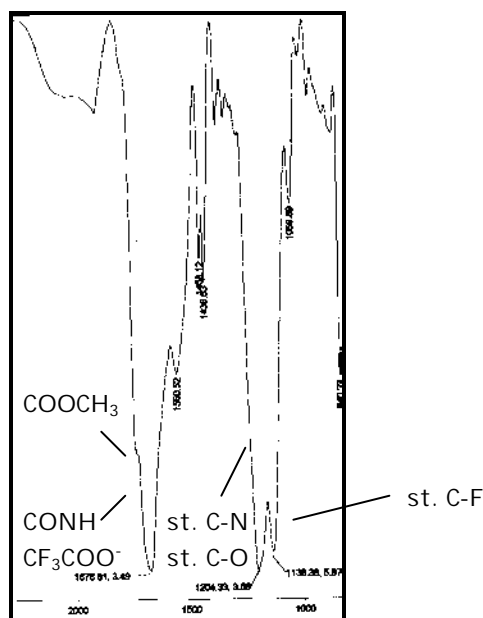
$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	OH t	NH t	CH <sub>ar</sub> t	CH t	C=O t	NH d NC=O t	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> d	CO t CN t	CF t	COO t (CF <sub>3</sub> COO)	CH <sub>ar</sub> d
(dap-Metala)		3073- 2900		3073- 2900	1750- 1600	1560	1458	1204	1138	723	
(dab-Metala)		3400- 2900		3400- 2900	1750- 1600	1559	1450	1202	1140	724	
(dap-phe)	3234- 3000	3234- 3000	3234- 3000	3234- 3000	1750- 1600	1569	1439	1205	1140	724	701
(dab-phe)	3403- 2900	3403- 2900	3403- 2900	3403- 2900	1750- 1600	1547	1438	1203- 1140	1203- 1140	724	701
(dap-Mettrp)		3232- 3059	3232- 3059	2961	1750- 1600	1549	1450	1204	1138	723	745
(dab-Mettrp)		3249- 2959	3249- 2959	3249- 2959	1750- 1600	1543	1437	1203- 1137	1203- 1137	723	754
Pt(dap-Metala)		3259- 3207		3104- 2940	1741, 1669	1567		1219- 1152			
Pt(dab-Metala)		3293- 3196		3127- 2955	1740, 1665	1578		1236- 1154			
Pt(dap-ala)	3500- 3300	3300- 3200		3120- 2940	1734, 1675	1568		1230- 1150			
Pt(dab-ala)	3500- 3300	3240- 3190		3100- 2900	1741, 1664	1577		1238- 1150			
Pt(dap-phe)	3218- 2900	3218- 2900	3218- 2900	3218- 2900	1724, 1670	1548		1223- 1150			
Pt(dab-phe)	3218- 2955	3218- 2955	3218- 2955	3218- 2955	1722, 1663	1544		1234- 1150			
Pt(dap-Mettrp)		3368- 3247	3119	2954	1734, 1672	1568		1223- 1099			
Pt(dab-Mettrp)		3367- 3232	3131	1954	1736, 1669	1580		1221- 1090			

Taula 1. Freqüències (en  $\text{cm}^{-1}$ ) de les bandes més significatives dels espectres IR dels diferents lligands i complexos presentats en aquest capítol. (t)= tensió o stretching, (d)= deformació o bending, (ar.)= aromàtic.

Els espectres dels lligands presenten entre si una estructura molt similar, i els espectres dels respectius complexos han estat assignats per comparació amb els els espectres dels corresponents lligands i tenint en compte les assignacions descrites en la bibliografia.<sup>21</sup>

Els espectres dels lligands mostren una banda molt ampla entre 2500 i 3600  $\text{cm}^{-1}$ , corresponent a les vibracions st. NH dels grups  $\text{NH}_3^+$ , st. CH, i st. OH dels grups COOH de la fenilalanina. En la zona espectral compresa entre 1500 i 1800  $\text{cm}^{-1}$  s'observa una banda lleugerament desdoblada degut al solapament en la mateixa zona de diverses bandes

de vibració corresponents als st. C=O de l'èster o l'àcid, del grup amida i del contraïó  $\text{CF}_3\text{COO}^-$  que apareixen a  $1750\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , i de la presència de la vibració corresponent al st. si. N-C=O i  $\delta$  N-H, tal i com es mostra en l'exemple de la Figura 4. També existeix de forma comuna en tots els lligands una doble banda intensa entre  $1100$  i  $1300\text{ cm}^{-1}$  corresponent a la vibració st. C-N i C-O i st. C-F. Com que els lligands presenten els grups amina protonats, apareix una banda d'absorció corresponent a la vibració de deformació del grup  $\text{NH}_3^+$  en la zona propera a  $1450\text{ cm}^{-1}$ , inexistent en els espectres dels complexos respectius.



**Figura 4.** Espectre IR del lligand [(dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH] en la zona compresa entre  $1000$  i  $2000\text{ cm}^{-1}$  on es pot observar la banda ampla corresponent al solapament de les diferents vibracions st. C=O, i la doble banda intensa corresponent a les vibracions st. C-N, st. C-O i st. C-F.

Aquests lligands també presenten una banda d'absorció característica a  $724\text{-}723\text{ cm}^{-1}$  corresponent a la vibració st.  $\text{COO}^-$  del contraïó trifluoroacetat.

En els espectres dels complexos s'observa que les bandes compreses entre  $3500$  i  $2900\text{ cm}^{-1}$  estan molt més ben estructurades, distingint-se les dues bandes

corresponents a la vibració st. N-H dels grups amina coordinats al metall i les bandes corresponents a la vibració st. C-H. Es mantenen sense modificació les bandes corresponents a la vibració st. C=O del grup éster o àcid i del grup amida, i desapareix la banda característica del grup  $\text{CF}_3\text{COO}^-$  corresponent a la vibració st.  $\text{COO}^-$ . Un exemple d'aquesta millor estructuració de les bandes d'absorció es mostra en la Figura 5.

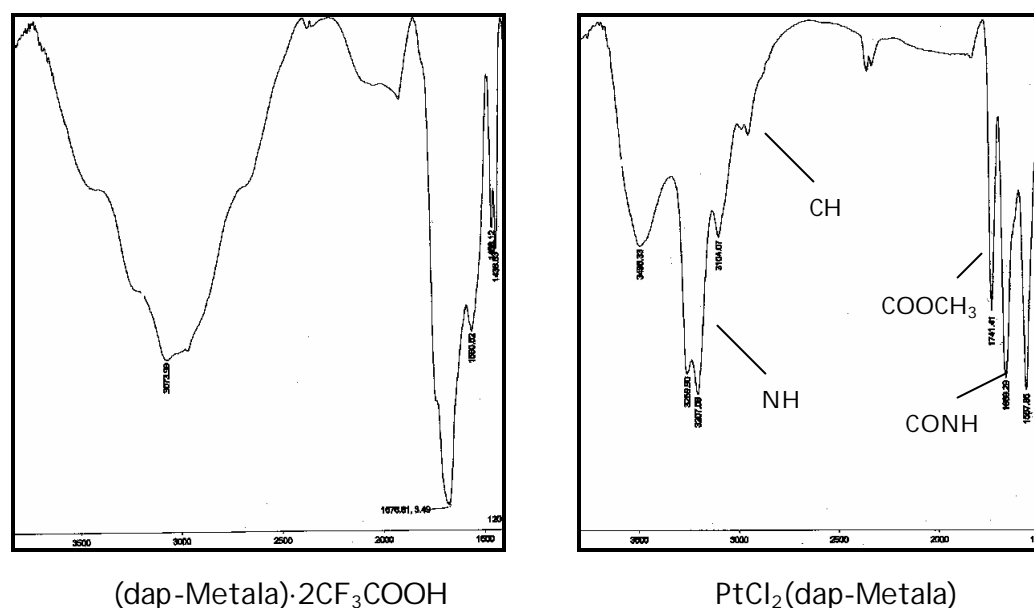


Figura 5. Espectre IR del lligand (dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH i el corresponent complex de Pt(II) en la zona compresa entre 1500 i 3500  $\text{cm}^{-1}$ , implicada en la formació del complex. La comparació dels dos espectres permet observar la millora de l'estructuració de les bandes que es produeix en el complex.

L'aparició de bandes d'absorció noves i/o la modificació d'aquelles que ja són presents en els espectres dels lligands s'atribueix als modes de vibració Pt-Cl i Pt-N. Les bandes corresponents a la vibració M-L solen aparèixer a freqüències inferiors a 400  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>24</sup>

### Espectroscopia de ressonància magnètica nuclear de protó (RMN-<sup>1</sup>H).

S'han enregistrat els espectres de RMN-<sup>1</sup>H de tots els lligands lliures i els corresponents complexos de Pt(II) utilitzant D<sub>2</sub>O o DMSO com a dissolvents, i es mostren en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 219). Les assignacions dels diferents senyals es resumeixen en la Taula 2.

<i>d</i> (ppm)	<i>CH</i> <sub>2</sub>	<i>N-CH</i> <sub>2</sub>	<i>N-CH</i>	<i>O-CH</i> <sub>3</sub>	<i>NH</i>	<i>NH</i> <i>amida</i>	<i>Altres</i>
(dap-Metala)		3.48 m	4.55 m	3.68 s			4.28 (CH <sub>(A)</sub> ) m, 1.35 (C-CH <sub>3</sub> ) d
(dab-Metala)	2.03 m	2.87 m	4.2 m	3.48 s			3.85 (CH <sub>(A)</sub> ) m, 1.60 (C-CH <sub>3</sub> ) d
(dap-phe)		3.66 m	4.16 m				3.36 (CH <sub>2(F)</sub> ) m, 4.75 (CH <sub>(F)</sub> ) m, 7.30 (CH <sub>(arom)</sub> ) m
(dab-phe)	2.08 m	2.33-3.40 m	3.94 m				2.33-3.40 (CH <sub>2(F)</sub> ) m, 7.25 (CH <sub>(brom)</sub> )
(dap-Mettrp)		3.35 m	4.5 m	3.72 m			1-2 (CH <sub>3</sub> terc-butil) m, 3.2 (CH <sub>2(W)</sub> ) m, 4.78 (CH <sub>(W)</sub> ) m, 7.02-7.59 (CH <sub>(brom)</sub> )
(dab-Mettrp)	2.13 m	3.18 m	3.9 m	3.3 d			1-2 (CH <sub>3</sub> terc-butil) m, 3.03 (CH <sub>2(W)</sub> ) m, 4.9 (CH <sub>(W)</sub> ) m, 7.07-7.6 (CH <sub>(brom)</sub> ) m
Pt(dap-Metala)		2.6 m	5.15 m	3.7 s	5.59-5.95 m	8.7 d	1.3 (C-CH <sub>3</sub> ) d, 4.36 (CH <sub>(A)</sub> ) m
Pt(dab-Metala)	1.8 m	-	-	3.72 s	4.6-6 m	8.66 d	1.38 (C-CH <sub>3</sub> ) d, 4.39 (CH <sub>(A)</sub> ) m
Pt(dap-ala)		3.54-3.67 m	5.17 m,				2.17 (C-CH <sub>3</sub> ) m, 4.21-4.46 (CH <sub>(A)</sub> ) m
Pt(dab-ala)	1.54-191 m	2.52-2.60 m	4.17 m				1.18 (C-CH <sub>3</sub> ) d, 3.38 (CH <sub>(A)</sub> ) m
Pt(dap-phe)	2-2.3 m		-		4.5-5.9 m	8.55 m	2.9 (CH <sub>2(F)</sub> ) m 7.33-7.35 (CH <sub>(arom)</sub> ) m
Pt(dab-phe)	2.3 m		-		4.58-5.9 m	8.55 m	2.93 (CH <sub>2(F)</sub> ) m, 7.33-7.35 (CH <sub>(arom)</sub> )
Pt(dap-Mettrp)		3.2 m	4.2 m	-	5.51 m	9.0 d	1-2 (CH <sub>3</sub> terc-butil) m, 3.6 (CH <sub>2(W)</sub> ) m, 4.6 (CH <sub>(W)</sub> ) m, 7.05-7.6 (CH <sub>(brom)</sub> ) m
Pt(dab-Mettrp)	2.2 m	3.3 m	-	-	5.1-6.3 m	8.91 m	1-2 (CH <sub>3</sub> terc-butil) m, 4.7 (CH <sub>(W)</sub> ), 7.13-7.62 (CH <sub>(brom)</sub> )

Taula 2. Desplaçaments químics de protó (ppm) dels principals senyals dels espectres de RMN-<sup>1</sup>H dels lligands i els respectius complexos presentats en aquest capítol. (s)=singlet, (d)=doblet, (m)=multiplet, (A)=alanina, (F)=fenilalanina, (W)=triptofà, (-)=emmascarat.

Els espectres realitzats en D<sub>2</sub>O no presenten els senyals corresponents als protons NH ni OH degut a l'intercanvi de protons per deuteris. Els senyals corresponents als protons NH en general apareixen amples perquè els acoblaments N-H no són observables degut a la relaxació quadrupolar del nucli de nitrogen i al lent intercanvi dels protons NH.<sup>21</sup>

Els senyals dels espectres dels complexos de platí apareixen, de forma general, més amples que els corresponents senyals en els lligands, degut a la presència de diferents conformòmers en dissolució. Si l'equilibri conformacional fos lent, es podria arribar a distingir un conformòmer i obtenir senyals amb millor resolució. Però al ser aquest equilibri ràpid, els senyals s'eixamplen. Per millorar la resolució caldria enregistrar l'espectre a baixa temperatura, experiment que no és possible degut als dissolvents en què són solubles els compostos (H<sub>2</sub>O i DMSO). A més, els protons que es troben més allunyats del centre metàl·lic apareixen amb més bona resolució i amb un

canvi de desplaçament químic mínim respecte al lligand perquè es veuen menys influenciats pel metall. Un exemple d'aquest fenomen es mostra en la Figura 6.

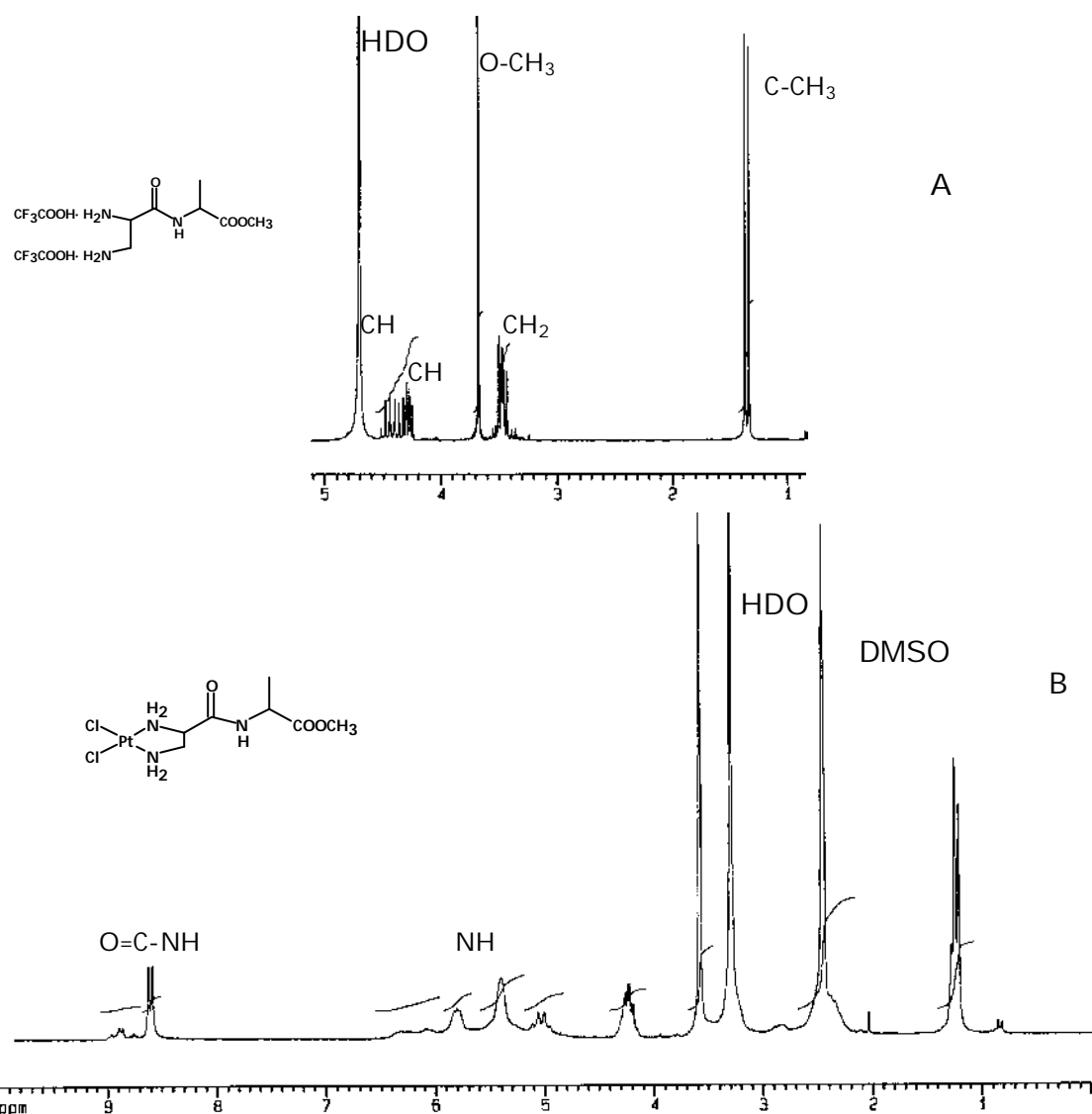


Figura 6. Espectres de RMN- $^1\text{H}$  del lligand  $[(\text{dap-Metala}) \cdot 2\text{CF}_3\text{COOH}]$  (A) i del complex  $\text{PtCl}_2(\text{dap-Metala})$  (B), on es pot observar la diferència de resolució dels senyals.

Com es pot observar en la Figura 6, en la qual es compara els espectres de RMN- $^1\text{H}$  del lligand  $[(\text{dap-Metala}) \cdot 2\text{CF}_3\text{COOH}]$  i del respectiu complex de Pt(II), els senyals del lligand apareixen amb més bona resolució que els senyals del complex. El doblet una mica distorsionat a 1.3 ppm i el singlet a 3.5 ppm de l'espectre del complex són els senyals que presenten millor resolució i corresponen a protons que es troben allunyats



del centre metàl·lic. Els altres senyals, dels grups més propers al metall, compresos entre 2-6 ppm del mateix espectre, apareixen com a multiplets i senyals amples degut a l'existència d'un equilibri conformacional en dissolució i a la presència dels senyals del dissolvent.

Comparant els espectres i les dades presentades en la Taula 2 dels complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) i PtCl<sub>2</sub>(dab-ala) amb els dels respectius ésters metàlics, es fa evident la desaparició del singlet proper a 3.5 ppm corresponent al CH<sub>3</sub> de l'éster metàlic.

### Espectroscopia de ressonància magnètica nuclear de <sup>13</sup>C.

S'han enregistrat els espectres de RMN-<sup>13</sup>C dels diferents lligands sintetitzats, els quals es mostren en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 219), i les dades dels desplaçaments químics es presenten en la Taula 3.

<i>d</i> (ppm)	CH <sub>2</sub>	N-CH <sub>2</sub>	N-CH	O-CH <sub>3</sub>	C-F	C=O (CF <sub>3</sub> COOH)	N-C=O	C=O	Altres
(dap-Metala)		43.9	51.82	56.3	110-127	165.6	173.49	177.7	18.7 (CH <sub>3(A)</sub> ), 54.34 (CH <sub>4(A)</sub> )
(dab-Metala)	31.5	38.18	51.82	55.9	116.3-122.1	165.6	171.5	177.2	18.7 (CH <sub>3(A)</sub> ), 53.5 (CH <sub>4(A)</sub> )
(dap-phe)		39.37	50.58		113.33- 119.12	161.5	165.9	175.64	36.77 (CH <sub>2(F)</sub> ), 55.94 (CH <sub>1(F)</sub> )
(dab-phe)	31.49	40.31	53.72		116.34- 122.14	161.5	170.85	180.45	127.04-136.9 (C <sub>arom</sub> ) 37.98 (CH <sub>2(F)</sub> ), 59.81 (CH <sub>1(F)</sub> )
(dap-Mettrp)		44.0	55.0	53.0	-	161.07	161.8	172.6	129.73-140.95 (C <sub>arom</sub> ) 28.2 (CH <sub>2(W)</sub> ), 29 (CH <sub>3</sub> terc-butil) 57.8 (CH <sub>1(W)</sub> )
(dab-Mettrp)	29.2	37.5	55.9	53.5	-	161.0	171.4	176.4	112.1-137.8 (CH <sub>arom</sub> ) 31.2 (CH <sub>2(W)</sub> ), 56.8 (CH <sub>1(W)</sub> ) 111.6-139.03 (C <sub>arom</sub> )

Taula 3. Desplaçaments químics (ppm) de carboni dels diferents lligands sintetitzats. (A)=alanina, (F)=fenilalanina, (W)=triptofà, (-)=emmascarat

En tots els espectres dels lligands hi ha una sèrie de senyals comuns corresponents a grups que són presents en cada un dels compostos. En la zona compresa entre 110 i 135 ppm apareix un senyal característic del carboni C-F del contraió CF<sub>3</sub>COOH i a 164 ppm aproximadament apareix el senyal corresponent al C=O del mateix

contraïó. Aquests senyals del  $\text{CF}_3\text{COOH}$  apareixen com a quadruplets degut a l'acoblament amb el fluor, presentant unes constants d'acoblament de l'ordre de 294 Hz pel C-F i de 45 Hz pel COOH.<sup>21</sup> En la zona compresa entre 165 i 180 ppm apareixen els senyals corresponents als carbonils (amida, àcid, éster) de l'estructura del lligand. A desplaçaments químics baixos apareixen els senyals dels carbonis alifàtics.

### **Cromatografia líquida ESI-MS.**

S'han enregistrat els espectres ESI-MS de tots els lligands i dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dap-phe})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{dab-phe})$ , utilitzant com a fase mòbil  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ . Els diferents espectres es mostren en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 219).

L'espectre de masses obtingut és una representació del corrent produït pels ions, generats en la cambra de ionització, quan arriben al detector, i la intensitat del pic és una indicació del número relatiu de ions. Els ions produïts per la fragmentació es separen segons la seva relació massa/càrrega ( $m/z$ ).

L'espectre ESI-MS dels lligands presenta el senyal corresponent al ió  $[\text{M}-2\text{CF}_3\text{COO}^- - \text{H}^+]^+$  (Figura 7), i a valors de  $m/z$  inferiors a aquest senyal apareixen els senyals d'altres fragmentacions de la molècula. En el cas dels lligands de l'éster metílic del triptofà, sempre apareix un senyal a 56 unitats de massa per sota del senyal de  $[\text{M}-2\text{CF}_3\text{COO}^- - \text{H}^+]^+$ , el qual s'atribueix al catió format per la pèrdua del grup terc-butílic de l'anell indol.

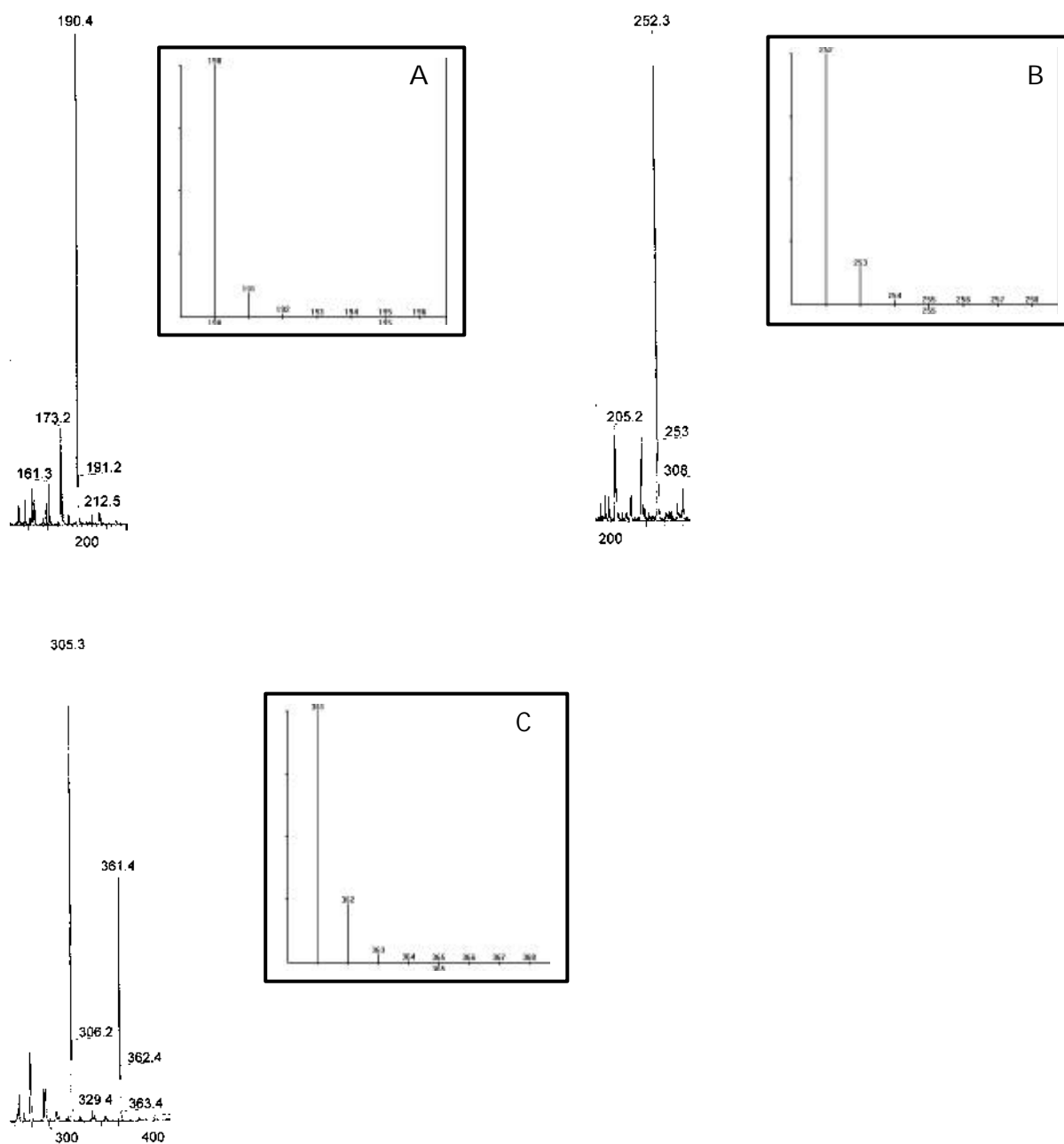


Figura 7. Senyals corresponents a l'ió molecular de l'espectre ESI-MS dels lligands [(dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH] (A) i [(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH] (B) i [(dap-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH] (C) amb les corresponents simulacions teòriques. El mateix comportament el presenten els lligands [(dab-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH] i [(dab-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH].

Els complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) i PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) s'han hagut d'enregistrar en negatiu per tal de detectar l'anió corresponent a la pèrdua del protó acídic [M-H<sup>+</sup>]<sup>-</sup> (Figura 8). En els espectres dels complexos, la distribució isotòpica dels senyals difereix de la dels lligands, ja que en els complexos cal tenir en compte

l'existència de sis isòtops del platí ( $^{190}\text{Pt}$ ,  $^{192}\text{Pt}$ ,  $^{194}\text{Pt}$ ,  $^{196}\text{Pt}$ ,  $^{198}\text{Pt}$ ) i dos isòtops del clor ( $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ).

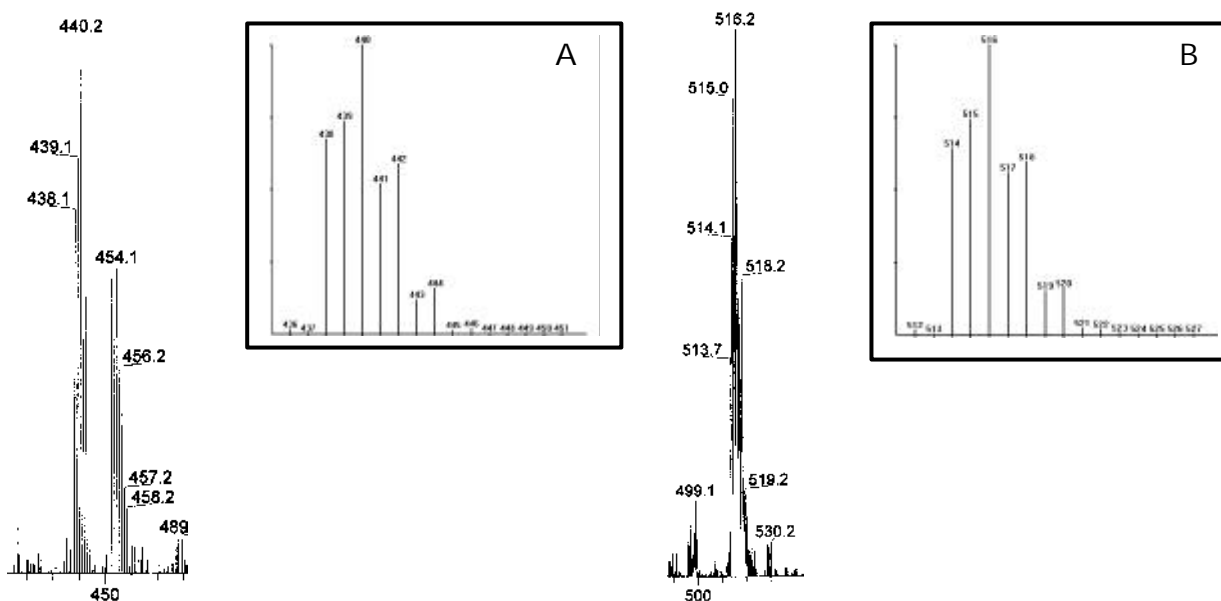


Figura 8. Senyals corresponents al ió molecular de l'espectre ESI-MS dels complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) (A) i PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) (B) amb les corresponents simulacions teòriques. Els compostos PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) i PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) mostren un comportament similar.

## 4.2. ASSAIGS BIOLÒGICS.

### 4.2.1. Estudi de la interacció Pt-DNA per dicroisme circular.

L'espectre de dicroisme circular és una representació de l'el·lipticitat en front de la longitud d'ona, i dóna informació a nivell qualitatiu sobre els canvis conformationals provocats pels compostos en l'estructura secundària del DNA.

Per poder estudiar la interacció dels complexos de platí amb el DNA i la modificació causada en la seva estructura secundària, s'ha enregistrat l'espectre de dicroisme circular de DNA-Calf Thymus incubat durant 48 h a 37 °C amb els lligands lliures ([dap-Metala]·2CF<sub>3</sub>COOH), [dap-phe]·2CF<sub>3</sub>COOH, [(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH] i els respectius complexos de Pt(II), a tres raons molars diferents de compost ( $r_1 = 0.1, 0.3, 0.5$ ). Els espectres obtinguts es mostren en la Figura

9 i la Figura 10, i els valors màxims i mínims d'el·lipticitat i longitud d'ona obtinguts per a cada raó molar es presenten en la Taula 4. En tots ells, es pot observar una banda positiva entre 310 i 260 nm, i una banda negativa entre 260 i 220 nm.

L'espectre del lligand s'enregistra en cada cas per tal de comprovar si aquest interacciona covalentment amb el DNA i per tant, si influeix en els canvis observats en els espectres del DNA incubat amb els complexos. Com es pot observar en els espectres, els lligands no modifiquen significativament el valor de la longitud d'ona màxima ni el valor de l'el·lipticitat de la corba del DNA, indicant que no produeixen canvis importants en la seva estructura secundària.

En canvi, els corresponents complexos de platí presenten modificacions importants en els valors de longitud d'ona màxima i el·lipticitat, fent evident que produeixen un efecte en l'estructura del DNA. Les modificacions observades en les corbes del DNA no són comparables a les del cisplatí, però sí, en canvi, a les del carboplatí.<sup>25</sup>

A través de la Figura 9 i la Figura 10 i els valors presentats en la Taula 4 s'observa que, en els complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala), PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-Metala) i PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), a mesura que augmenta el valor de la raó molar, augmenta el valor de  $\lambda_{\max}$  i disminueix el valor de  $\theta_{\max}$ , essent alguns valors inferiors al del DNA no tractat i altres superiors. Pel que fa a la banda del mínim, s'observa que a mesura que augmenta la raó molar disminueix el valor de  $\theta_{\min}$  i el valor de  $\lambda_{\min}$  gairebé no es modifica. La disminució de l'el·lipticitat màxima acompanyada de l'augment de la longitud d'ona quan augmenta la raó molar s'atribueix a un canvi de la conformació del DNA de la forma B a la forma C, produint-se un augment de la curvatura de la hèlix de l'àcid nucleic per rotació de les bases.<sup>26,27,28</sup> Se sap que la reducció de l'el·lipticitat de la banda positiva es pot associar a la formació de segments curts d'una sola cadena contenint bases desaparellades.<sup>29</sup>

En el complex PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) s'observa un comportament similar als complexos que contenen l'alanina, però en el complex PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) els valors de  $\theta_{\max}$  varien en funció de la raó molar en sentit invers ( $\theta_{\max}$  augmenta quan  $r_i$  augmenta), essent sempre superiors al valor de  $\theta_{\max}$  del DNA no tractat. L'augment de l'el·lipticitat màxima del

DNA s'atribueix a la formació d'enllaços cis-bifuncionals i és conseqüència de distorsions no desnaturalitzants en la doble hèlix.<sup>26</sup> La variació de  $\theta_{\max}$  que genera PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) segueix, per tant, el mateix comportament que presenta el cisplatí.

En la interacció dels compostos de fenilalanina amb el DNA existeix un factor addicional a tenir en compte, com és la presència d'un anell aromàtic. L'estructura plana dels anells aromàtics fa que aquest tipus de compostos tinguin la capacitat d'intercal·lar-se entre les bases nitrogenades del DNA, provocant distorsions en la seva estructura.<sup>30,31,32</sup> Està descrit que els complexos que presenten lligands intercal·ladors provoquen una disminució important de l'el·lipticitat a mesura que augmenta la raó molar de compost, a més d'un efecte batocròmic sobre la longitud d'ona.<sup>33,34</sup> Així doncs, els complexos de la fenilalanina poden interaccionar amb la doble hèlix de tres maneres, a través d'un enllaç covalent Pt-DNA (un cop desplaçats els lligands clorur), per intercal·lació de l'anell aromàtic entre les bases nitrogenades (amb els resultats obtinguts només es compleix pel complex PtCl<sub>2</sub>(dap-phe)) , i per pont d'hidrogen a través del grup carboxilat.

El diferent comportament que presenta el PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) respecte els altres complexos es pot atribuir a que aquest compost, en les 48 h d'incubació amb el DNA, pot arribar a estabilitzar la forma B del DNA mentre que els altres complexos no han tingut el temps suficient.<sup>35,36</sup> S'han descrit alguns casos similars, en els quals un conjunt de complexos que presenten estructures molt semblants, la majoria es comporten de forma similar, estabilitzant la forma B del DNA, i algun presenta resultats diferents, modificant la conformació B a la forma C. En aquests casos s'ha observat que el primer adducte que es forma pot canviar a un altre tipus d'adducte augmentant el temps d'incubació.<sup>35</sup>

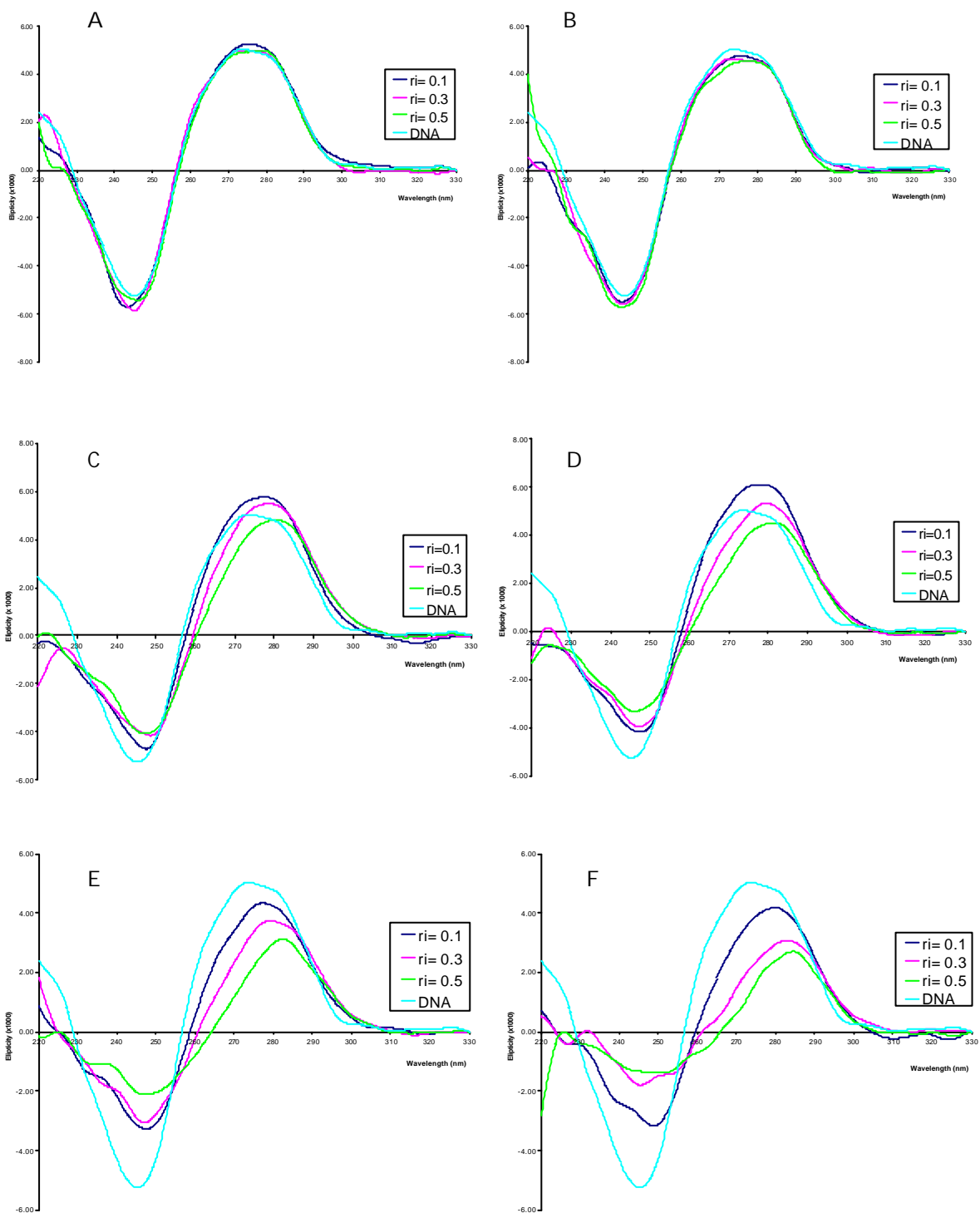


Figura 9. Espectres de DC del DNA-Calf Thymus incubat amb els lligands lliures [(dap-metala)·2CF<sub>3</sub>COOH] i [(dab-metala)·2CF<sub>3</sub>COOH] (figures A i B respectivament) i amb els complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-metala), PtCl<sub>2</sub>(dab-metala), PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) i PtCl<sub>2</sub>(dab-ala) (figures C, D, E i F respectivament) a diferents valors de  $r_i$  (0.1, 0.3, 0.5)

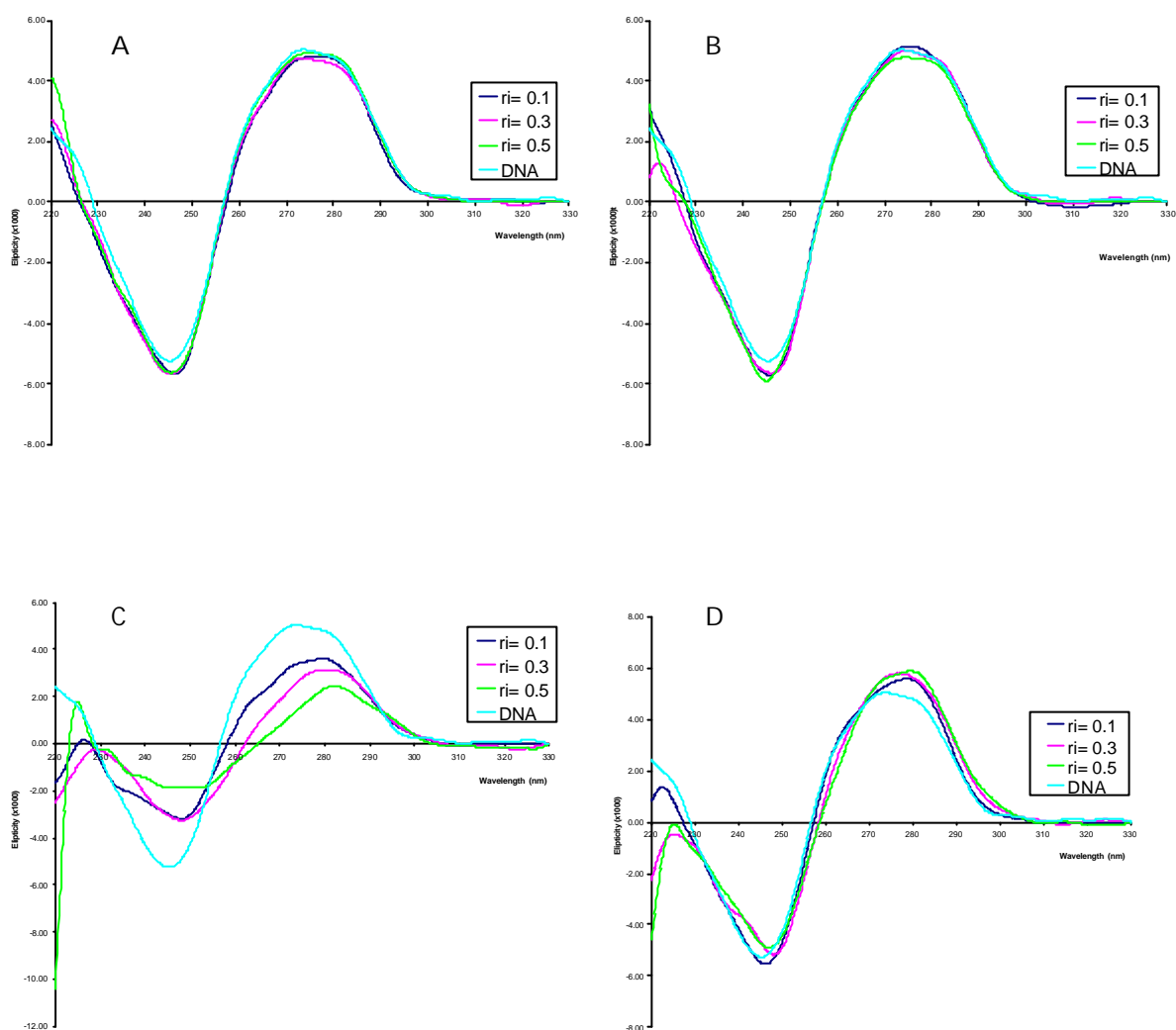


Figura 10. Espectres de DC del DNA-Calf Thymus incubat amb els lligands lliures (dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH i (dab-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH (figures A i B respectivament) i amb els complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) i PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) (figures C i D respectivament) a diferents valors de  $r_i$  (0.1, 0.3, 0.5).



DNA				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
-	273.6	$5.03 \cdot 10^3$	245.2	$-5.25 \cdot 10^3$
(dap-Metala)· 2CF <sub>3</sub> COOH				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	275.4	$5.25 \cdot 10^3$	243.2	$-5.71 \cdot 10^3$
0.3	273.6	$4.99 \cdot 10^3$	245.2	$-5.86 \cdot 10^3$
0.5	278.6	$5.03 \cdot 10^3$	246	$-5.43 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (dap-Metala)				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	277.6	$5.75 \cdot 10^3$	247.6	$-4.70 \cdot 10^3$
0.3	278.6	$5.49 \cdot 10^3$	248.6	$-4.15 \cdot 10^3$
0.5	280.4	$4.81 \cdot 10^3$	247.4	$-4.07 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (dap-ala)				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	277.2	$4.33 \cdot 10^3$	247.4	$-3.26 \cdot 10^3$
0.3	279.2	$3.74 \cdot 10^3$	247	$-3.06 \cdot 10^3$
0.5	282.4	$3.13 \cdot 10^3$	247	$-2.11 \cdot 10^3$
(dab-Metala)· 2CF <sub>3</sub> COOH				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	275.6	$4.77 \cdot 10^3$	244.6	$-5.50 \cdot 10^3$
0.3	273.2	$4.64 \cdot 10^3$	244.8	$-5.61 \cdot 10^3$
0.5	277.2	$4.53 \cdot 10^3$	244.4	$-5.71 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (dab-Metala)				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	278.2	$6.11 \cdot 10^3$	247.6	$-4.18 \cdot 10^3$
0.3	279.6	$5.33 \cdot 10^3$	247.2	$-3.94 \cdot 10^3$
0.5	281.6	$4.52 \cdot 10^3$	246.2	$-3.31 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (dab-ala)				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	279.8	$4.18 \cdot 10^3$	248.8	$-3.17 \cdot 10^3$
0.3	282.8	$3.08 \cdot 10^3$	245.4	$-1.79 \cdot 10^3$
0.5	284.4	$2.71 \cdot 10^3$	250.8	$-1.39 \cdot 10^3$
(dap-phe)· 2CF <sub>3</sub> COOH				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	277	$4.81 \cdot 10^3$	246.4	$-5.70 \cdot 10^3$
0.3	273.2	$4.76 \cdot 10^3$	245.4	$-5.70 \cdot 10^3$
0.5	274.6	$4.92 \cdot 10^3$	245.4	$-5.64 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (dap-phe)				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	279.6	$3.61 \cdot 10^3$	248.2	$-3.19 \cdot 10^3$
0.3	280.4	$3.15 \cdot 10^3$	248.0	$-3.25 \cdot 10^3$
0.5	282	$2.45 \cdot 10^3$	246.0	$-1.88 \cdot 10^3$
(dab-phe)· 2CF <sub>3</sub> COOH				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	275.2	$5.15 \cdot 10^3$	245.4	$-5.72 \cdot 10^3$
0.3	274.8	$5.00 \cdot 10^3$	246.0	$-5.65 \cdot 10^3$
0.5	274.4	$4.78 \cdot 10^3$	244.8	$-5.90 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (dab-phe)				
ri	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	278.6	$5.57 \cdot 10^3$	246.2	$-5.53 \cdot 10^3$
0.3	276.8	$5.78 \cdot 10^3$	248.2	$-5.17 \cdot 10^3$
0.5	279.4	$5.87 \cdot 10^3$	247.0	$-4.89 \cdot 10^3$

Taula 4. Valors de  $l_{\max}$ ,  $l_{\min}$ ,  $q_{\max}$ , i  $q_{\min}$  obtinguts dels espectres de DC pels diferents lligands i complexos, per cada raó molar estudiada (ri= 0.1, 0.3, 0.5).

Tot i que el tipus de modificació que generen els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{dap-Metala})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{dab-Metala})$  sobre l'espectre de DC del DNA segueix la mateixa tendència que les modificacions generades per  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ala})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$  (quan  $r_i$  augmenta,  $\theta_{\max}$  disminueix i  $\lambda_{\max}$  augmenta), els canvis en  $\theta$  i  $\lambda$  en funció de  $r_i$  són més pronunciats en aquests darrers complexos,  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ala})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$ . Aquests compostos, a diferència dels seus anàlegs esterificats, presenten un protó acídic que pot interaccionar per pont d'hidrogen amb el DNA, i augmentar així l'efecte generat pel complex. També s'observa un augment en els canvis de  $\theta$  i  $\lambda$  al passar del complex amb el lligand quelatant de dos metilens ( $\text{PtCl}_2(\text{dap-Metala})$  o  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ala})$ ) al complex que té el lligand amb tres metilens ( $\text{PtCl}_2(\text{dab-Metala})$  o  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$ ). D'aquesta manera és el complex  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$  el que mostra un espectre de DC amb més canvis en els valors de  $\theta$  i  $\lambda$  en funció de  $r_i$ . Així doncs, es pot diferenciar l'efecte de tenir o no un protó acídic terminal en el substituent i l'efecte de tenir un lligand quelatant de dos o tres metilens.

En els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{dap-phe})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{dab-phe})$ , també existeix un canvi de comportament en la modificació de l'espectre del DNA al passar del lligand quelatant de dos metilens al de tres metilens. Per tant, el fet de tenir un lligand quelatant més gran o menys influeix en la interacció amb l'àcid nucleic.

#### 4.2.2. Estudi de la interacció Pt-GMP per RMN- $^1\text{H}$ .

El mecanisme d'acció de les drogues antitumorals de platí es pot interpretar en termes d'una interacció bifuncional amb el DNA de les cèl·lules tumorals, per exemple amb els N7 de les guanines. L'estudi de la interacció dels complexos antitumorals de platí amb nucleòtids o nucleòsids facilita la determinació del mecanisme d'actuació. En aquest sentit, s'ha estudiat el transcurs de la reacció dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{dap-Metala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dab-Metala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dap-phe})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{dab-phe})$  amb 5'-GMP a través de l'espectroscopia RMN- $^1\text{H}$  i els resultats obtinguts es mostren en la Figura 11 i Figura 12.

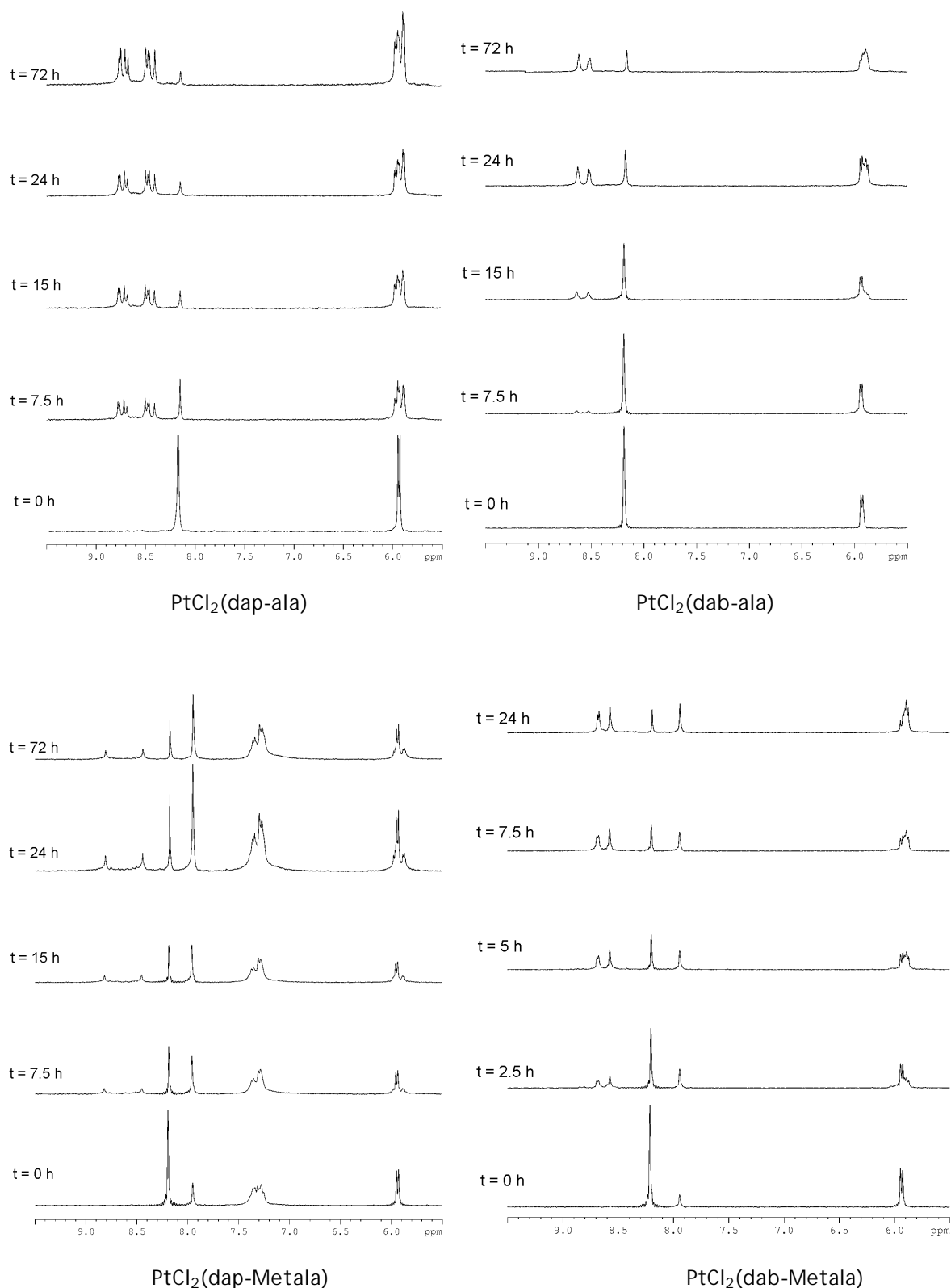


Figura 11. Espectres de RMN-<sup>1</sup>H obtinguts en l'estudi de la interacció dels complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala), PtCl<sub>2</sub>(dab-Metala) amb 5'-GMP. Els espectres han estat enregistrats a 37<sup>a</sup>C, pH=7 (tampó fosfat) i en D<sub>2</sub>O o D<sub>2</sub>O + DMF d<sub>7</sub>.

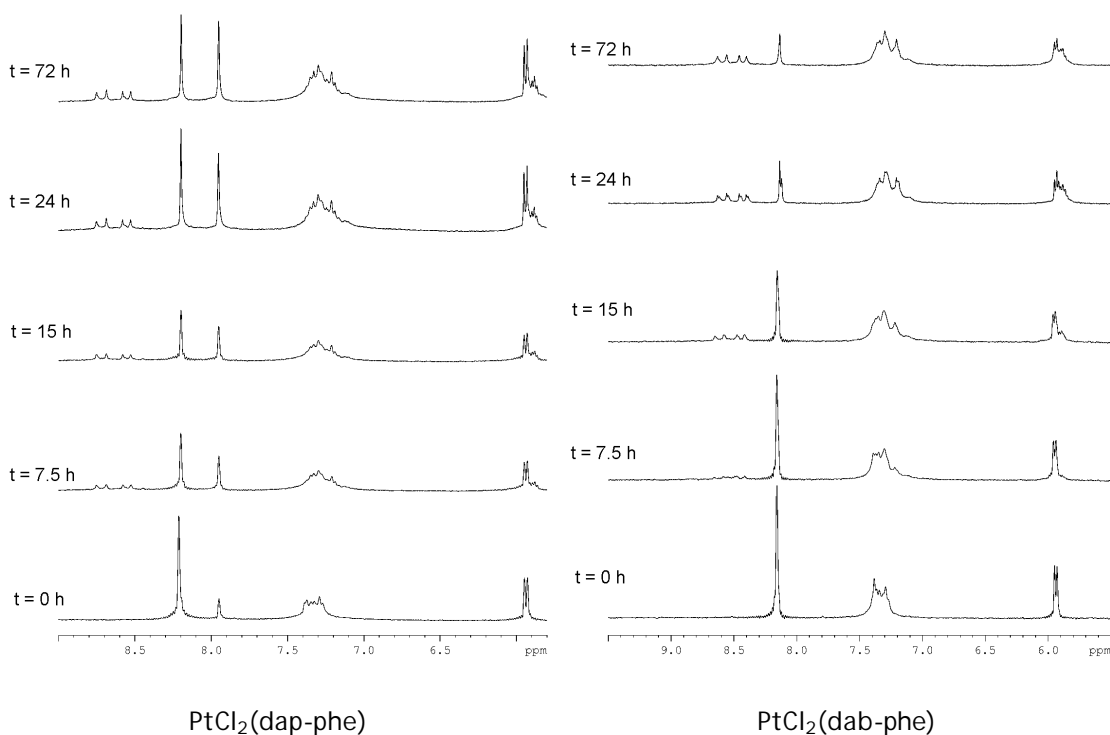


Figura 12. Espectres de RMN-<sup>1</sup>H obtinguts en l'estudi de la interacció dels complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) amb 5'-GMP. Els espectres han estat enregistrats a 37°C, pH=7 (tampó fosfat) i en D<sub>2</sub>O o D<sub>2</sub>O+DMF d<sub>7</sub>.

Les reaccions s'han seguit controlant la disminució de la intensitat del senyal corresponent al H8 de la 5'-GMP lliure i l'aparició dels senyals corresponents al H8 de la 5'-GMP unida al platí (Figura 13).

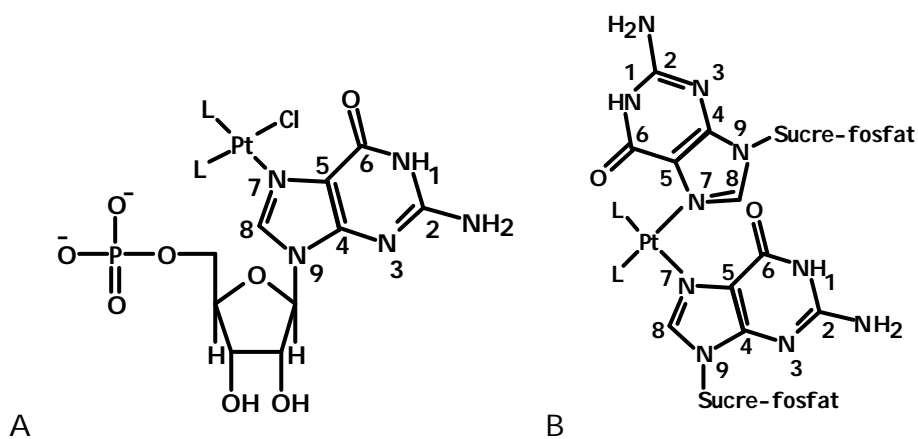


Figura 13. Estructura del mono-adducte (A) i bis-adducte (B) Pt-5'GMP

En tots els casos s'ha observat el desplaçament cap a valors de  $\delta$  (ppm) més elevats del H8 de la 5'-GMP (8.1 ppm pel H8 de la 5'-GMP lliure; 8.5-8.6 ppm pel H8 de la 5'-GMP unida al platí). Aquest fet indica que, en tots els complexos, el punt de coordinació de la 5'-GMP és la posició N7.

La reacció dels complexos PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala), PtCl<sub>2</sub>(dab-Metala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) i PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) dona lloc a l'aparició de 4 senyals nous corresponents a H8 resultat de la formació dels bis-adductes amb 5'-GMP. La formació de l'adducte entre 5'-GMP i els complexos racèmics de platí dona lloc a 2 diasteroisòmers cada un dels quals dona lloc a 2 senyals H8, proporcionant un total de 4 senyals. En els complexos PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala) i PtCl<sub>2</sub>(dab-Metala) s'observa una lleugera superposició d'aquests senyals.

La reacció del complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) amb 5'-GMP dona lloc a l'aparició de 8 senyals nous corresponents al H8 de 5'-GMP. L'existència de 8 senyals en comptes de 4 es pot atribuir a la presència de rotàmers.

Els resultats obtinguts del percentatge de bis-adducte format en funció del temps es mostren en la Figura 14. Els temps de vida mitja determinats ( $t_{1/2}$ ) corresponen al temps que tarda el 50% de la quantitat de complex lliure al formar els bis-adductes.

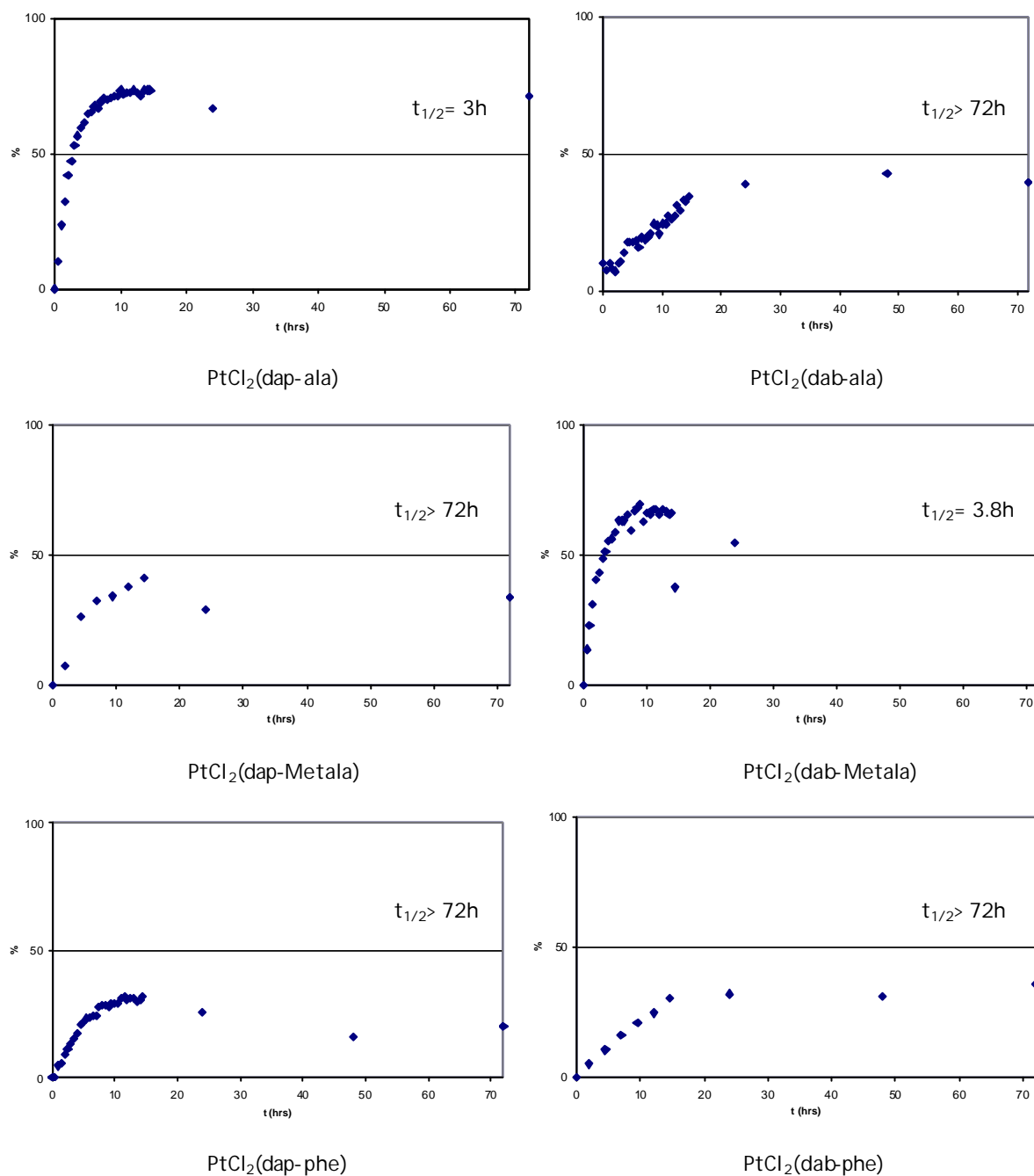


Figura 14. Representació gràfica de l'evolució en el temps de la interacció dels complexos amb 5'-GMP, mostrant la formació del bis-adducte. Els temps de vida mitja ( $t_{1/2}$ ) de la formació dels bis-adductes s'han determinat gràficament.

Com es pot observar amb els resultats presentats, el complex que reacciona més ràpidament amb 5'-GMP és el PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) amb  $t_{1/2}$  = 3h, seguit pel complex PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala) amb  $t_{1/2}$  = 3.8h. Els altres complexos presenten temps de vida mitja superiors al

temps de l'experiment. Aquests resultats ja es podien deduir a través de les intensitats dels senyals dels espectres de RMN-<sup>1</sup>H. En general sembla que els complexos amb el lligand diaminoquelatant dap reaccionen més ràpidament que els anàlegs amb el lligand dab, exceptuant el complex PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala).

El fet que alguns d'aquests complexos reaccionin lentament amb 5'-GMP, fins i tot més lentament que els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab), PtCl<sub>2</sub>(Etdap) i PtCl<sub>2</sub>(Etdab) presentats en el capítol 3, es pot atribuir a la concentració de 5'-GMP existent respecte a la concentració de complex. En aquest cas s'ha emprat una relació 2:1 en comptes d'una relació 4:1 (emprada en el capítol 3). Un augment de la concentració de 5'-GMP facilitaria l'augment de la velocitat de reacció i es podria establir més clarament una relació estructura-activitat.

#### 4.2.3. Estudi de la interacció Pt-DNA per electroforesi en gel d'agarosa.

El DNA de plasmidi **pBR322** (de procedència bacteriana) utilitzat en aquesta electroforesi és circular i pot presentar una estructura terciària definida o superenrotllament. Aquest DNA pot presentar dues formes diferents: forma circular covalentment tancada (**CCC**) que presenta un determinat nombre de voltes superhelicoidals, i la forma circular oberta (**OC**) que no presenta superenrotllament.<sup>33</sup>

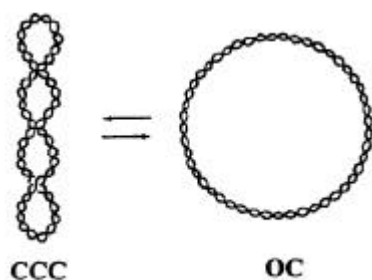


Figura 15. Representació de les dues conformacions que presenta el plasmidi de DNA pBR322: la circular covalentment tancada (CCC) i la circular oberta (OC).

En unes condicions experimentals determinades, la velocitat de migració de les dues formes és proporcional al nombre de voltes superhelicoidals. Per tant, com més

voltes, més compacta és l'estructura i augmenta la mobilitat a través del gel. Els complexos metàl·lics poden provocar una disminució del superenrotllament o una compactació del plasmidi,<sup>37,38</sup> de manera que es pot esperar una variació en la mobilitat electroforètica de les diferents formes.

Per tal d'estudiar els efectes que produeixen els compostos sintetitzats sobre l'estructura terciària del DNA, s'ha realitzat l'electroforesi del DNA pBR322 incubat amb els lligands [(dap-Metala) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-Metala) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-phe) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH] i [(dab-phe) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH] i els corresponents complexos de Pt(II) a 37°C durant 24 hores, i s'han comparat amb dos controls:

- a. Control negatiu: plasmidi sol.
- b. Control positiu: plasmidi incubat amb el cisplatí a les mateixes raons molars que els altres compostos ( $r_i = 0.3, 0.5$ ).

És ben conegut que raons molars de cisplatí moderades provoquen un retard en la mobilitat electroforètica de la forma CCC, i augmenten lleugerament la mobilitat de la forma OC. Per això s'utilitza cisplatí com a control positiu.<sup>39</sup>

Els resultats obtinguts de l'anàlisi electroforètic del DNA tractat amb els compostos mencionats anteriorment es mostren en la Figura 16 i Figura 17.



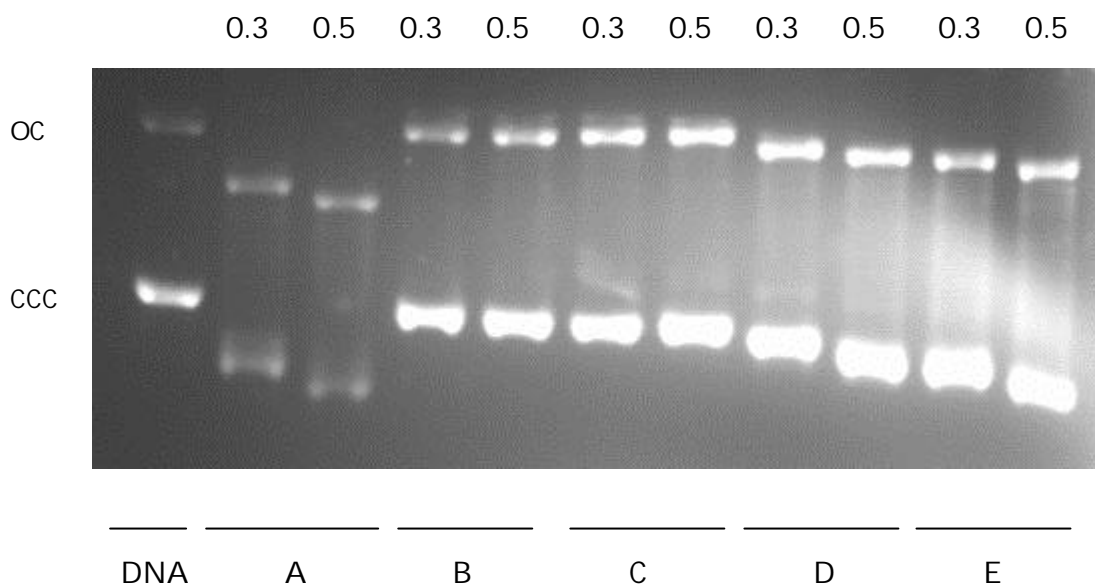


Figura 16. Patró de mobilitat electroforètica a 0.7 V/cm (16 h) del DNA de pBR322 natiu i incubat amb els compostos, essent A=cisplatí, B=[(dap-Metala)· 2CF<sub>3</sub>COOH], C=[(dab-Metala)· 2CF<sub>3</sub>COOH], D=PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), E=PtCl<sub>2</sub>(dab-ala). El senyal superior correspon a la forma OC del DNA, i el senyal inferior a la forma CCC.

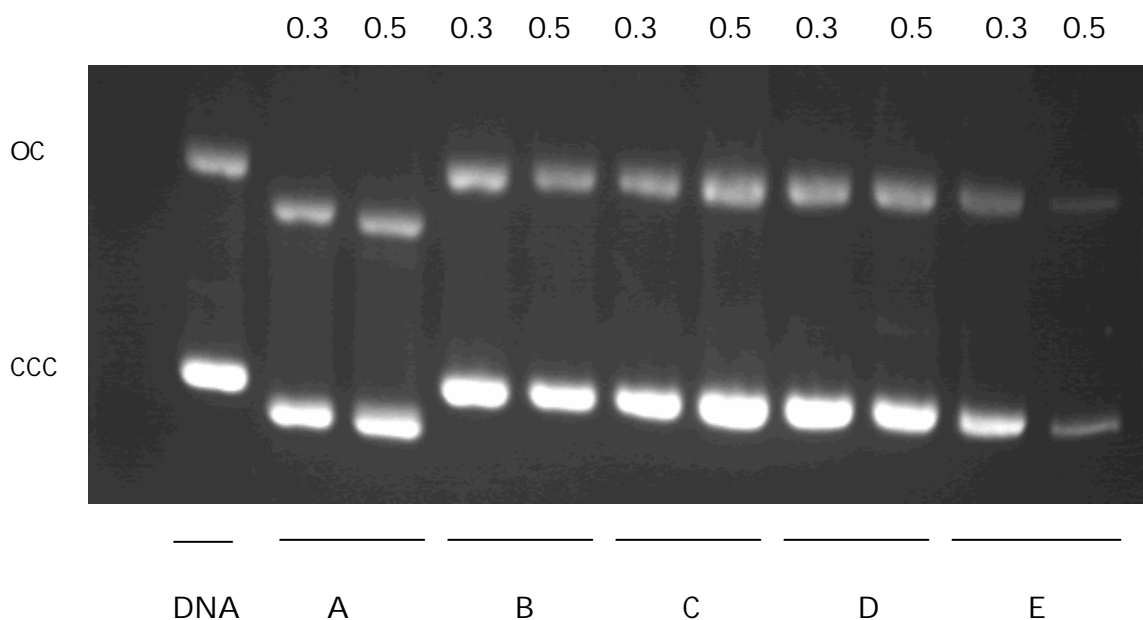


Figura 17. Patró de mobilitat electroforètica a 5 V/cm (4 h) del DNA de pBR322 natiu i incubat amb els compostos, essent A=cisplatí, B=[(dap-phe)· 2CF<sub>3</sub>COOH], C=[(dab-phe)· 2CF<sub>3</sub>COOH], D=PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), E=PtCl<sub>2</sub>(dab-phe). El senyal superior correspon a la forma OC del DNA i el senyal inferior a la forma CCC.

A través de la Figura 16 es pot observar que el comportament del cisplatí difereix de l'esperat. En aquest cas, el DNA tractat amb el cisplatí presenta dos senyals. El superior correspon al comportament típic del cisplatí, resultat de l'augment de la mobilitat de la forma OC i el retard de la mobilitat de la forma CCC. El senyal inferior correspon a una forma de DNA que presenta una mobilitat més gran que la forma CCC del DNA control. Aquest senyal correspon segurament a molècules de DNA hidrolitzat durant la incubació. Aquest resultat es pot esperar si durant la conservació prèvia a la preparació de la mostra l'estat del DNA s'ha modificat. Si algunes molècules de DNA CCC perden la seva compactació típica, al tractar-les amb el cisplatí, la droga pot arribar a fragmentar-les.

Els lligands [(dap-Metala) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH] i [(dab-Metala) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH] no modifiquen significativament ni la mobilitat de la forma OC ni la mobilitat de la forma CCC, suggerint que, o bé no generen cap canvi sobre l'estructura terciària del DNA o bé els canvis que provoquen no són prou importants com per distingir-se amb aquesta tècnica. Per altra banda, els respectius complexos generen canvis més notables, augmentant la mobilitat de la forma OC i de la forma CCC, essent el complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) el que augmenta la mobilitat amb més intensitat. Aquest augment de la mobilitat electroforètica implica que els complexos augmenten el grau de compactació de la doble hèlix del plasmidi. Contràriament al tractament amb cisplatí, ni en el cas dels lligands ni dels complexos s'observa evidències clares de la fragmentació del DNA.

En el cas dels compostos que contenen la fenilalanina (Figura 17), [(dap-phe) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-phe) $\cdot$ 2CF<sub>3</sub>COOH], PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) i PtCl<sub>2</sub>(dab-phe), s'observa que els lligands no modifiquen significativament la mobilitat electroforètica de les dues formes de DNA, de forma similar als lligands de l'alanina. En canvi, els dos complexos generen un lleuger augment de la mobilitat de la forma OC i CCC. Aquesta modificació suggereix que PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) i PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) provoquen un augment de la compactació del DNA.

Per tal d'observar quin és l'efecte que realment produeixen aquests lligands i complexos sobre el DNA a les 24 h d'incubació, s'han enregistrat les imatges de AFM, els resultats dels quals es mostren en l'apartat següent.

#### 4.2.4. Imatges de microscopia de forces atòmiques.

Un cop comprovat que els complexos de Pt(II) estudiats interaccionen amb el DNA, s'ha visualitzat l'efecte que aquests produeixen sobre l'estructura de l'àcid nucleic a través de la microscopia de forces atòmiques. Les imatges obtingudes s'han comparat amb les dels respectius lligands i amb les del DNA lliure. Per aquests estudis s'ha utilitzat plasmidi pBR322, de la mateixa manera que en electroforesi en gel d'agarosa.

A través de les imatges de AFM es pot observar els efectes que poden induir els complexos metàl·lics, com la disminució o augment del superenrotllament, la compactació del plasmidi, i fins i tot l'agregació de molècules de DNA.

Els canvis estructurals provocats per la interacció dels complexos de platí amb el DNA i els respectius lligands, transcorregudes 24 hores d'incubació a 37 °C es mostren en la Figura 18 i Figura 19.

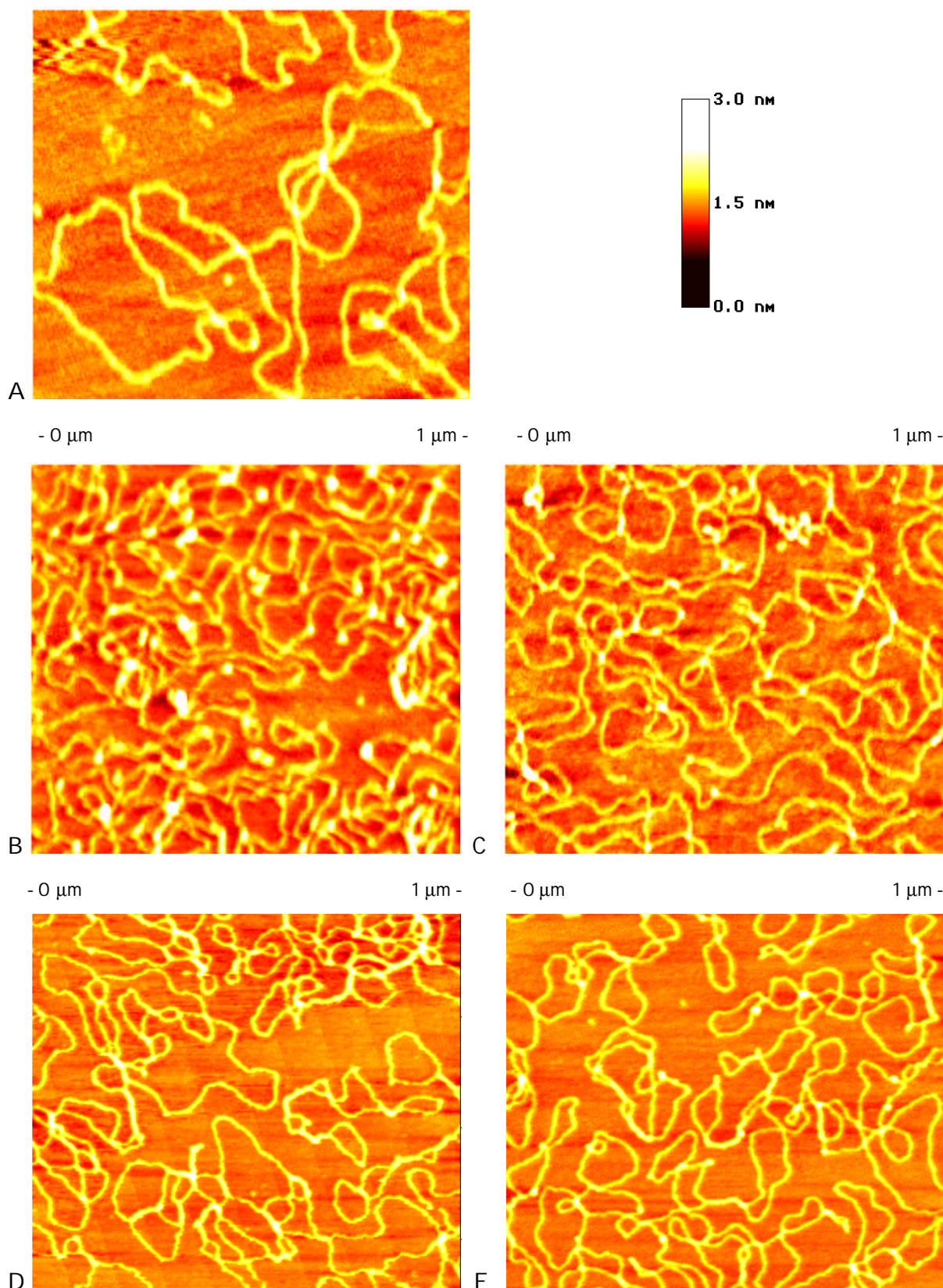


Figura 18. Imatges de AFM del pBR322 sol (figura A) i del pBR incubat amb els lligands [(dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH] (figures B, D) i del pBR322 incubat amb els complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), (figures C, E) a 37 °C i durant 24 hores.

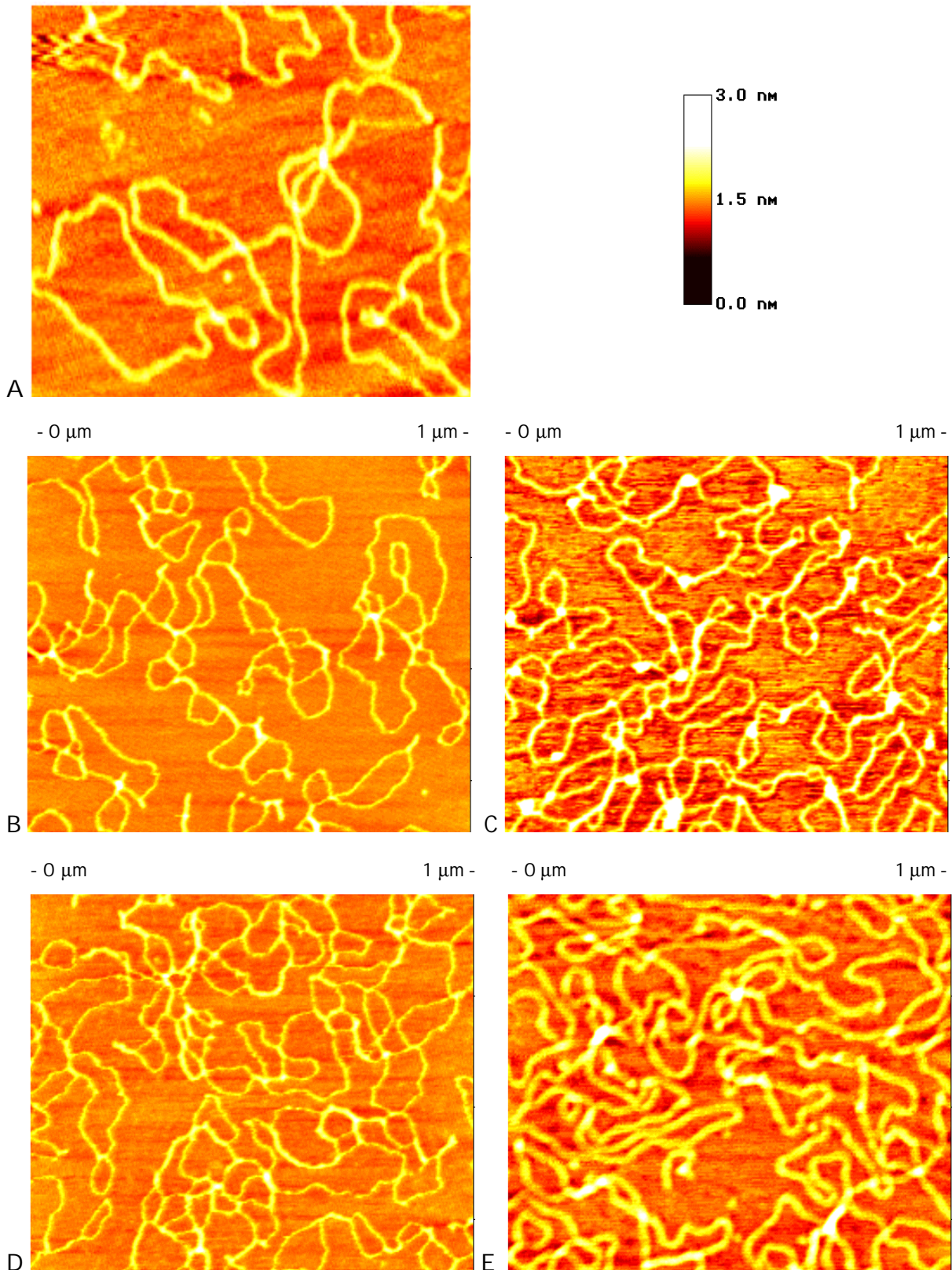


Figura 19. Imatges de AFM del pBR322 sol (figura A) i del pBR incubat amb els lligands [(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], (figures B, D) i del pBR322 incubat amb els complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe), (figures C, E) a 37 °C i durant 24 hores.

A través de les imatges enregistrades es pot observar com el plasmidi sense tractar (imatge A de la Figura 18 i Figura 19) presenta la seva estructura circular amb diferents voltes superhelicoidals.

En presència dels lligands (imatges B, D de la Figura 18 i Figura 19), les diferents molècules de DNA experimenten un cert recargolament, però el que resulta remarcable és que pateixen una agregació important. Aquests efectes s'atribueixen a interaccions per pont d'hidrogen amb la doble hèlix.<sup>1b,40</sup> Els diferents lligands estudiats presenten en la seva estructura diversos punts possibles perquè es produeixi aquest tipus d'interacció feble, el grup carboxilat i els dos grups amina. Aquesta característica permet explicar perquè l'agregació de molècules de DNA és tan important. S'han descrit diversos estudis en els que s'observa la formació d'enllaços dèbils per pont d'hidrogen intermoleculars entre els grups amina de diverses amines i àcid nucleics i el grup carboxilat d'àcids carboxílics.<sup>41</sup> Això explicaria perquè els lligands estudiats poden unir diferents molècules de plasmidi entre si sense enllaçar-se covalentment al DNA. Aquestes observacions concorden amb els resultats de dicromisme circular, a través dels quals es dedueix que els lligands no modifiquen significativament l'estructura secundària del DNA. Per altra banda, a través de l'electroforesi en gel d'agarosa no s'apreciava cap efecte sobre el DNA, i en canvi, a través de les imatges de AFM es demostra l'existència d'una activitat per part dels lligands.

En incubació amb els complexos de Pt(II) (figures C, E, de la Figura 18 i Figura 19), el DNA pateix una modificació en la compactació de les seves molècules, més important que en els lligands, i també una agregació. Aquest doble efecte és degut, per una banda, a la unió covalent amb el DNA a través del metall, de manera que modifiquen la seva estructura terciària augmentant la intensitat de compactació de la forma CCC i OC, i per altra banda, a través del grup carboxilat del lligand agrupen diferents molècules de plasmidi per interaccions dèbils per pont d'hidrogen. Aquests resultats estan d'acord també amb els obtinguts per dicromisme circular i per electroforesi en gel d'agarosa. Els resultats de dicromisme indicaven que existeix una interacció covalent complex-DNA que modifica l'estructura de l'àcid nucleic i els resultats d'electroforesi

mostraven un avanç electroforètic de les dues formes de DNA deduïent-se un augment de la compactació de la doble hèlix.

#### 4.2.5. Assaigs de proliferació cel·lular.

L'objectiu d'aquests assaigs biològics és l'estudi dels efectes que produeixen els complexos de platí en el creixement in vitro d'una línia cel·lular i determinar el valor de la  $IC_{50}$  (concentració de complex en la qual es produeix el 50 % de mort cel·lular).<sup>42,43,44</sup>

En l'estudi del creixement in vitro de les cèl·lules incubades amb els complexos de platí, s'estableix el número de cèl·lules vives utilitzant un tint cromòfor basat en sals de tetrazol. El temps d'incubació amb aquest tint depèn de la capacitat metabòlica de les cèl·lules. Per obtenir un increment significatiu de la intensitat de color són suficients de dues a cinc hores d'incubació a 37 °C. Transcorregut el temps necessari, es comptabilitza el número de cèl·lules vives en funció d'aquesta intensitat, mesurada a través d'un lector ELISA. Com més elevada és la intensitat, més gran és el percentatge de cèl·lules vives.

La citotoxicitat dels complexos que són més solubles en aigua s'ha determinat per incubació d'aquests a 37 °C durant 24h, 48h i 72h en la línia cel·lular HeLa (línia de carcinoma humà d'úter) i HL60 (línia de leucèmia aguda promielocítica), i els resultats obtinguts s'han comparat amb els del cisplatí i carboplatí. Els efectes dels complexos en la proliferació cel·lular es mostren representats com a percentatge (%) de supervivència en front de la concentració de complex ( $\mu M$ ), tal i com es mostra en la Figura 20 i Figura 21, i els valors de  $IC_{50}$  es recullen en la Taula 5.

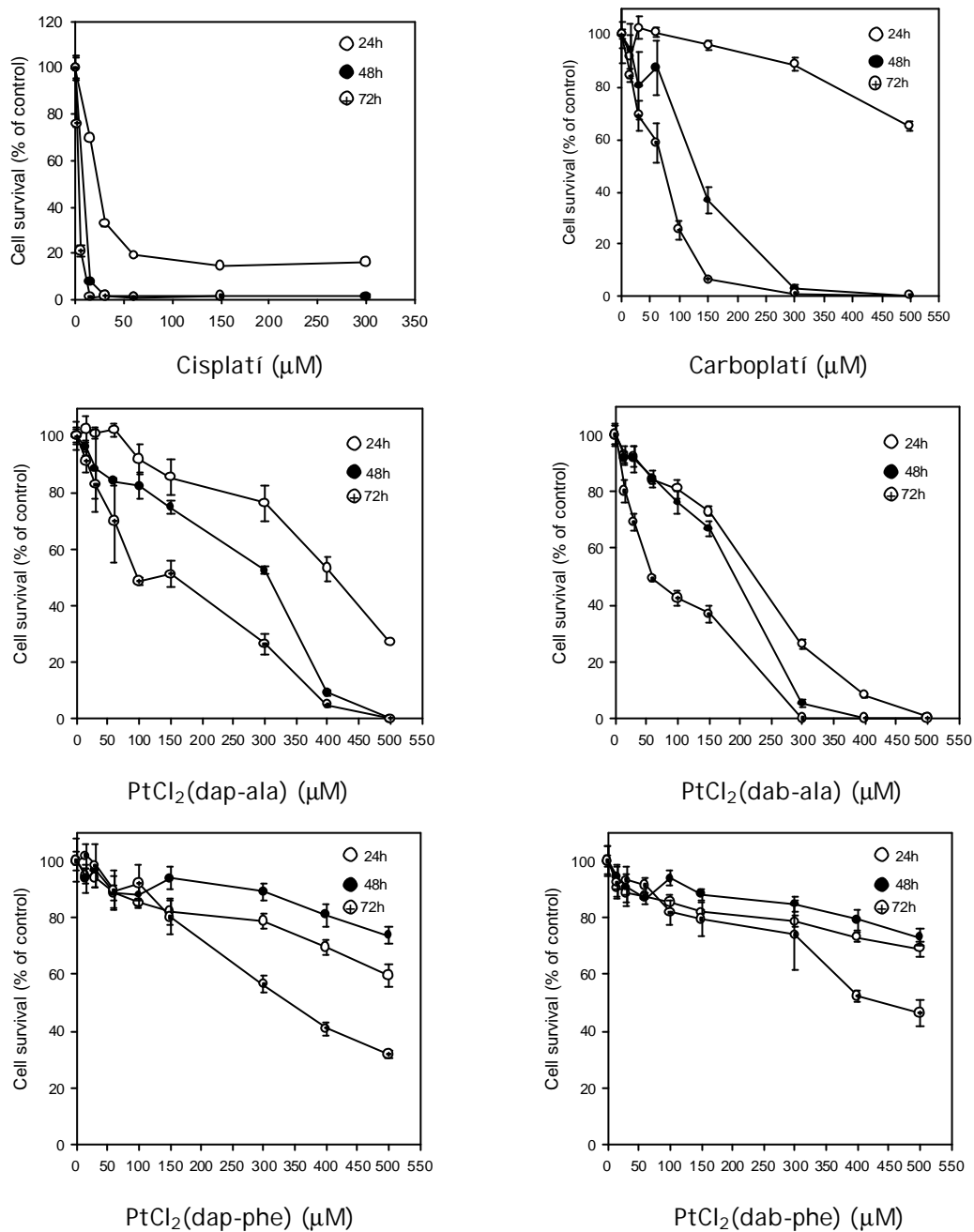


Figura 20. Corbes de citotoxicitat dels complexos cisplatí, carboplatí, PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) en la línia cel·lular HeLa, a 24h, 48h, 72h d'incubació.



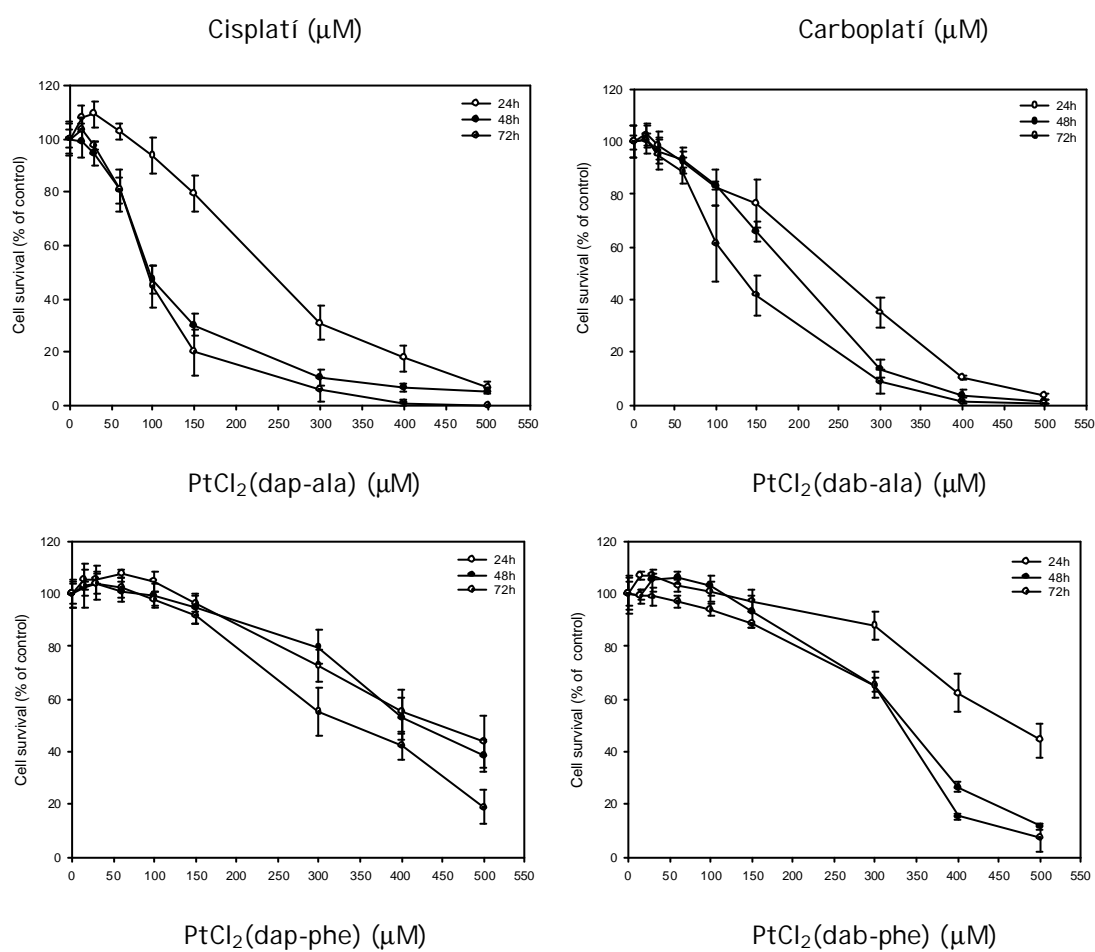


Figura 21. Corbes de citotoxicitat dels complexos cisplatí, carboplatí, PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) en la línia cel·lular HL-60, a 24h, 48h, 72h d'incubació.

<b>HeLa</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
Cisplatí	20	7	2.5
Carboplatí	>500	125	65
PtCl <sub>2</sub> (dap-ala)	415	310	160
PtCl <sub>2</sub> (dab-ala)	220	190	60
PtCl <sub>2</sub> (dap-phe)	>500	>500	335
PtCl <sub>2</sub> (dab-phe)	>500	>500	440
<b>HL-60</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
Cisplatí	12.5	3	2.5
Carboplatí	243	60	30
PtCl <sub>2</sub> (dap-ala)	240	98	90
PtCl <sub>2</sub> (dab-ala)	245	195	130
PtCl <sub>2</sub> (dap-phe)	448	420	340
PtCl <sub>2</sub> (dab-phe)	470	340	330

**Taula 5.** Valors de IC<sub>50</sub> (concentració de complex en la qual es produeix el 50% de mort cel·lular) expressats en mM per cada un dels complexos de Pt (II) sintetitzats, en la línia cel·lular HeLa.

En la línia cel·lular HeLa s'observa que els complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) i PtCl<sub>2</sub>(dab-ala) presenten un efecte citotòxic destacable, provocant una disminució del percentatge de supervivència cel·lular a mesura que augmenta la concentració de complex. Aquesta disminució segueix la mateixa tendència que la presentada pel carboplatí, i s'allunya bastant de l'efecte mostrat pel cisplatí. Aquest efecte citotòxic que mostren els complexos de l'alanina és més important a mesura que augmenta el temps d'incubació. Comparant els valors de IC<sub>50</sub> obtinguts en cada complex amb les IC<sub>50</sub> del carboplatí (Taula 5), es pot destacar la major activitat que presenten els complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) i PtCl<sub>2</sub>(dab-ala) després de 24 h d'incubació, essent les respectives IC<sub>50</sub> de 415 i 200 µM, mentre que el carboplatí encara mostra un percentatge de supervivència superior al 50% a una concentració de 500 µM. A partir de les 48 h d'incubació, el carboplatí es mostra

més efectiu que els altres dos complexos, i si s'observa els valors de  $IC_{50}$ , el complex  $PtCl_2(dab-ala)$  és el que es comporta de forma més similar al carboplatí, assolint gairebé la mateixa  $IC_{50}$  a les 72 h d'incubació.

En els complexos  $PtCl_2(dap-phe)$  i  $PtCl_2(dab-phe)$  l'efecte citotòxic no es tan important, doncs la disminució de la supervivència cel·lular es produeix molt lentament a mesura que augmenta la concentració de complex. Amb un temps d'incubació de 72 h l'efecte de mort cel·lular és més destacable, podent-se determinar ja el valor de la  $IC_{50}$ , però aquest resulta ser encara molt elevat (335 i 440  $\mu M$ , respectivament). En les corbes de citotoxicitat d'aquests dos complexos també es pot observar que la supervivència cel·lular és més gran a les 48h d'incubació que a les 24h, quan el que s'esperaria és just a l'inversa. La causa d'aquest fenomen es troba en la replicació de les cèl·lules. La línia HeLa es caracteritza per replicar-se molt ràpidament, de manera que, si durant el tractament amb els complexos de platí queden cèl·lules vives, aquestes es poden replicar, i augmentar així el percentatge de supervivència. Com es pot comprovar, després de 24h d'incubació l'activitat d'aquests complexos no és molt important, i s'observa un elevat percentatge de cèl·lules vives. Aquestes cèl·lules que no s'han vist afectades es poden replicar augmentant el número de cèl·lules vives presents. Per això, després de 48h d'incubació el percentatge de mort cel·lular és inferior. En canvi, a 72h d'incubació l'efecte del complex és prou important com per generar més mort cel·lular, quedant reflectit en els assaigs de proliferació cel·lular.

En la línia cel·lular HL-60 els complexos de platí sintetitzats també es mostren actius, disminuint el percentatge de supervivència cel·lular a mesura que augmenta la concentració de compost. Aquest efecte és més remarcable a mesura que augmenta el temps d'incubació, de manera que a 72h és on s'obtenen els valors més baixos de  $IC_{50}$  (Taula 5). Malgrat tot, per temps d'incubació moderats-altos (48 i 72h) l'activitat del carboplatí és superior a la dels complexos sintetitzats.

En aquesta línia cel·lular els complexos  $PtCl_2(dap-phe)$  i  $PtCl_2(dab-phe)$  són també els que es mostren menys actius, però la disminució de la supervivència cel·lular que generen és més gran que en la línia HeLa en temps d'incubació de 24 i 48h. Per temps

d'incubació alts (72h) l'efecte és similar en les dues línies cel·lulars. A través de les corbes de citotoxicitat es pot comprovar com el complex  $\text{PtCl}_2(\text{dab-phe})$ , tot i presentar una mort cel·lular inferior a la del seu anàleg  $\text{PtCl}_2(\text{dap-phe})$  després de 24h d'incubació, genera un augment de la mort cel·lular molt més important al passar de 24h a 48h d'incubació. En el complex  $\text{PtCl}_2(\text{dap-phe})$  l'augment de la mortalitat cel·lular es produeix de forma més progressiva amb l'augment del temps d'incubació. Això suggereix que el complex  $\text{PtCl}_2(\text{dab-phe})$  pot atravesar la membrana cel·lular amb més facilitat, degut segurament a la seva major hidrofobicitat.

El complex  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$  es mostra menys actiu que el seu anàleg  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ala})$  en la línia HL-60, mentre que en la línia HeLa el comportament era a l'inversa. Aquesta diferència pot ser atribuïda a la diferent sensibilitat de la línia cel·lular. Com es pot observar amb els resultats presentats, la línia HL-60 en general és més sensible als tractaments amb els complexos de platí. La seva naturalesa hematopoietica no la fa tan resistent a les agressions fisico-químiques, i com a conseqüència la mort cel·lular en aquesta línia cel·lular és més important.

Amb els resultats obtinguts es fa evident que en les condicions emprades en els assaigs de proliferació, els complexos de l'alanina són més actius que els de la fenilalanina en les línies cel·lulars HeLa i HL-60. La cadena lateral de l'alanina és un grup  $\text{CH}_3$  molt menys voluminós que l'anell aromàtic de la fenilalanina, de manera que el complex pot atravesar la membrana cel·lular amb menys dificultat. Si els complexos de l'alanina poden entrar més ràpidament en la cèl·lula, aquests poden accedir més fàcilment en el nucli i actuar més intensament. Tot i que en in vitro els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{dap-phe})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{dab-phe})$  entren amb dificultat en la cèl·lula, per dicroisme circular i AFM s'ha demostrat que sense barreres cel·lulars i en incubació amb el DNA, aquests poden interaccionar covalentment amb l'àcid nucleic.

#### **4.2.6. Determinació de la mort cel·lular per apoptosi.**

##### **4.2.6.1. Citometria de flux.**

Per conèixer la causa de la mort cel·lular observada en els assaigs de proliferació es realitza un estudi de distinció de cèl·lules apoptòtiques a través de la citometria de

flux, de la mateixa com s'havia realitzat en els complexos presentats en el Capítol 3, pàg 121.<sup>45,46,47</sup>

Els citogrames obtinguts de les cèl·lules HL60 tractades amb els diferents complexos, PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) i carboplatí a una concentració de 150 µM i amb cisplatí a una concentració de 15 µM, durant 48 hores d'incubació, es mostren en la Figura 22. Com a control s'utilitza cèl·lules HL60 sense tractar. Les cèl·lules vives (An-/PI-) apareixen en el quadrant baix-esquerre (R1), les cèl·lules apoptòtiques recents (An+/PI-) apareixen en el quadrant baix-dreta (R2), i les cèl·lules apoptòtiques tardanes (An+/PI+) apareixen en el quadrant dalt-dreta (R3). El quadrant dalt-esquerre (R4) correspon a cèl·lules necròtiques PI-, les quals presenten la membrana molt degradada o fins i tot la cèl·lula ja està fragmentada, de manera que només incorporen PI.

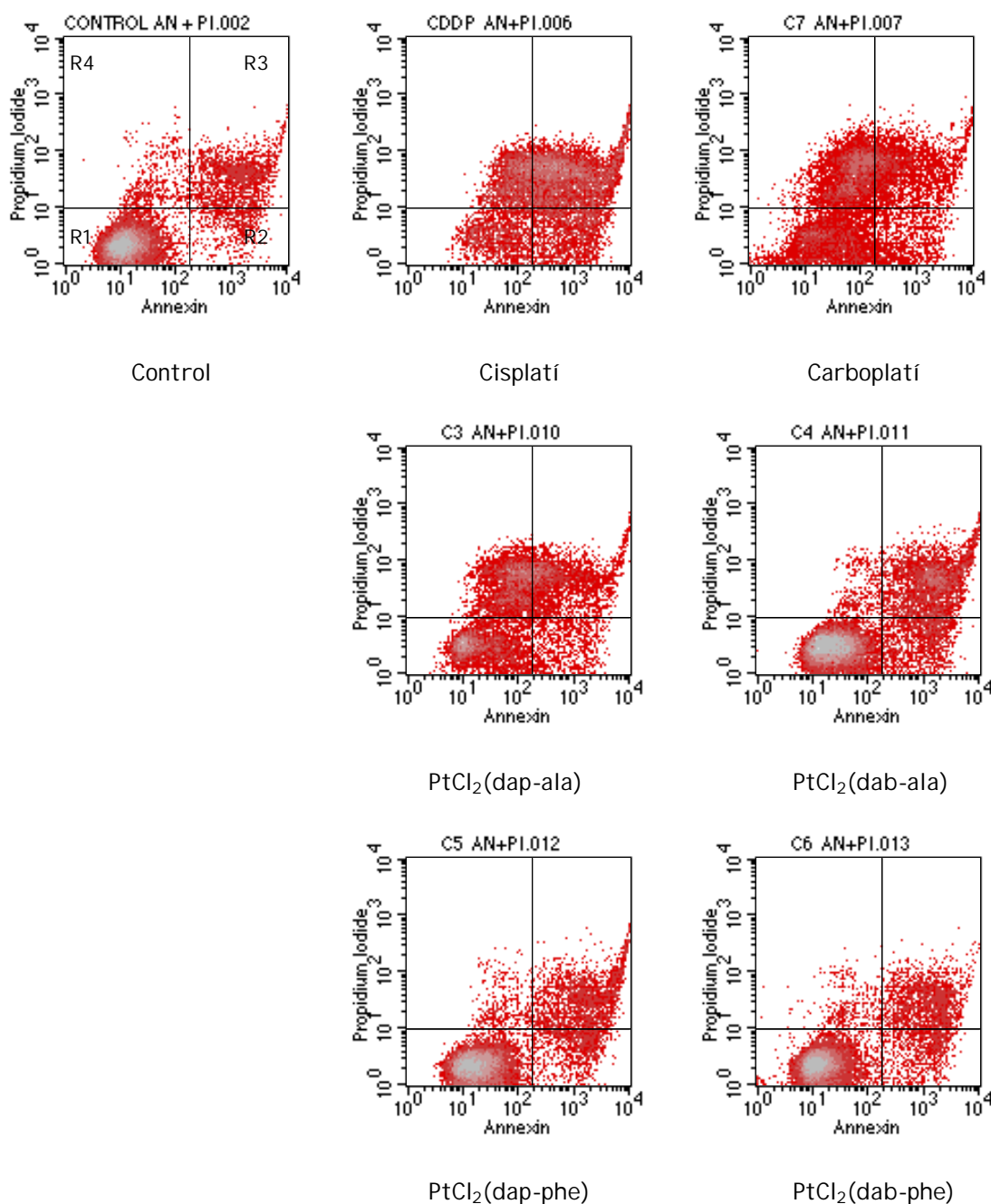


Figura 22. Citogrames obtinguts de les cèl·lules HL60 incubades durant 48h amb els complexos cisplati (15 mM), carboplati (150 mM), PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) (150 mM), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala) (150 mM), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) (150 mM), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) (150 mM). El control correspon a les cèl·lules HL60 sense tractar.

Els percentatges de les cèl·lules, respecte el total de la població, que es troben en les diferents fases de mort cel·lular es mostren en la Taula 6.

<b>Tractament</b>	<b>% cèl·lules vives (R1)</b>	<b>% cèl·lules apoptòtiques (R2)</b>	<b>% cèl·lules en apoptosi tardana (R3)</b>	<b>% cèl·lules necròtiques (R4)</b>
<b>Control</b>	83.21	2.99	10.82	2.99
<b>Cisplatí</b>	14.18	16.56	47.04	21.92
<b>Carboplatí</b>	43.0	8.15	16.89	31.96
<b>PtCl<sub>2</sub>(dap-ala)</b>	36.72	7.17	22.16	33.65
<b>PtCl<sub>2</sub>(dab-ala)</b>	65.52	9.0	23.03	2.45
<b>PtCl<sub>2</sub>(dap-phe)</b>	79.62	5.32	12.86	2.19
<b>PtCl<sub>2</sub>(dab-phe)</b>	82.12	5.08	10.59	2.21

**Taula 6.** Valors del % de cèl·lules apoptòtiques (An+/PI-) i cèl·lules necròtiques o en apoptosi tardana (An+/PI+) obtinguts en la incubació d'una població de cèl·lules HL60 durant 48 h amb els complexos cisplatí (15 mM), carboplatí (150 mM), PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) (150 mM), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala) (150 mM), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) (150 mM), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) (150 mM).

Aquests percentatges s'obtenen del tractament informàtic de les dades que dona el citòmetre a partir de la dispersió de la població cel·lular.

Com es pot observar en els resultats presentats, el cisplatí, tot i estar en una concentració més baixa que els altres compostos, és el que mostra un percentatge més elevat de cèl·lules apoptòtiques després de 48 h d'incubació. Aquest resultat ja és d'esperar perquè el cisplatí és molt actiu.

Comparant els resultats dels quatre complexos sintetitzats, els complexos de la fenilalanina, PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) i PtCl<sub>2</sub>(dab-phe), són els que presenten percentatges més baixos de cèl·lules apoptòtiques (de l'ordre del 5%), i els percentatges més alts de cèl·lules sanes (79.62% i 82.12% respectivament). Això indica que, en igualtat de condicions, aquests complexos són menys actius. Aquest efecte en la supervivència cel·lular ja s'havia apreciat en els resultats de proliferació cel·lular.

Observant els resultats dels complexos de l'alanina, el que presenta un percentatge d'apoptosi més gran és el PtCl<sub>2</sub>(dab-ala) amb un 9.0% davant del 7.17% del PtCl<sub>2</sub>(dap-ala). Tot i això, el PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) és el que presenta un percentatge més baix de cèl·lules vives, amb un 36.72%. Per tant, aquests resultats indiquen que, a les 48 h d'incubació, el complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) és més actiu que el seu anàleg, doncs presenta un

número més gran de cèl·lules afectades. El percentatge de cèl·lules vives que presenta el carboplatí és una mica més alt que el del PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), indicant que la seva activitat és lleugerament menor.

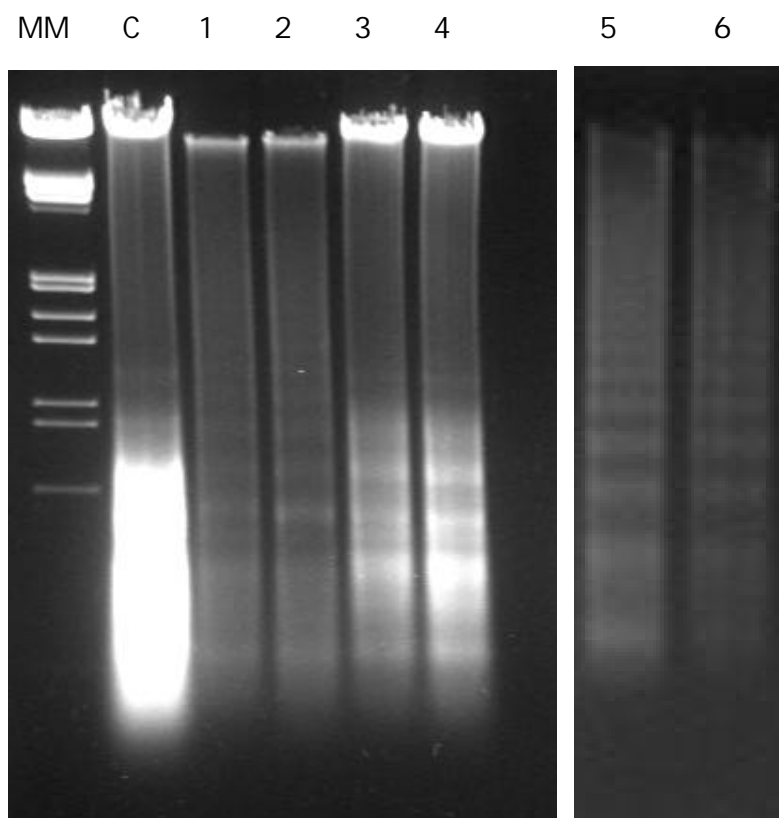
Malgrat tot, amb els resultats de citometria de flux s'ha pogut comprovar que el tipus de mort cel·lular que generen els complexos és apoptosi.

Per tal de corroborar el fenomen d'apoptosi, en les cèl·lules control i les tractades s'ha realitzat una extracció del DNA i s'ha analitzat per electroforesi en gel d'agarosa per tal d'observar el patró típic de fragments de 200 pb que produeix l'apoptosi. Els resultats es mostren en l'apartat següent.

#### 4.2.6.2. Electroforesi en gel d'agarosa del DNA de les cèl·lules tractades.

El patró electroforètic obtingut del DNA extret de les cèl·lules HL60 tractades amb una concentració de 300 µM dels complexos sintetitzats durant 72 hores es mostra en la Figura 23. Els resultats es comparen amb un control de DNA de les cèl·lules HL60 sense tractar (C) i un marcador molecular (MM).





**Figura 23.** Patró electroforètic del DNA extret de les cèl·lules HL60 tractades amb els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ala})$  (1),  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$  (2),  $\text{PtCl}_2(\text{dap-phe})$  (3),  $\text{PtCl}_2(\text{dab-phe})$  (4) a una concentració de 300 mM durant 72 h, carboplatí (5) a una concentració de 150 mM, i cisplatí (6) a una concentració de 15 mM. MM=marcador molecular, C=control.

Com es pot observar, el control presenta un senyal de pes molecular alt (21 KDa) degut al DNA genòmic sense fragmentar-se, i en la part inferior s'observa un segon senyal molt intens que es correspon majoritàriament a RNA i una mica de DNA de baix pes molecular.

En les condicions emprades i comparant amb l'efecte del carboplatí i cisplatí, tots els complexos provoquen una fragmentació del DNA generant fragments de 200 pb característics de l'apoptosi. La fragmentació generada pels complexos que contenen l'alanina és molt més important que la generada pels complexos de fenilalanina, ja que el patró electroforètic d'aquests últims mostra una menor degradació del senyal del DNA en comparació amb el DNA natiu. Per tant, els complexos de l'alanina provoquen una major fragmentació del DNA en les cèl·lules apoptòtiques.

## 5. CONCLUSIONS

-S'han sintetitzat i caracteritzat sis nous lligands diaminoquelatants funcionalitzats amb aminoàcids: [(dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH]. A partir d'aquests lligands s'han sintetitzat els següents complexos: PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala), PtCl<sub>2</sub>(dab-Metala), PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe), PtCl<sub>2</sub>(dap-Mettrp), PtCl<sub>2</sub>(dab-Mettrp).

-Els dos complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-Mettrp) i PtCl<sub>2</sub>(dab-Mettrp) presenten molts problemes de solubilitat i no s'han utilitzat pels estudis d'activitat biològica.

-A través dels estudis de DC s'ha comprovat que els lligands lliures no afecten l'estructura secundària del DNA, mentre que els complexos poden interaccionar covalentment amb la doble hèlix i modificar la seva estructura secundària. El complex PtCl<sub>2</sub>(dab-phe) es comporta de la mateixa manera que el cisplatí generant distorsions no desnaturalitzants en la doble hèlix, mentre que els altres complexos generen un canvi de la forma B a la forma C del DNA produint-se un augment de la curvatura del DNA per rotació de les bases nitrogenades.

-L'estructura dels complexos influeix en els canvis que es produeixen en l'el·lipticitat i longitud d'ona en funció de la raó molar. Existeixen diferències en el comportament en funció del tamany de l'anell que forma el lligand quelatant, de manera que els complexos amb el lligand dab provoquen modificacions més remarcables en els espectres de DC. També hi ha diferències de comportament depenent de la presència o no d'un grup carboxílic terminal. Així els complexos que presenten un grup carboxílic terminal provoquen modificacions més importants en l'espectre de DC que els complexos amb un grup éster terminal.

-El mecanisme d'actuació dels complexos s'ha estudiat a través del seguiment per RMN-<sup>1</sup>H de la interacció complex-5'GMP. S'ha comprovat que els complexos s'uneixen covalentment en la posició N7 del mononucleòtid formant adductes bifuncionals.

-A través d'electroforesi en gel d'agarosa i les imatges de AFM s'ha pogut determinar l'efecte que generen els lligands lliures i els complexos sobre l'estructura terciària del DNA. Els lligands produeixen un lleuger augment de la compactació i una important agregació del DNA degut a la possible capacitat de generar interaccions dèbils per pont d'hidrogen. Els complexos, per la seva banda, provoquen un important augment de la compactació i una agregació del DNA, degut a la unió covalent Pt-DNA i a unions dèbils per pont d'hidrogen a través dels lligands.

-L'activitat citotòxica dels complexos s'ha avaluat a través d'assaigs de proliferació cel·lular en les línies cel·lulars HeLa i HL-60. Els estudis in vitro demostren que els complexos solubles en aigua, PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe), presenten activitat antitumoral disminuint la supervivència cel·lular de forma gradual al augmentar la concentració de complex, de forma similar al carboplatí i no al cisplatí. Els més inactius són els complexos de la fenilalanina, el transport dels quals a través de la membrana cel·lular pot estar dificultat per problemes estèrics de l'anell aromàtic. En temps d'incubació baixos (24h) el complex PtCl<sub>2</sub>(dab-ala) és més actiu que PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) en la línia cel·lular HeLa, mentre que en HL-60 l'activitat dels dos compostos és similar. En temps d'incubació alts (72h) el complex PtCl<sub>2</sub>(dab-ala) és més actiu que el seu anàleg en la línia cel·lular HeLa, però l'efecte s'inverteix en la línia cel·lular HL-60. En general, l'activitat dels quatre complexos és més gran en la línia cel·lular HL-60.

-Els estudis de citometria de flux de les cèl·lules tractades amb aquests complexos i l'electroforesi del DNA extret d'aquestes cèl·lules demostren que el tipus de mort cel·lular que es produeix és principalment per apoptosi i no per necrosi.

## 6. REFERÈNCIES

---

- <sup>1</sup> a) M. Green, M. Garner, D.M. Orton. *Transition Met. Chem.*, **1992**, 17, 164-176. b) C. Molenaar, J-M. Teuben, R.J. Heetebrij, H.T. Tanke, J. Reedijk. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2000**, 5, 655-665. c) G. B. Onoa, G. Cervantes, V. Moreno, J.M. Prieto. *Nucl. Acids Res.*, **1998**, 26, 6, 1473-1480.
- <sup>2</sup> a) K. Charalabopoulos, S. Kaarkabounes, E. Loachim, V. Papalimneou, K. Syrigos, A. Evangelou, N. Agnantis, N. Hadjiliadis. *Eur. J. of Clinical Invest.*, **2002**, 32, 129-133. b) B. Lippert. *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 182, 263-295. c) Z.Z. Zdraveski, J.A. Mello, M.G. Marinus, J.M. Essigmann. *Chemistry and Biology*, **2000**, 7, 39-50.
- <sup>3</sup> a) V-M. Ohndorf, M.A. Rould, Q. He, C.O. Pabo, S.J. Lippard. *Nature*, **1999**, 399, 708-712. b) J-U. Lee, R. Hosotani, M. Wada, R. Doi, T. Kosiba, K. Fujimoto, Y. Miyamoto, C. Mori, N. Nakamura, K. Shiota, M. Imamura. *Anticancer Research*, **1997**, 17, 3445-3450. c) J. Zlatanova, J. Yaneva, S.H. Laube. *The FASEB journal*, **1998**, 12, 791-799.
- <sup>4</sup> a) V-M. Ohndorf, J.P. Whitehead, N.L. Raju, S.J. Lippard. *Biochemistry*, **1997**, 36, 14807-14815. b) S.V. Dunham, S.J. Lippard. *Biochemistry*, **1997**, 36, 11428-11436. c) P.M. Takahara, C.A. Frederick, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 12309-12321.
- <sup>5</sup> a). T.W.Hambley. *Coord. Chem. Rev.*, 1997, 166, 181-223. b). E.R. Jamieson, S.J. Lippard. *Chem. Rev.*, **1999**, 2451-2466. c). B. Lippert. *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 182, 263-295.
- <sup>6</sup> a) G.B. Onoa, G. Cervantes, V. Moreno, M.J. Prieto. *Nucl. Acids Res*, **1998**, 26, 6. b) J. Reedijk. *Current Opinion in Chemical Biology*, **1999**, 3, 136-240. c) H.C. Wong, R. Coogan, F.P. Intini, G. Natile, L.G. Marzilli. *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 777-787.
- <sup>7</sup> a) R.W. Mason, K. McGrouther, P.R.R. Ranatunge-Banolarage, G.H. Robinson, J. Simpson. *Appl. Organometal. Chem.*, **1999**, 13, 163-173. b) G. Caldwell, E.W. Nerise, C.E.J. van Rensburg. *Appl Organometal. Chem*, **1999**, 13, 189-194. c) N.J. Wheate, J. Grant Collins. *J. Inorg. Biochem*, **2000**, 78, 313-320.

- 
- <sup>8</sup> a) G. Faraglia, D. Fregona, S. Sitran, L. Giovagnini, C. Marzano, F. Baccichetti, U. Casellato, R. Graziani. *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, 83, 31-40. b) J.T. Reardon, A. Vaisman, S.G. Chaney, A. Sancar. *Cancer Research*, **1999**, 59, 3968-3971.
- <sup>9</sup> N.D. Sachinvala, H. Chen, W.P. Niemczura, E. Furusawa, I. Ganjian. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1791.
- <sup>10</sup> H.C. Afelbaum, J. Blum, F. Mandelbaumshawit. *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 186, 243.
- <sup>11</sup> a). J. Altman, M. Wilchek. *Inorg. Chim. Acta*, **1985**, 107, 165-168. b). J. Altman, M. Wilcheck. *Inorg. Chim. Acta*, **1985**, 101, 171-173.
- <sup>12</sup> I.E. Burgeson, N.M. Koshc. *Inorg. Chem.*, **1991**, 30, 4299-4305.
- <sup>13</sup> A. Iakovidis, N. Hadjiliadis. *Coord. Chem. Rev.*, **1994**, 135/136, 17-63.
- <sup>14</sup> A. Iakovidis, N. Hadjiliadis. H. Schollhorn, U. Thewalt, G. Trotscher. *Inorg. Chim. Acta*, **1989**, 164, 221-229.
- <sup>15</sup> J.E. Byfield, P.M.C. Jones. *Nature*, **1981**, 294, 281.
- <sup>16</sup> A. Pasini, E. Bersanetti. *Inorg. Chim. Acta.*, **1985**, 107, 259-267.
- <sup>17</sup> M. Hahn, M. Kleine, W.S. Sheldrick. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, 6, 556-566.
- <sup>18</sup> N.V. Kaminskaia, N.M. Kostic. *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 10, 2368-2377.
- <sup>19</sup> M. Louloudi, Y. Deligiannakis, N. Hadjiliadis. *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 6847-6851.
- <sup>20</sup> P. Garner, J.M. Park. *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 2361-2364.
- <sup>21</sup> E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos., **1995**, Alhambra Longman.
- <sup>22</sup> G. Grant. *Synthetic Peptides*, **1992**, W.H. Freeman and Company. New York.
- <sup>23</sup> M.L. González, J.M. Tercero, A. Matilla, J. Niclós-Gutiérrez, M.T. Fernández, M.C. López, C. Alonso, S. González. *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 1806-1812.
- <sup>24</sup> K. Nakamoto. Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, **1996**, 4<sup>th</sup> Edition, Wiley, New York.
- <sup>25</sup> J.P. Macquet, J.L. Butour. *Biochimie*, **1978**, 60, 901.
- <sup>26</sup> a).V. Brabec, V. Kleinwächter, J. Butour, M.P. Johnson. *Biophys. Chem.*, **1990**, 35, 129. b). R. Zaludová, A. Zakouská, J. Kaspárová, Z. Balcarová, V. Kleinwächter, Q. Vrána, N. Farrell, V. Brabec. *Eur. J. Chem.*, **1997**, 246, 508.

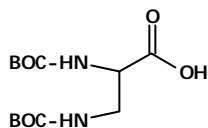
- 
- <sup>27</sup> W.C. Johnson, M.S. Itzkowitz, Y. Tinoco. *Biopolymers*, **1972**, 11, 225.
- <sup>28</sup> G. Cervantes, M.J. Prieto, V. Moreno. *Metal Based Drugs*, **1997**, 4, 9.
- <sup>29</sup> X. Riera, A. Caubet, C. López, V. Moreno. *Polyhedron*, **1999**, 18, 2549-2555.
- <sup>30</sup> G. Zhao, H. Sun, H. Lin, S. Zhu, X. Su, Y. Chen. *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, 72, 173-177.
- <sup>31</sup> V.X. Jin, J.D. Randford. *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 304, 38-44.
- <sup>32</sup> J. Whittaker, W.D. McFadyen, B.C. Baguley, V. Murray. *Anti-cancer Drug Design*, **2001**, 16, 81-89.
- <sup>33</sup> S.J. Lippard. *Acc. Chem. Res.*, **1978**, 11, 211.
- <sup>34</sup> K.W. Jannette, S.J. Lippard, G.A. Vassiliades, W.R. Bauer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1974**, 71, 3839.
- <sup>35</sup> V. Moreno, G. Cervantes, G.B. Onoa, F. Sampedro, P. Santaló, X. Solans, M. Font-Bardía. *Polyhedron*, **1997**, 16, 24, 4297-4303.
- <sup>36</sup> X. Riera, A. Caubet, C. López, V. Moreno. *Polyhedron*, **1999**, 18, 2549-2555.
- <sup>37</sup> a) B.E. Bowler, L.S. Holis, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 6102. b) R.T. Espejo, J. Lebowitz. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 95.
- <sup>38</sup> a) G.L. Cohen, W.R. Bauer, J.K. Barton, S.J. Lippard. *Science*, **1979**, 203, 1014. b) S. Mong, Y. Daskal, A.W. Prestayko, S.T. Crooke, *Cancer Res.*, **1981**, 41, 4020.
- <sup>39</sup> M.V. Keck, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3386.
- <sup>40</sup> D. Anselmetti, J. Fritz, B. Smith, X. Fernández-Busquets. *Single Molecules*, **2000**, 1, 1, 53-58.
- <sup>41</sup> a). C.F. Liu, M.K. Yoo, *Inorg. Chem.*, **1976**, 15, 10, 2415-2418. b). H. Masuda, A. Odani, T. Yamazaki, T. Yajima, O. Yamauchi. *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 1111-1118. c). L. Lomozik. *Inorg. Chim. Acta*, **1994**, 219, 107-114.
- <sup>42</sup> E. Lindauer, E. Holler, *Biochem. Pharm.*, **1996**, 52, 7-14.
- <sup>43</sup> H. Mese, A. Sasaki, R.E. Alcalde, S. Snakayama, T. Matsumura. *Chemotherapy*, **1998**, 44, 414-420.
- <sup>44</sup> M.S. Newman, G.T. Colbern, P.K. Working, C. Engbers, M.A. Amantea. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1999**, 43, 1-7.

<sup>45</sup> Z. Darzynkiewictz, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota, F. Traganos. *Cytometry*, **1992**, 13, 795-808.

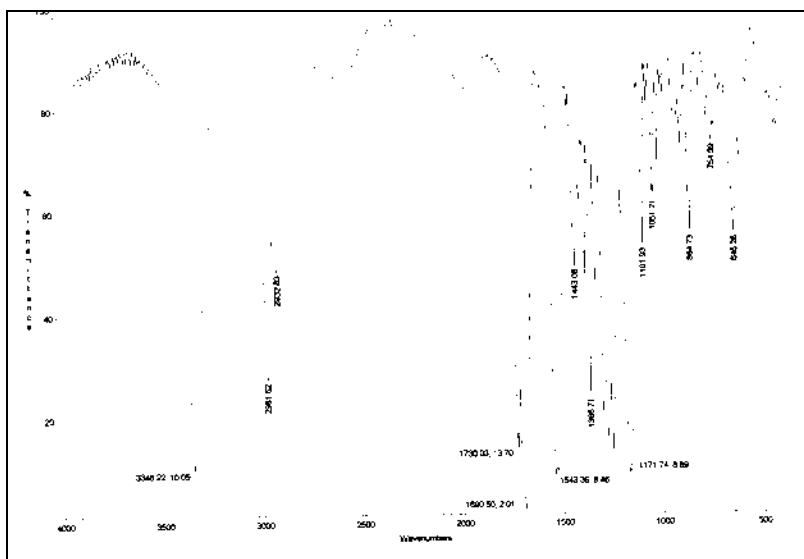
<sup>46</sup> S. Kumar. *TIBS*, **1995**, 20, 198-202.

<sup>47</sup> J.U. Lee, R. Hosotani, M. Wada, R. Doi, T. Kosiba, K. Fujimoto, Y. Miyamoto, C. Mori, N. Nakamura, K. Shiota, M. Imamura. *Anticancer Res.*, **1997**, 17, 3445-3450.

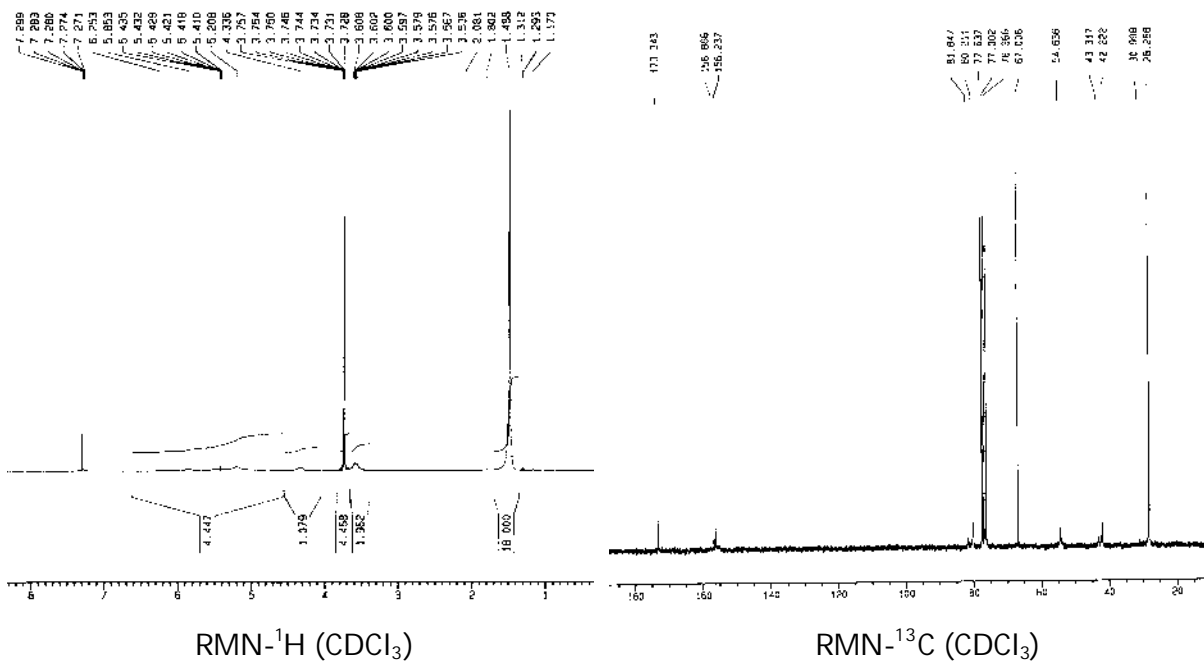
## 7. MATERIAL SUPLEMENTARI.



(BOC)<sub>2</sub>Hdap



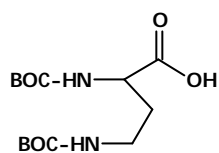
IR



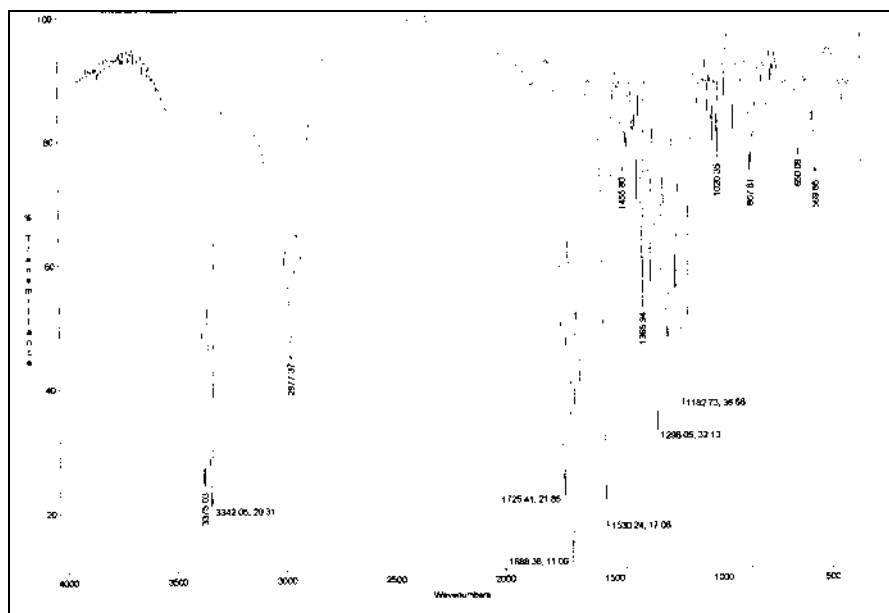
RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)

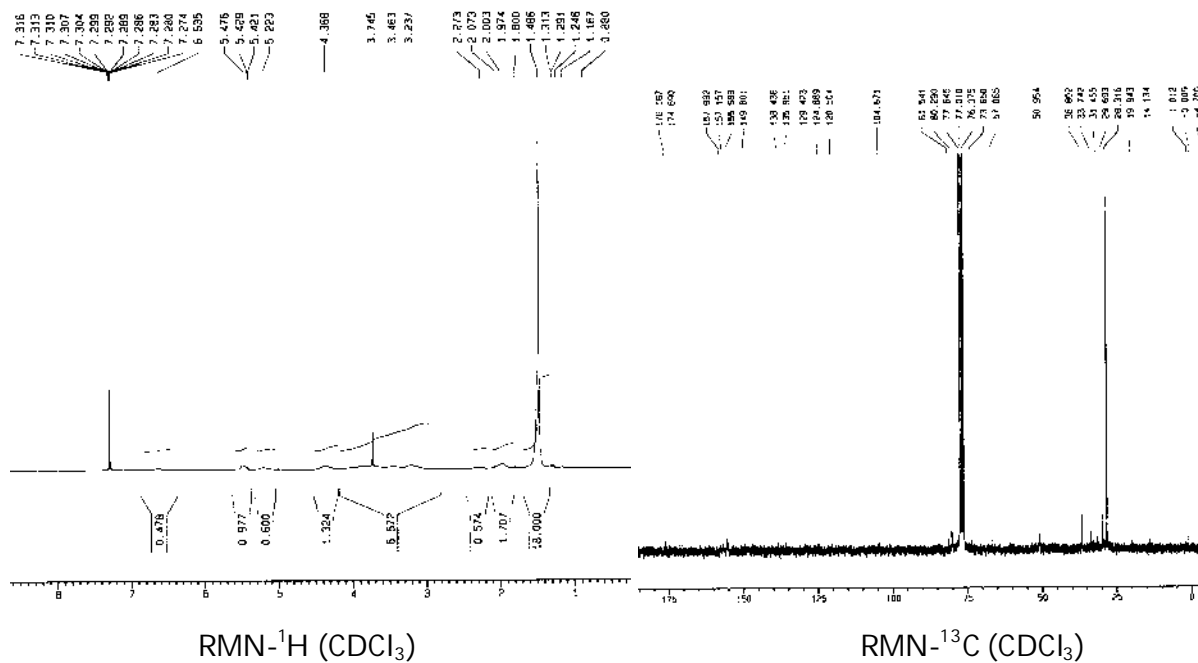




(BOC)<sub>2</sub>Hdab

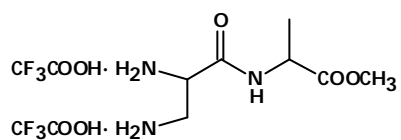


IR

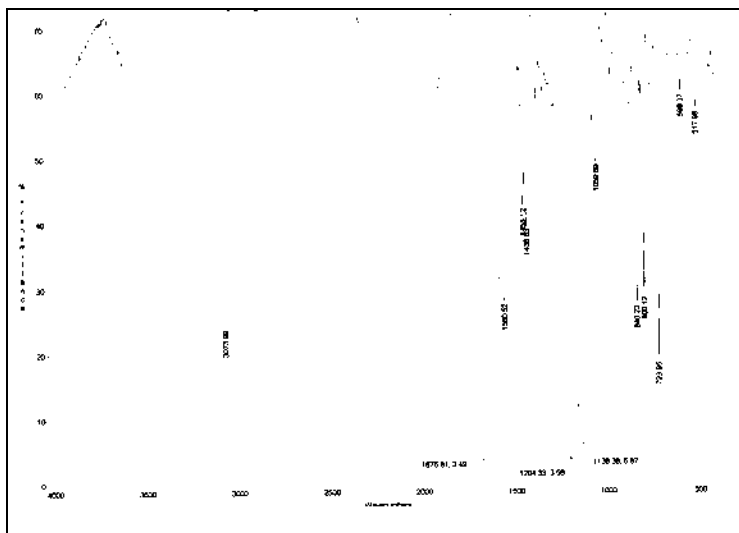


RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)

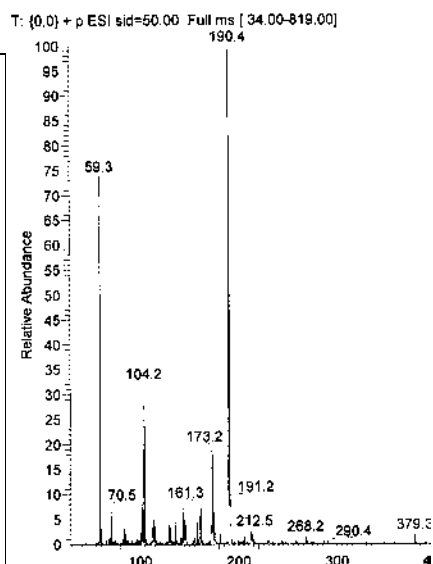
RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)



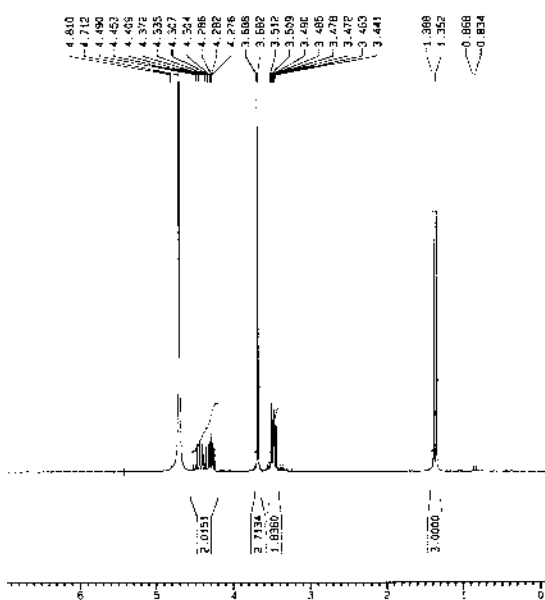
(dap-Metala)-2CF<sub>3</sub>COOH



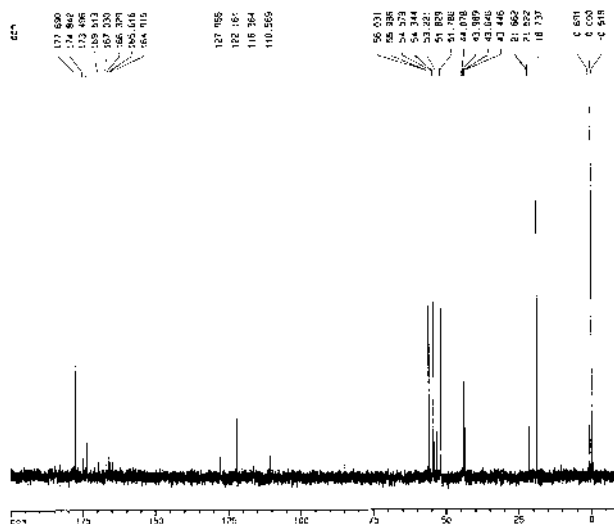
IR



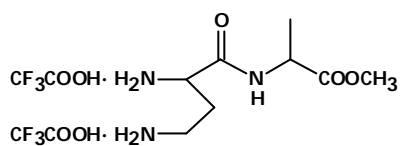
ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH)



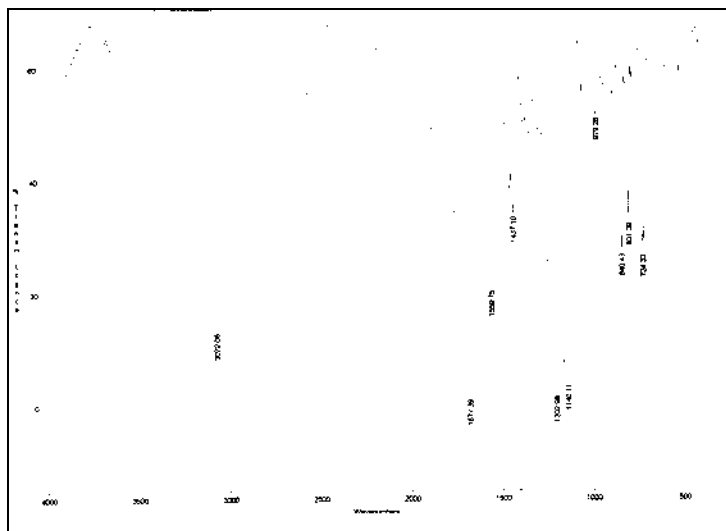
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



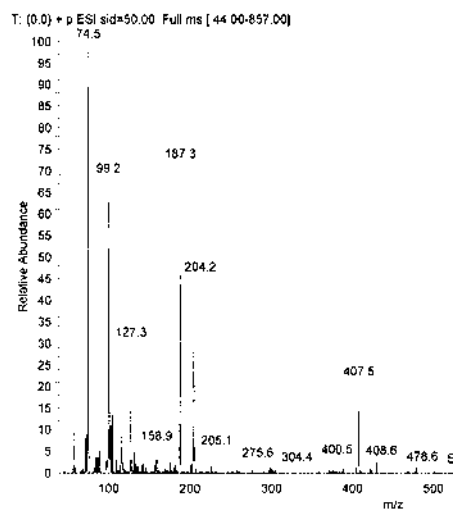
RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)



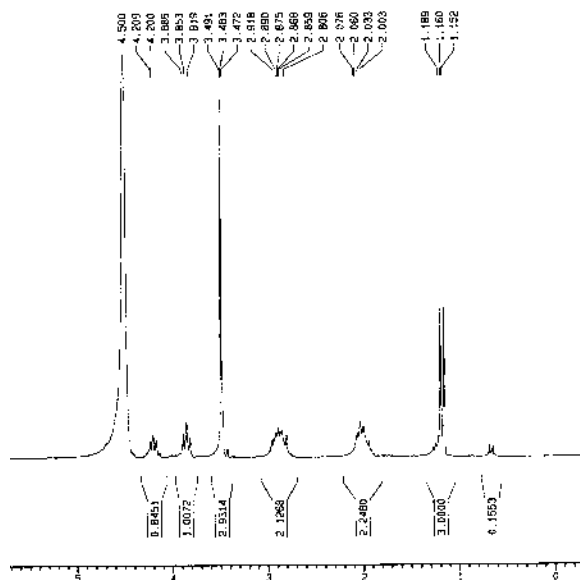
(dab-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH



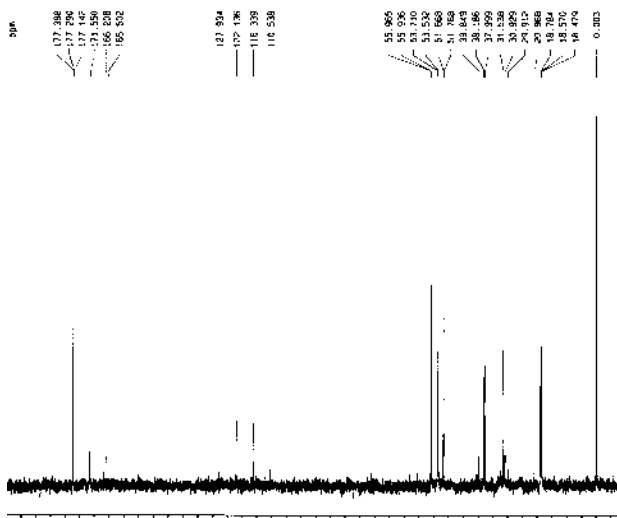
IR



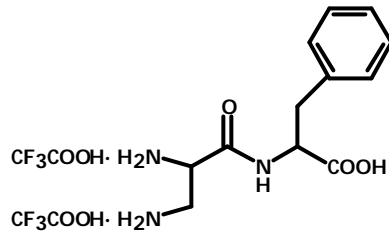
ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH)



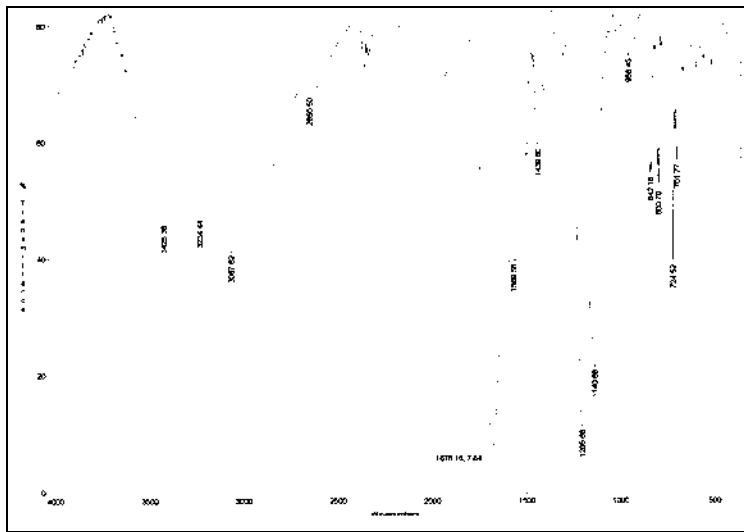
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



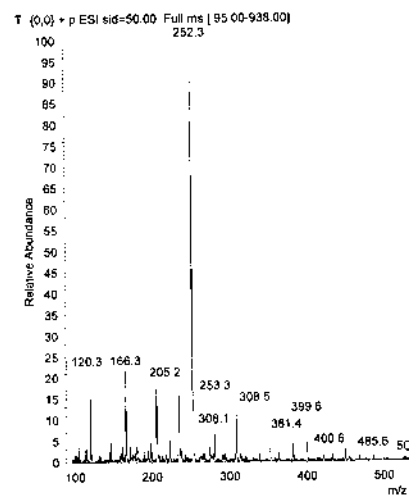
RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)



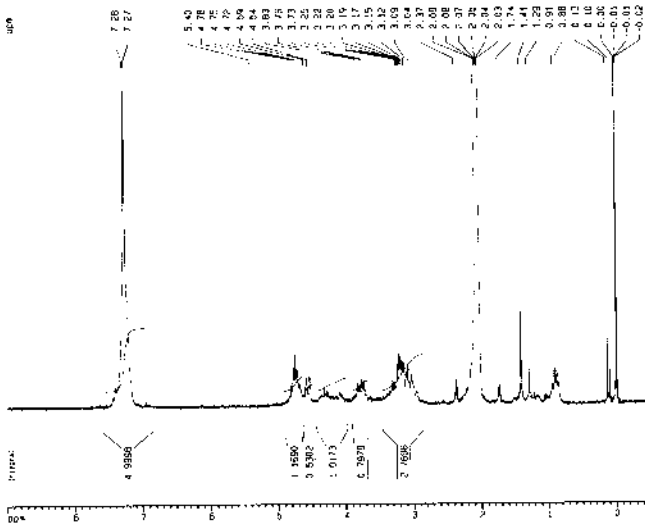
(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH



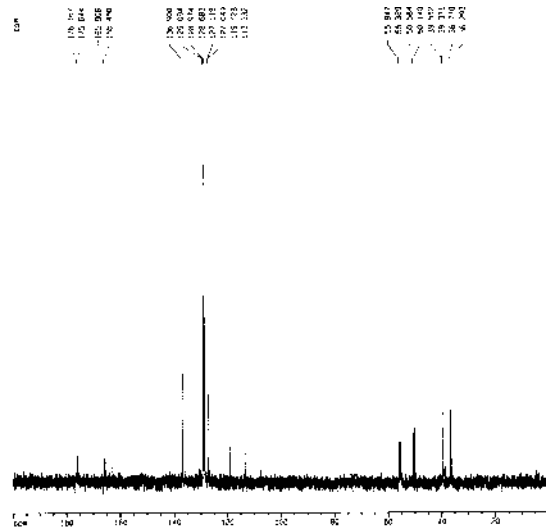
IR



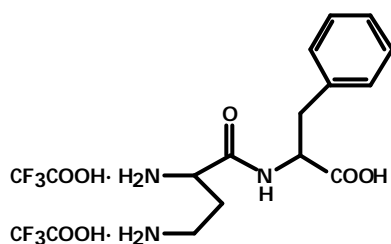
ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH)



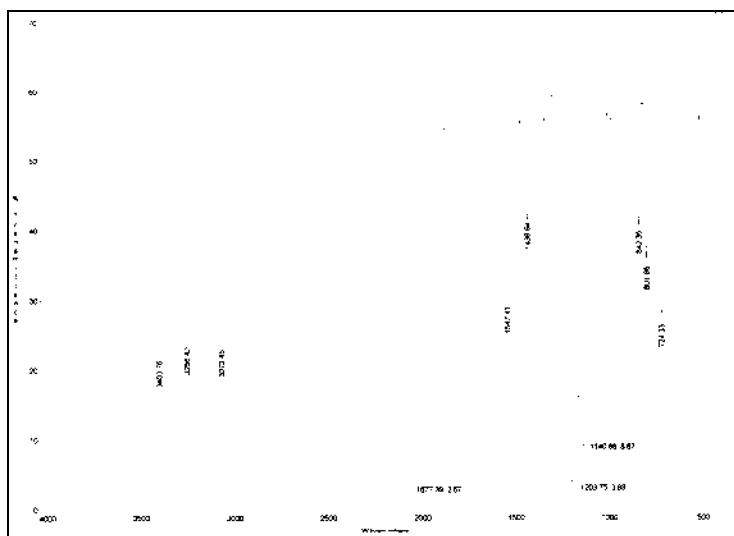
RMN-<sup>1</sup>H (Acetona d<sub>6</sub>)



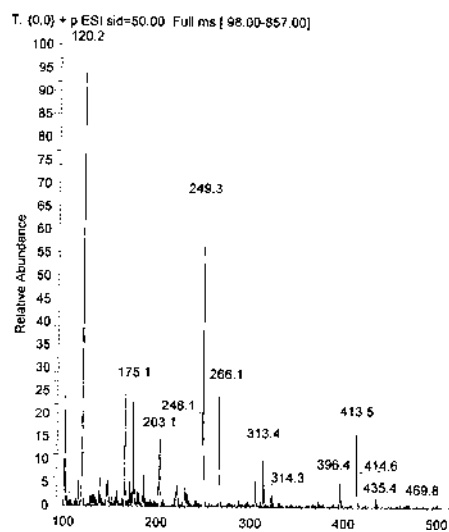
RMN-<sup>13</sup>C (Acetona d<sub>6</sub>)



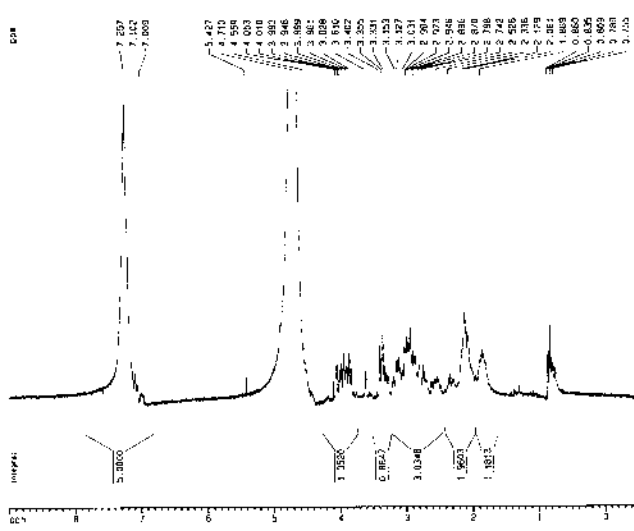
(dab-phe)-2CF<sub>3</sub>COOH



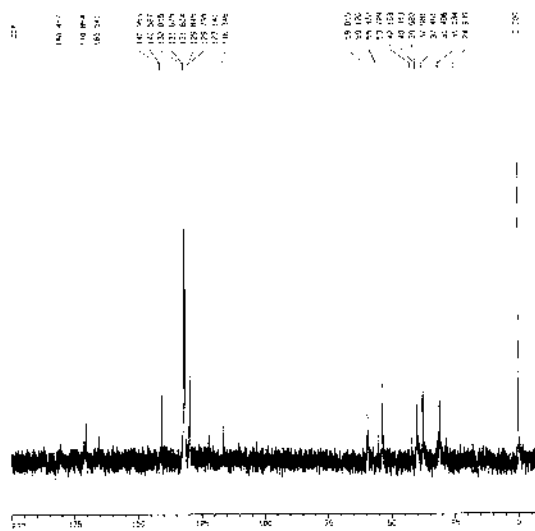
IR



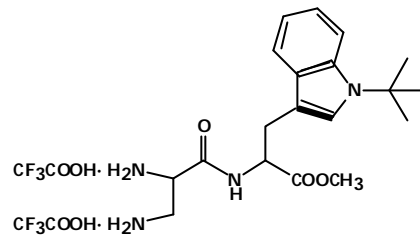
ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH)



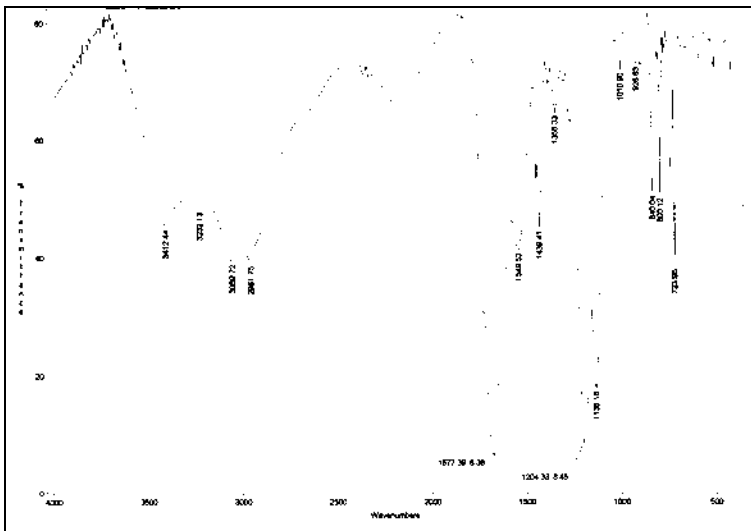
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



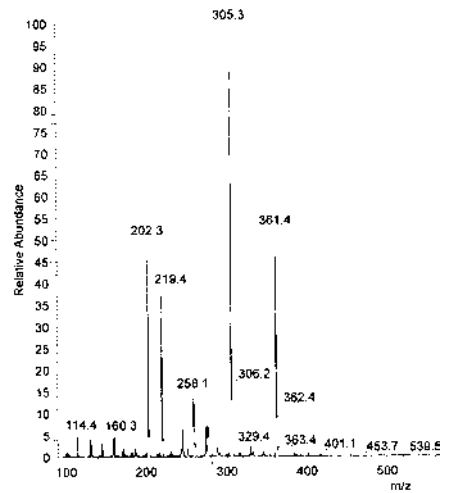
RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)



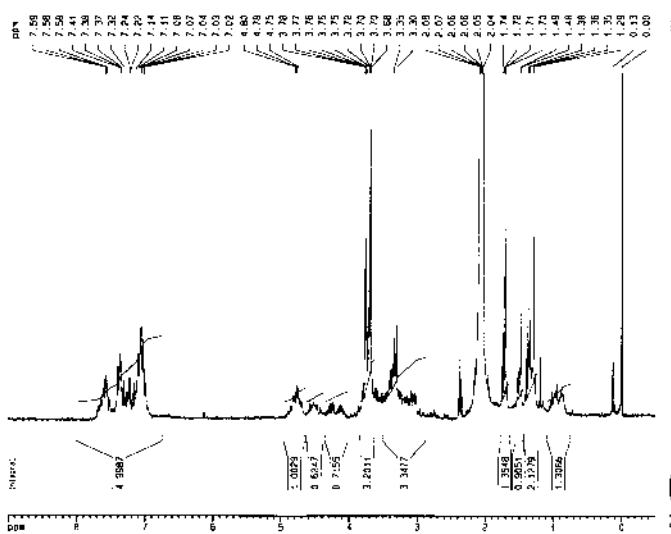
[(dap-Mettrp)-2CF<sub>3</sub>COOH]



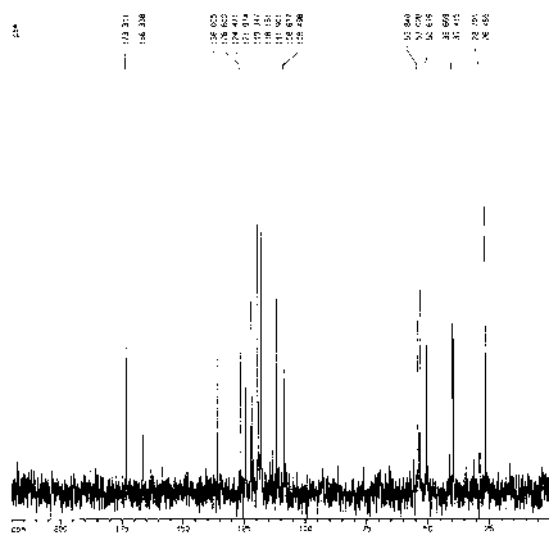
IR



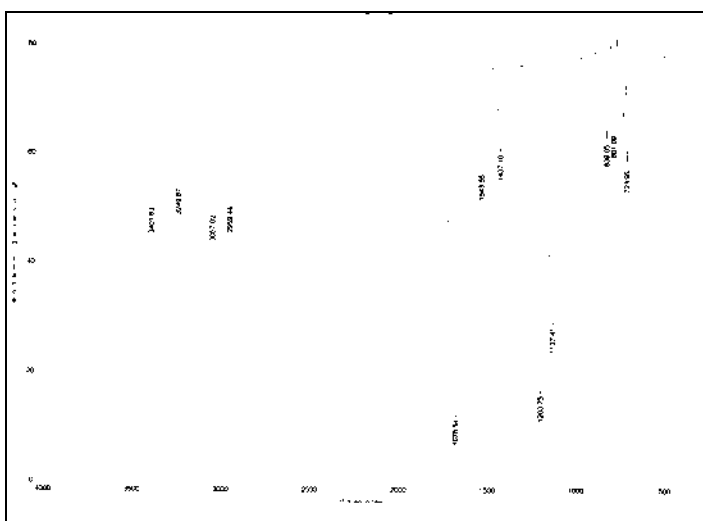
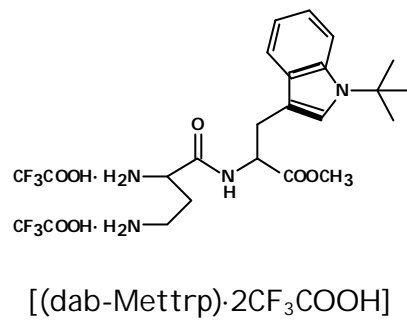
ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O)



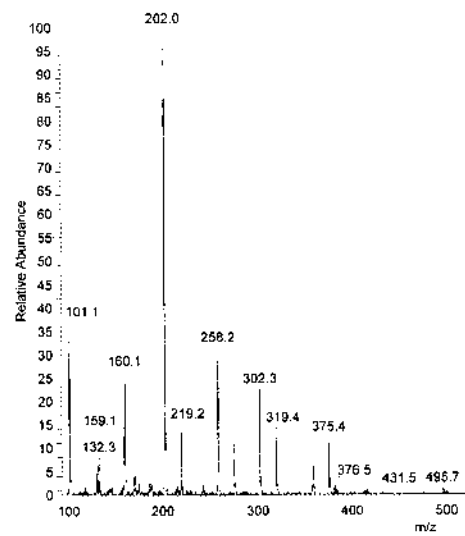
RMN-<sup>1</sup>H (Acetona d<sub>6</sub>)



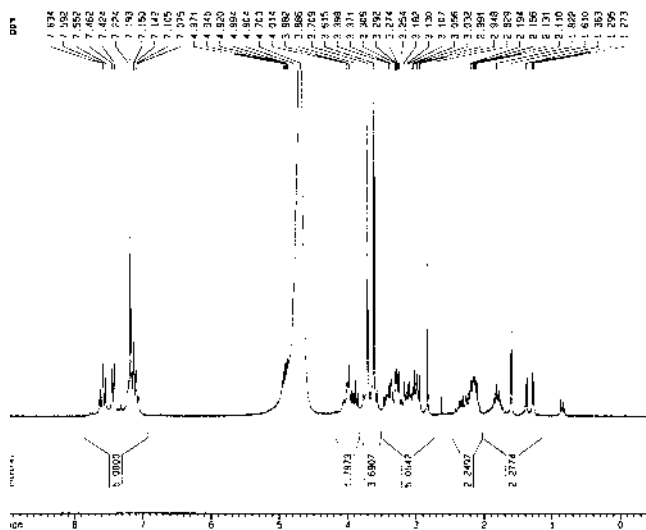
RMN-<sup>13</sup>C (Acetona d<sub>6</sub>)



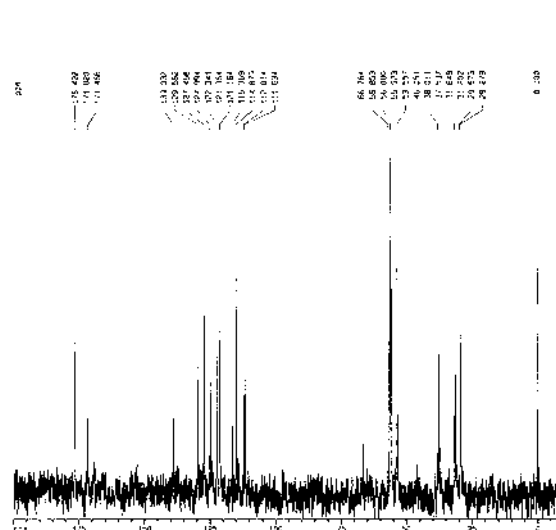
IR



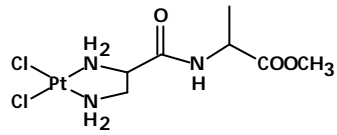
ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O)



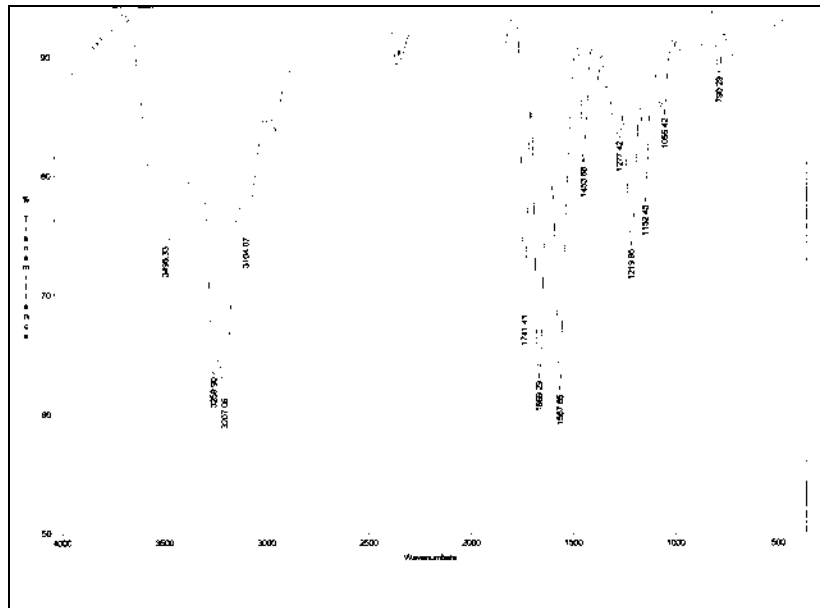
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



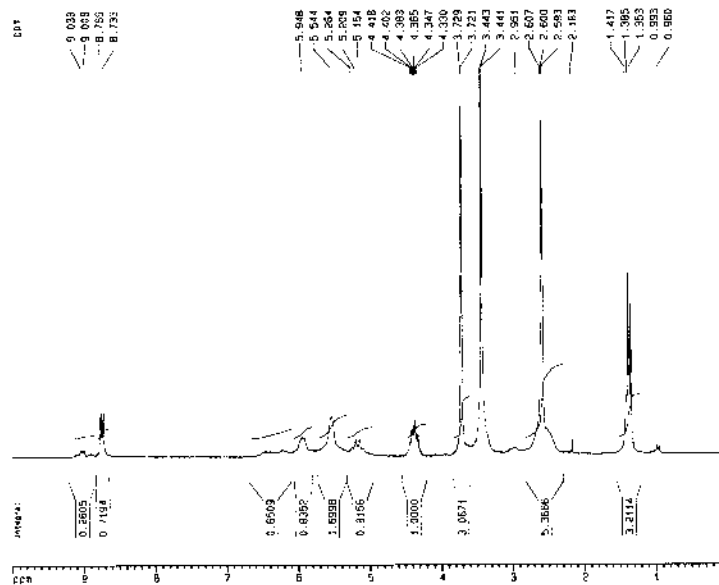
RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)



PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala)

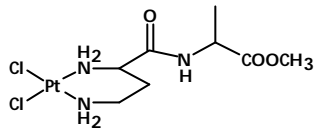


IR

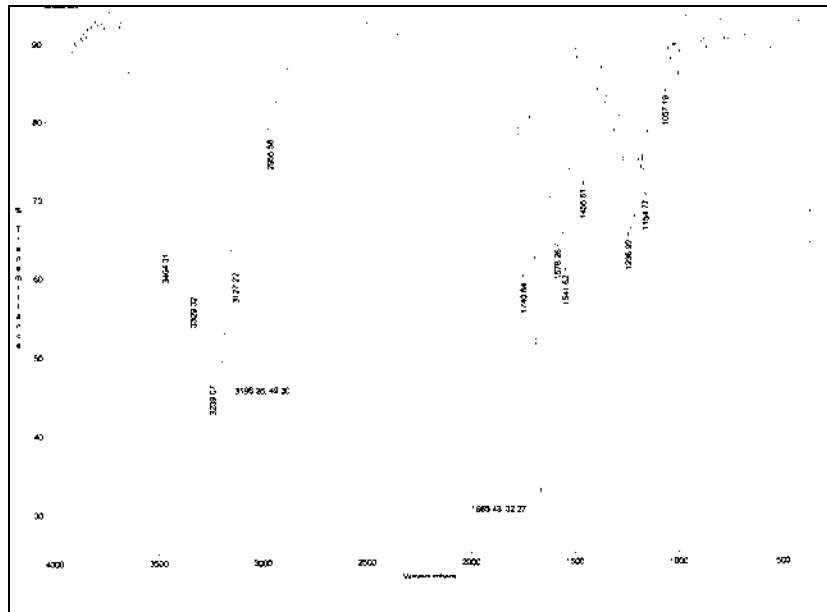


RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)

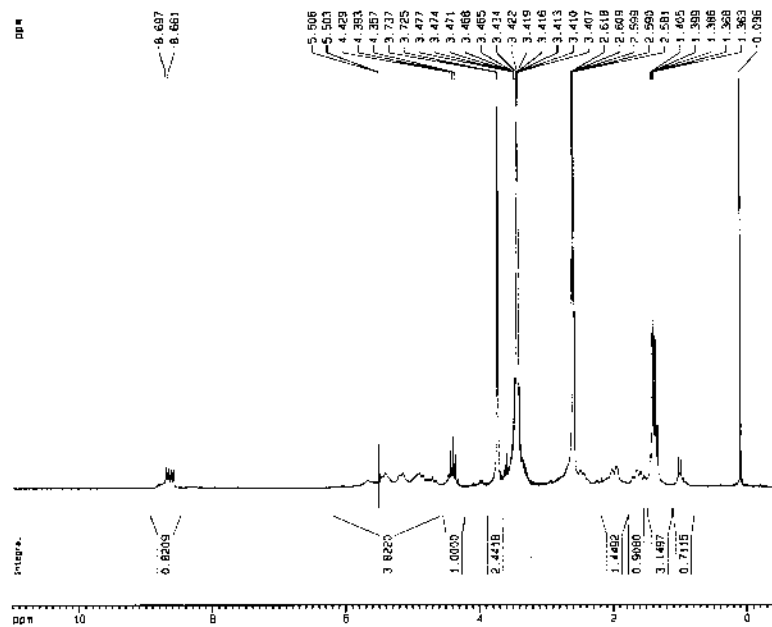




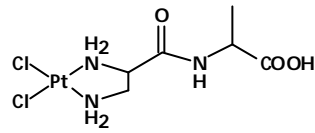
PtCl<sub>2</sub>(dab-Metala)



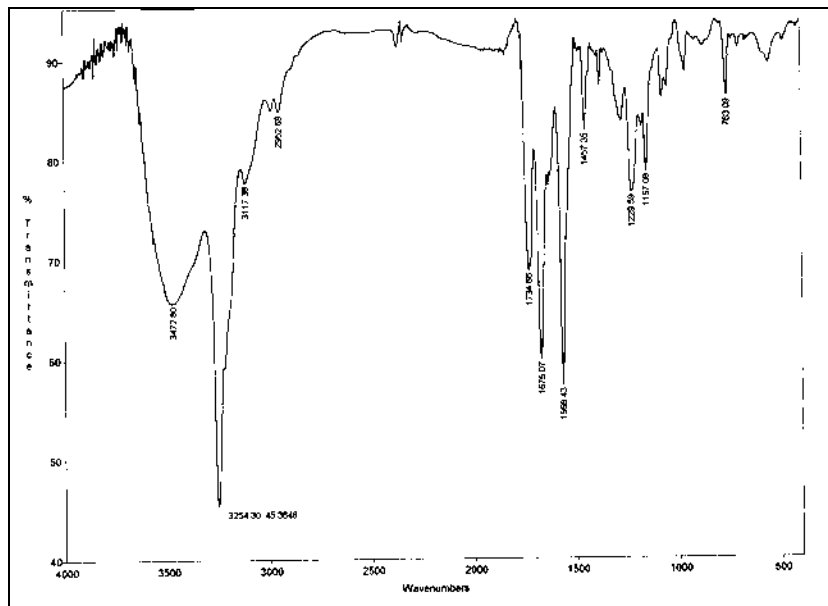
IR



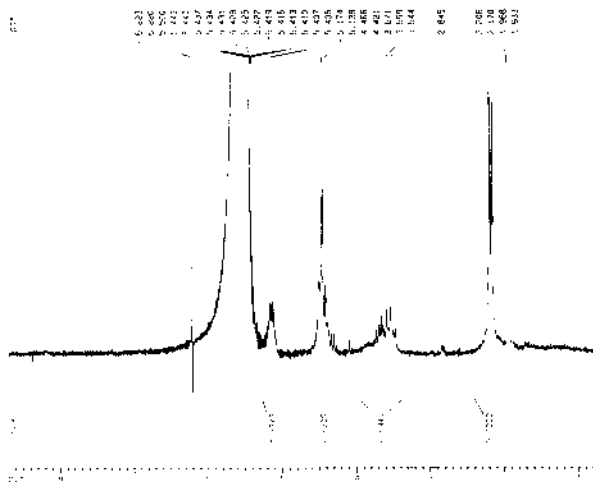
RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)



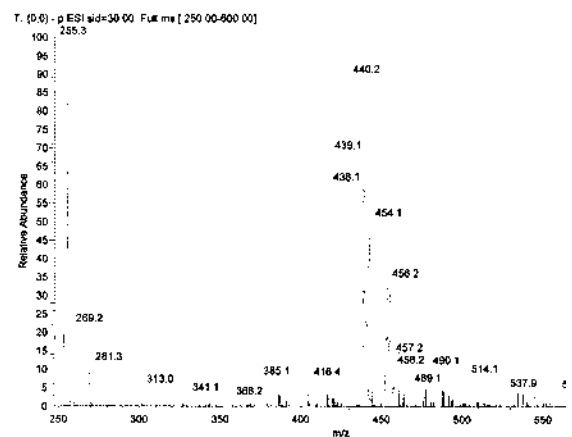
PtCl<sub>2</sub>(dap-ala)



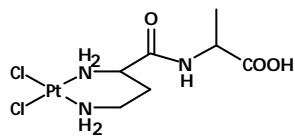
IR



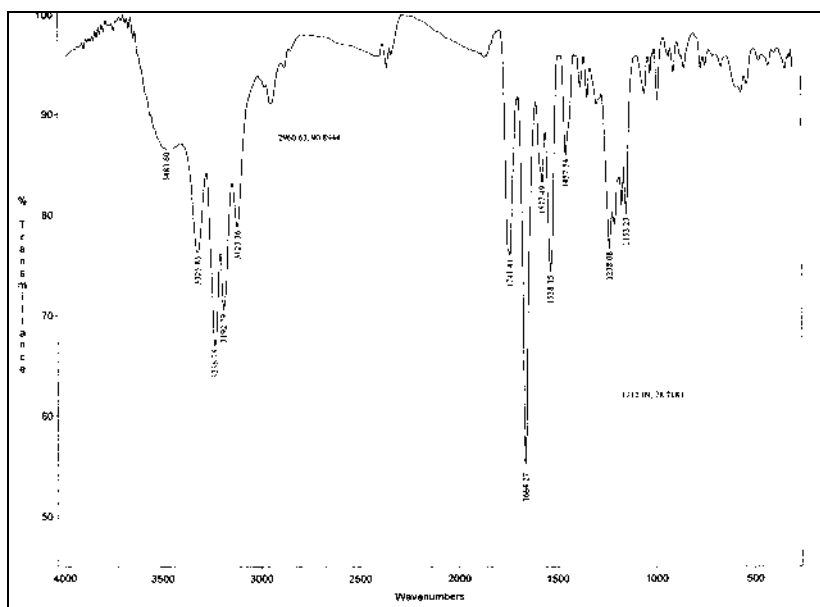
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



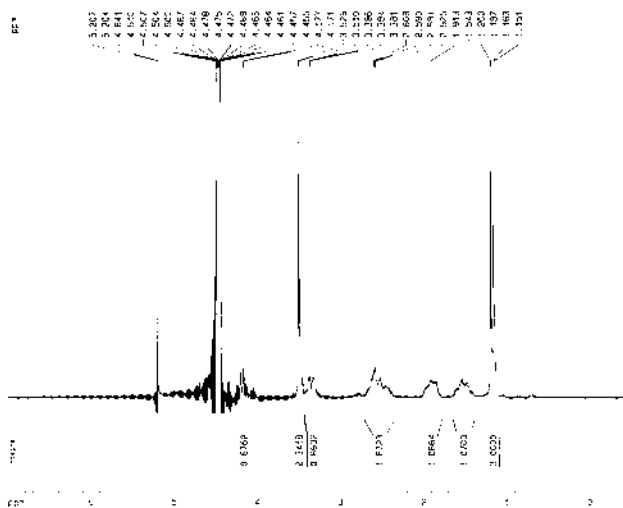
ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH)



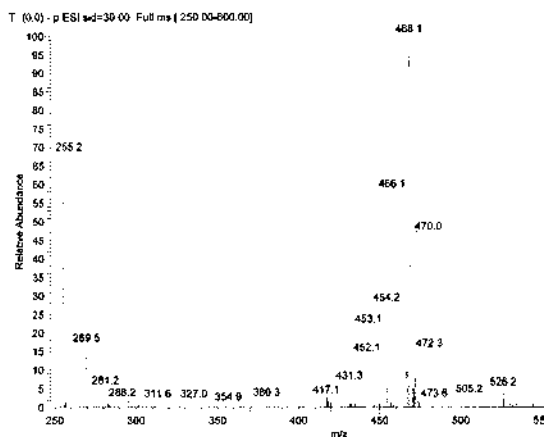
PtCl<sub>2</sub>(dab-ala)



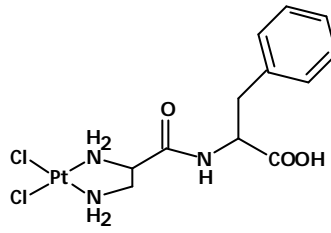
IR



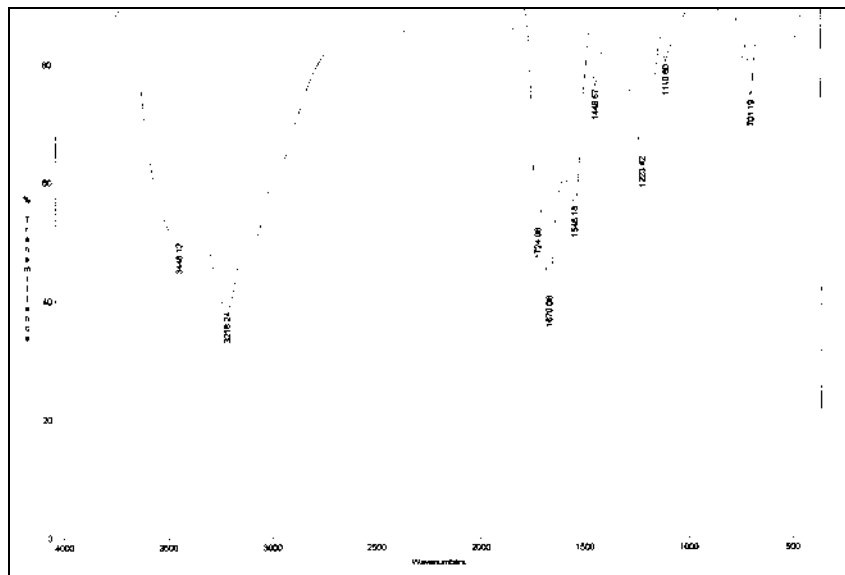
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



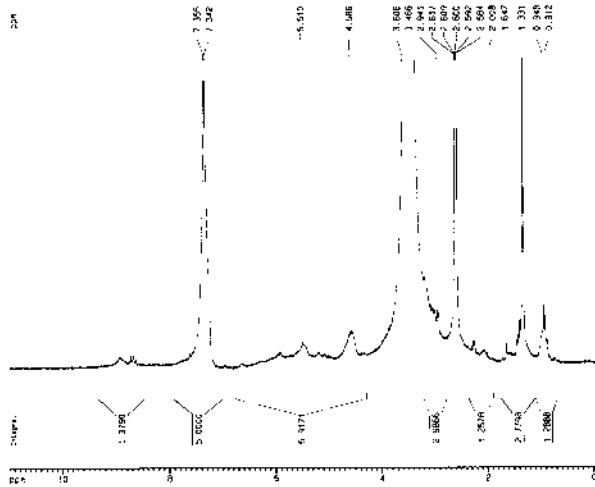
ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH)



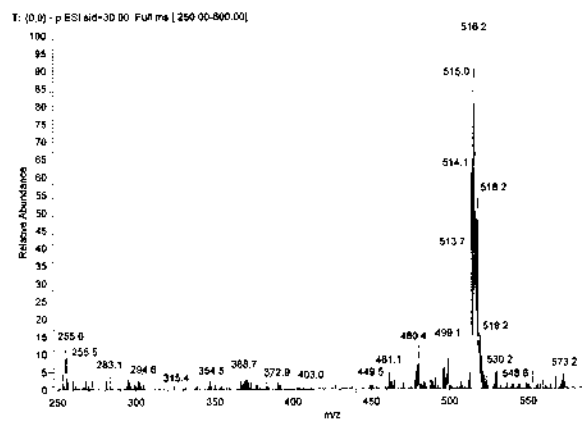
PtCl<sub>2</sub>(dap-phe)



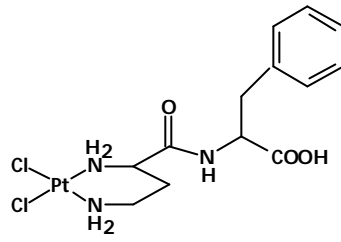
IR



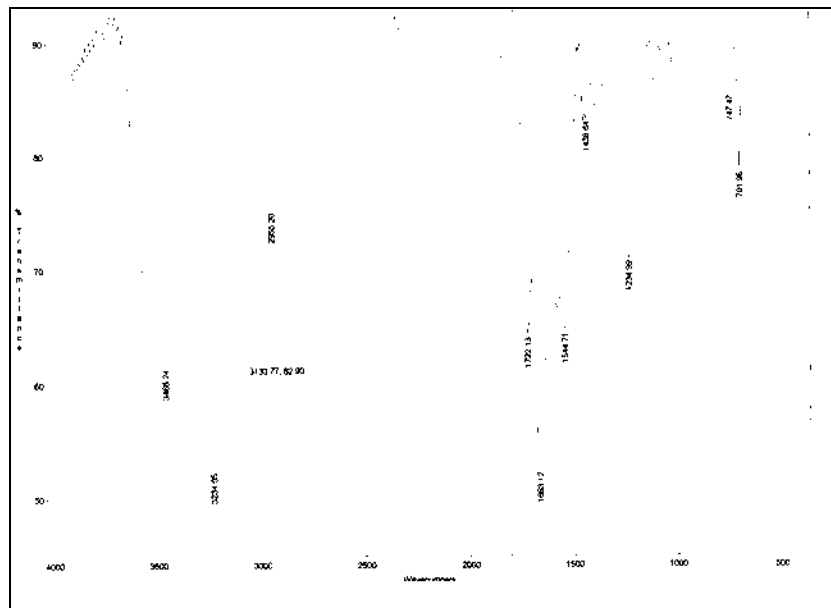
RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)



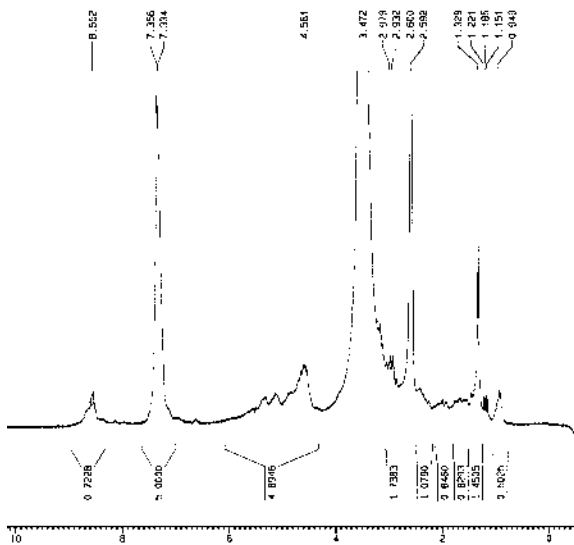
ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH)



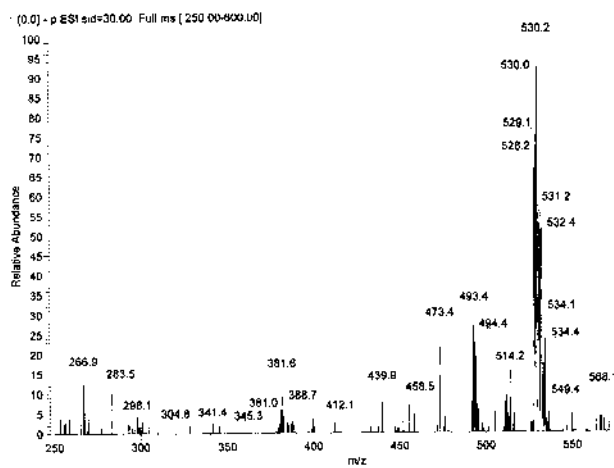
PtCl<sub>2</sub>(dab-phe)



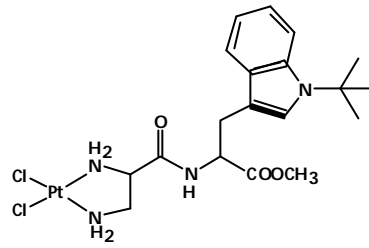
IR



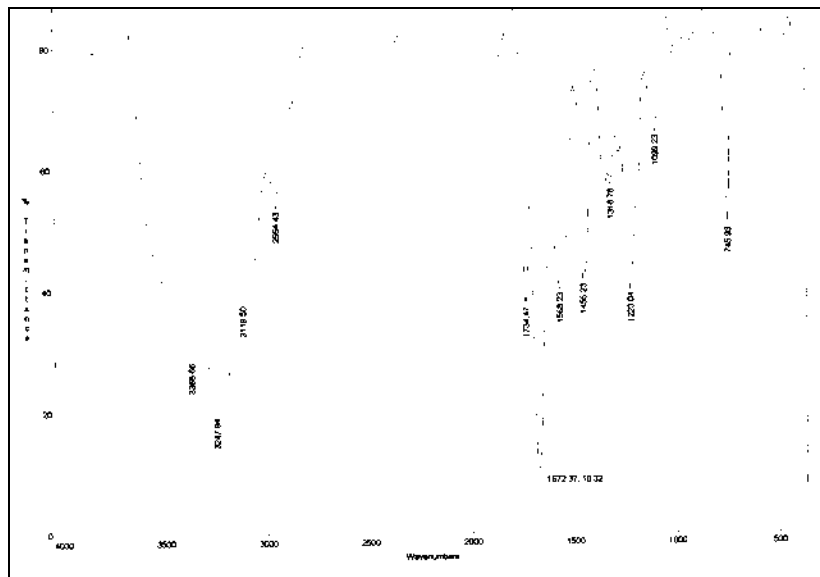
RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)



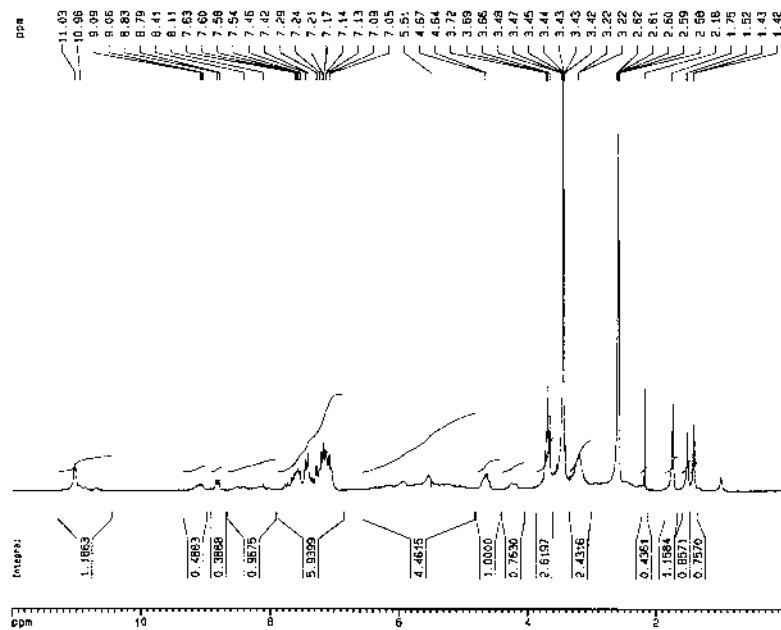
ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH)



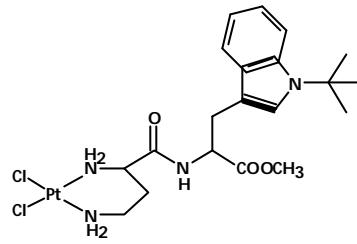
PtCl<sub>2</sub>(dap-Mettrp)



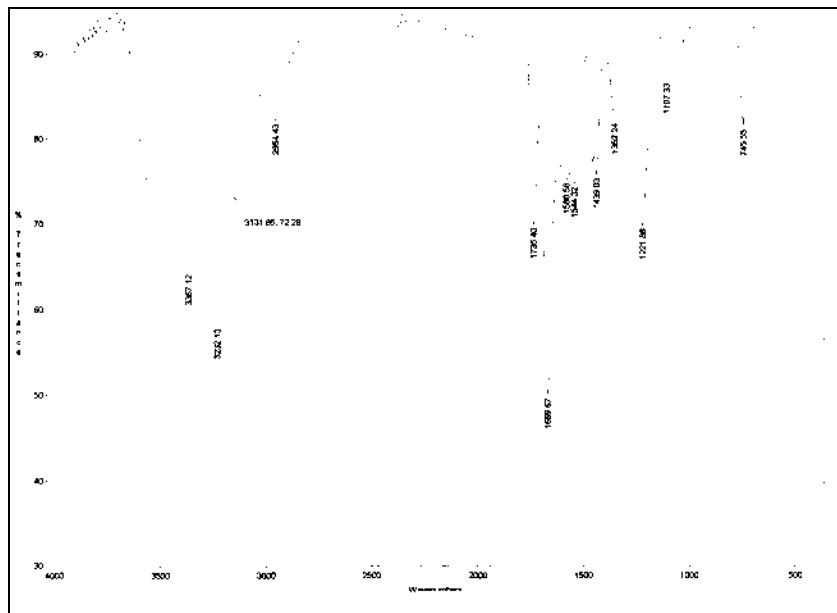
IR



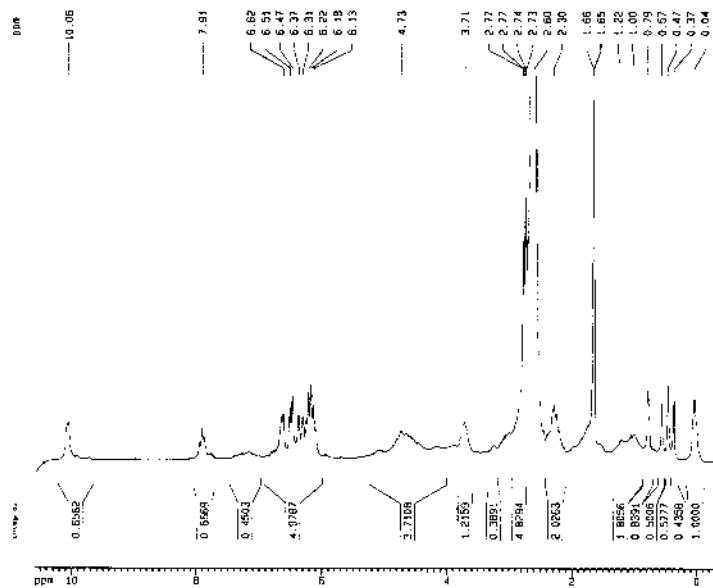
RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)



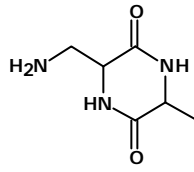
PtCl<sub>2</sub>(dab-Mettrp)



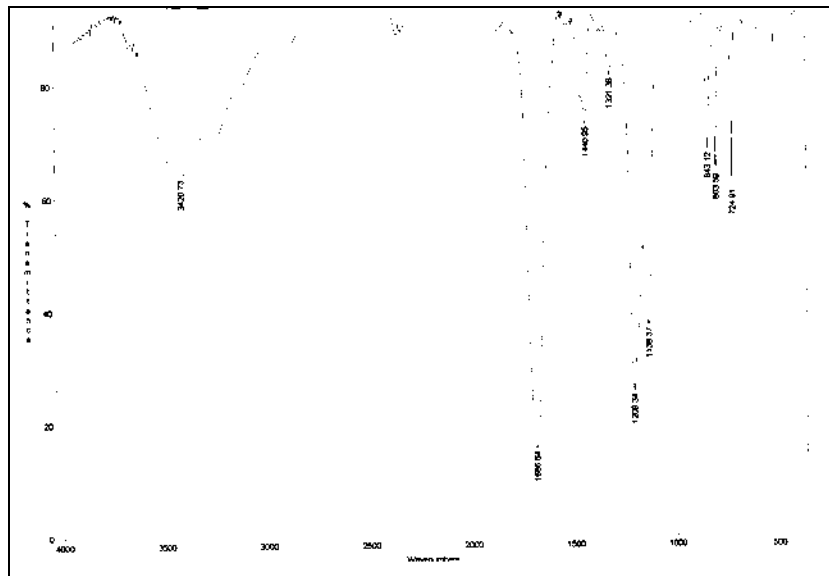
IR



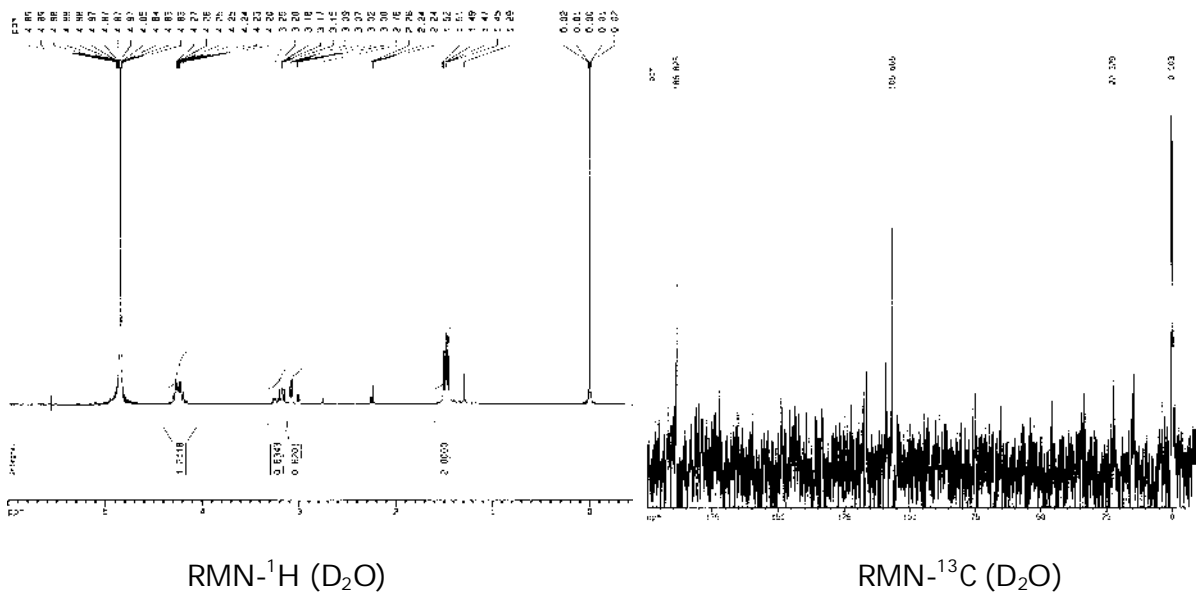
RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)



3-aminometil-6-metil-piperazina-2,5-diona



IR



RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)

RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)

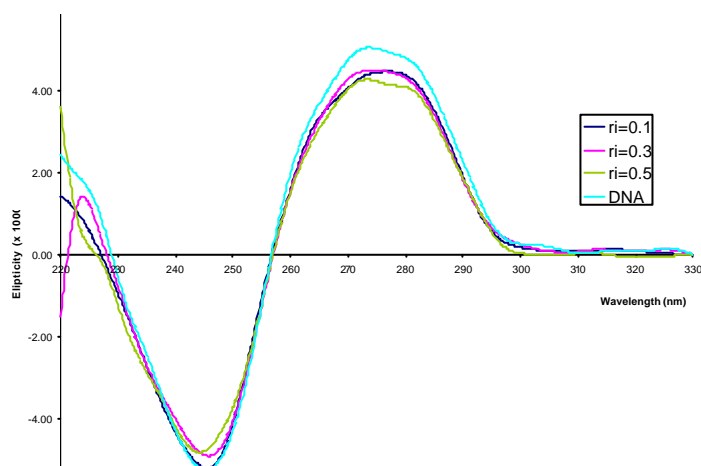




## CAPÍTOL 5

---

### SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DE LLIGANDS DIAMINOQUELATANTS AMB SUBSTITUENTS DE TIPUS PEPTÍDIC I COMPLEXACIÓ AMB Pt (II). ESTUDI DE LA INTERACCIÓ AMB EL DNA I DE L'ACTIVITAT ANTITUMORAL.



**Síntesi i caracterització de lligands diaminoquelatants amb substituents de tipus peptídic i complexació amb Pt (II). Estudi de la interacció amb el DNA i de l'activitat antitumoral.**

Í NDEX.

1. RESUM	241
2. INTRODUCCIÓ	241
3. EXPERIMENTAL	244
3.1. Material i instrumentació	244
3.2. Síntesi dels lligands i complexos	245
3.3. Assaigs biològics	249
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	250
4.1. Síntesi i caracterització química dels lligands i complexos	250
4.2. Assaigs biològics	264
4.2.1. Estudi de la interacció Pt-DNA per dicromisme circular	264
4.2.2. Assaigs de proliferació cel·lular	266
5. CONCLUSIONS	268
6. REFERÈNCIES	271
7. MATERIAL SUPLEMENTARI	273



## 1. RESUM.

En aquest capítol es descriu la síntesi i caracterització química de tres nous lligands diaminoquelatants derivats de l'àcid 2,3-diaminopropiònic (Hdap) contenint substituents peptídics amb diferent nombre d'aminoàcids, [(dap-TNYT-OCH<sub>3</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-TTNYT-OCH<sub>3</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH]. S'ha realitzat la síntesi del complex de Pt(II) d'aquest darrer lligand, el qual ha demostrat ser bastant insoluble en aigua i en dissolvents orgànics, exceptuant el DMSO i DMF. Amb l'objectiu de determinar si el complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>) pot interaccionar amb el DNA i modificar la seva estructura secundària s'ha portat a terme l'estudi de dicroisme circular, i s'ha comparat amb l'espectre del respectiu lligand. S'ha pogut demostrar que tot i que el lligand provoca una lleugera modificació en l'el·lipticitat de l'espectre del DNA, aquesta no és comparable amb els canvis que provoca el respectiu complex. En aquest cas, s'observa un desplaçament batocròmic de la longitud d'ona i una variació de l'el·lipticitat, essent el seu comportament lleugerament diferent al del cisplatí. L'activitat citotòxica del complex s'ha mesurat a través d'estudis de proliferació cel·lular en la línia HeLa utilitzant un percentatge de DMSO del 2% per millorar la solubilització, i s'ha comparat amb l'activitat del corresponent pèptid lliure sota les mateixes condicions. Els resultats obtinguts demostren que tant el complex com el pèptid lliure provoquen una disminució de la supervivència cel·lular, essent l'efecte del complex més important que el del pèptid lliure.

En aquest capítol, doncs, es tracta la síntesi i estudi d'un complex de Pt(II) actiu que conté un lligand també biològicament actiu.

## 2. INTRODUCCIÓ.

En general, la interacció de les sals de platí amb aminoàcids, pèptids i llurs derivats dóna lloc a la formació d'una gran varietat de compostos amb el lligand coordinat d'una forma simple o fent de pont entre diferents ions metàl·lics formant-se compostos oligonuclears.<sup>1,2</sup>

Actualment la recerca de noves drogues antitumorals de platí es centra en complexos que interaccionen amb el DNA de forma diferent al cisplatí i així solventar els problemes de resistència.<sup>3</sup> Molts complexos de Pt(II) formats per aminoàcids, pèptids i poliamides han estat preparats i estudiats com a possibles models per estudiar la interacció general in vivo de proteïnes amb un metall, i per ser utilitzats com a elements d'interacció específica amb el DNA. Malgrat tot, pocs compostos amb aquestes característiques han tingut realment èxit.<sup>4</sup>

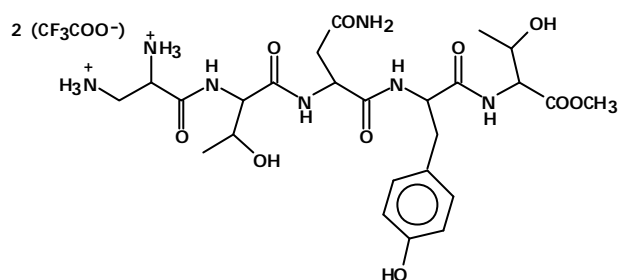
Recentment, s'ha demostrat que la reacció de  $K_2PtCl_4$  amb pèptids implica la coordinació a través dels grups amina o imina,<sup>5</sup> i contràriament al que s'havia descrit en estudis anteriors, no s'observa cap interacció entre els grups carboxilat o carbonil dels pèptids amb l'ió metàl·lic. Aquest fenomen, però, és degut al fet que aquestes interaccions s'observen utilitzant temps de reacció curts (de 1 a 24 hores), mentre que amb temps de reacció més alts es formen els productes que són termodinàmicament més estables.<sup>6</sup>

En l'actualitat, els pèptids han esdevingut interessants com a potencials agents terapèutics per la capacitat que poden tenir d'unir-se a enzims específics o sistemes enzimàtics.<sup>7</sup> Un dels principals objectius de la recerca amb pèptids i proteïnes és el disseny racional de lligands peptídics, les propietats dels quals, tant químiques, com físiques o biològiques, es puguin predir.<sup>4</sup> Molts d'aquests estudis comencen per simples modificacions del lligand natiu. Amb els diferents resultats obtinguts resulta impossible poder establir un conjunt de normes generals que es puguin aplicar en els estudis de la relació estructura-activitat.<sup>8,9</sup>

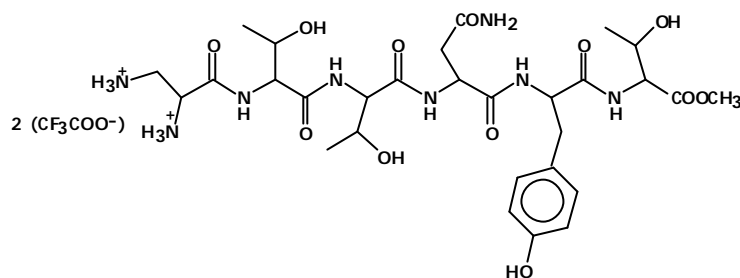
La investigació de les reaccions del cisplatí amb aminoàcids i derivats ha donat lloc a la preparació de compostos amb propietats antitumorals millors que les d'aquesta droga.<sup>10</sup> Aquest fet es basa en la idea que els aminoàcids poden transportar espècies de platí a través de la membrana cel·lular.<sup>11</sup>

Tenint en compte aquests antecedents, s'ha realitzat la síntesi de nous lligands diaminoquelatants contenint substituents peptídics i s'ha sintetitzat el complex de Pt(II) d'un d'aquests lligands,  $PtCl_2(dap-ASTTTNYT-NH_2)$ , (Figura 1). S'ha realitzat l'estudi de dicroisme circular del complex de Pt(II) incubat amb DNA-Calf Thymus,

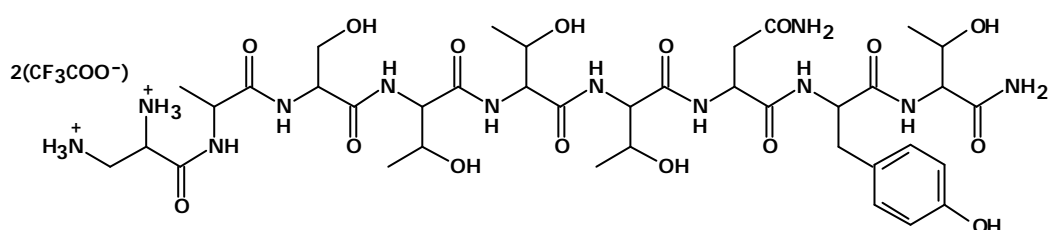
observant-se una modificació de l'estructura secundària del DNA, i s'ha comparat amb el respectiu lligand lliure i el cisplatí. L'activitat citotòxica ha estat analitzada per estudis de proliferació cel·lular en la línia cel·lular HeLa.



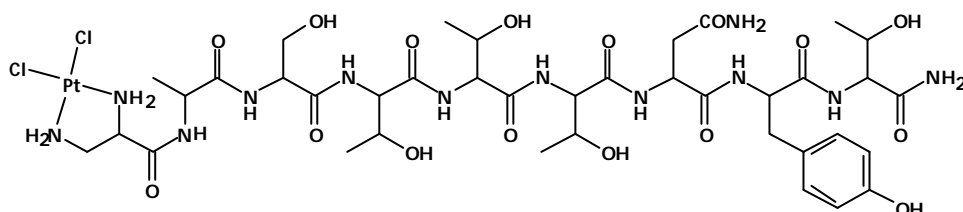
[(dap-TNYT-OCH<sub>3</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH]



[(dap-TTNYT-OCH<sub>3</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH]



[(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH]



PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)

Figura 1. Estructura dels compostos estudiats en aquest capítol.

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIAL I INSTRUMENTACIÓ

##### 3.1.1. Material

Els reactius comercials han estat emprats sense purificació prèvia: àcid d,l-2,3-diaminopropiònic monohidroclorat 98% (Aldrich), di-terc-butil dicarbonat 97% (Aldrich), N-metilmorfolina 98% (Aldrich), cloroformiat d'isobutil 97% (aldrich), àcid cítric (Panreac), bicarbonat sòdic (Panreac), sulfat magnèsic anhidre (Panreac), àcid trifluoroacètic 99% (Aldrich), H-TNYT-OH (Servei de síntesi de pèptids de la UB), H-TTNYT-OH (Servei de síntesi de pèptids de la UB), H-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub> (Servei de síntesi de pèptids de la UB), clorur de tionil (Aldrich), DNA-Calf Thymus (Sigma).

El tetraclorplatínat de potassi (K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>) ha estat proporcionat per gentilesa de Johnson Matthey.

Els dissolvents de qualitat PS han estat obtinguts de Panreac i SDS.

El tampó TE (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH=7.4) i el DNA-Calf Thymus (Sigma) necessaris per a la preparació de les mostres de dicroisme circular han estat proporcionats per la Universitat de Barcelona.

Les dissolucions i medis pels assaigs de proliferació cel·lular i detecció d'apoptosi han estat proporcionats per l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat autònoma de Barcelona: Solució del 0.4 % de blau de tripan (Gibco BRL, USA), DMSO (Sigma), PBS (Gibco BRL, USA), suero fetal boví FBS (Gibco BRL, USA), solució antibiòtic-antimicòtic 100x (Gibco BRL, USA), piruvat 100 mM (Sebak, Alemanya), DMEM líquid amb GLUTAMAX (Gibco BRL, USA), IMDM líquid amb GLUTAMAX (Gibco BRL; USA), tripsina-EDTA solució (Gibco BRL, USA), kit EZ4U (Biomédica, Alemanya), kit Roche Annexin-V-Fluos Staining, tampó de lisis (10 mM Tris-HCl, pH=8.0, 100 mM EDTA pH= 8.0, 20 mg/mL RNAsa A), proteinassa K 10 mg/mL, NaCl 5M, gel d'agarosa al 1.5 %, 50x TAE, tampó d'aplicació de mostres 4x (45 mL formamida, 5 mL EDTA 0.1 M, 0.15 g blau de bromofenol, 0.15 g xilencianol, H<sub>2</sub>O fins a 100 mL), bromur d'etidi (Amresco, USA).

Medi complet amb FBS: medi + antibiòtic + 10% FBS.



Medi de congelació: 90% FBS + 10% DMSO.

### 3.1.2. Instrumentació

Els espectres IR han estat enregistrats en estat sòlid (pastilla de KBr) en un espectròmetre FT-IR Mattson Satellite en el rang de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Els espectres de RMN- $^1\text{H}$  i RMN- $^{13}\text{C}$  han estat enregistrats en un espectròmetre Bruker DPX 200 utilitzant  $\text{D}_2\text{O}$  i  $\text{DMSO-d}_6$  com a dissolvents. Els anàlisis elementals s'han portat a terme en un microanalitzador Carlo Erba 1108. Els espectres ESI-MS s'han realitzat en un espectròmetre Navigator Thermo Quest Finigan utilitzant  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  com a fase mòbil.

Els espectres de dicroisme circular s'han obtingut en un espectropolarímetre J-600 (Jasco Europe) utilitzant una cel·la de quars rectangular de 1 cm. Els resultats han estat analitzats utilitzant el programari Jasco.

En els assaigs de proliferació cel·lular in vitro, les mesures d'absorbància de les plaques de pouets s'han pres amb un lector Labsystems iEMS Reader MF a 495 nm i amb un filtre de referència de 620 nm. Com a indicador cromòfor s'ha utilitzat el Kit EZ4U basat en sals de tetrazol.

## 3.2. SÍNTESI DELS LLIGANDS I COMPLEXOS.

### 3.2.1. [(dap-TNYT-OCH<sub>3</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH]

S'addicionen lentament 58  $\mu\text{L}$  de clorur de tionil (10 eq.) sobre 240  $\mu\text{L}$  de MeOH absolut (3 mL/mmol) refredat en un bany de gel a 0°C. S'introdueix el pèptid H-TNYT-OH (0.040 gr, 0.08 mmols) tot de cop i es deixa en agitació durant tota una nit a temperatura ambient. Si passat aquest temps la reacció no s'ha completat, es torna a addicionar una mescla  $\text{MeOH}/\text{SOCl}_2$  preparada de la mateixa manera que inicialment. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es redissol el residu en aigua destil·lada. Es renta la dissolució aquosa amb cloroform i éter dietílic, i s'elimina l'aigua a pressió reduïda, obtenint un sòlid blanc que es conserva sec i sota atmosfera de nitrogen.

La reacció es segueix per cromatografia de capa prima utilitzant com a fase mòbil una barreja de ButOH/AcOH/H<sub>2</sub>O (4:1:1) i com a revelador una solució de ninhidrina al 2% en etanol.

El producte que s'obté s'utilitza en el següent pas sense cap altra purificació.

**Rendiment:** 0.024 gr (0.044 mmols), 54,54 %. **IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3500-2800 b.a. (st. OH, st. NH, st. CH alif., st. CH arom.), 1745 (st. C=O éster), 1671 (st. C=O amida), 1515 ( $\delta$  NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 1152 (st. as. CO éster), 1109 (st. si. CO éster). **RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$ (ppm) = 1.05 (dd, 6H, C-CH<sub>3</sub>, J<sub>1</sub> = 16 Hz, J<sub>2</sub> = 21 Hz), 2.45-3.08 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.46-3.83 (m, 9H, O-CH<sub>3</sub>, CH), 6.56 (m, 2H, CH fenol), 6.85 (m, 2H, CH fenol). **RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O+MeOD (ref.), 300K):**  $\delta$  (ppm) = 19.41 (C-CH<sub>3</sub>), 19.67 (C-CH<sub>3</sub>), 36.39 (CH<sub>2</sub>), 53.54 (O-CH<sub>3</sub>), 55.14 (CH), 57.20 (CH), 59.38 (CH), 67.17 (HO-CH), 70.2 (HO-CH), 116.42 (C<sub>arom.</sub>), 128.45 (C<sub>arom.</sub>), 131.43 (C<sub>arom.</sub>), 155.47 (C<sub>arom.</sub>), 168.79 (N-C=O), 170.10 (N-C=O), 172.05 (N-C=O), 173.20 (N-C=O), 176.60 (COOMe). **ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH):** [M]<sup>+</sup> = 511 m/z

Es dissolen 0.014 gr de (BOC)<sub>2</sub>Hdap (0.045 mmols) en 2 mL de THF anhidre i sota atmosfera de nitrogen, i la dissolució resultant es refreda a -15 °C en un bany de gel/NaCl. A la mescla s'addiciona N-metilmorfolina (5.4 µL, 0.049 mmols) i cloroformat d'isobutil (5.8 µL, 0.045 mmols) i es deixa en agitació durant 5 minuts. Un cop transcorreguts, s'afageix una dissolució aquosa de ClH·H-TNYT-OCH<sub>3</sub> (0.020 gr, 0.036 mmols) prèviament neutralitzada amb una solució de NaHCO<sub>3</sub> (0.003 gr, 0.036 mmols). La barreja resultant es deixa en agitació en un bany de gel a 0 °C durant 6 hores.

Posteriorment, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu es dissol parcialment amb acetat d'etil i es realitzen extraccions successives amb àcid cítric 10%, aigua destil·lada, NaHCO<sub>3</sub> 10% i NaCl saturat. S'evapora el dissolvent orgànic a pressió reduïda i el residu resultant es tracta amb 0.25 ml d'una solució CF<sub>3</sub>COOH 40%/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es fa passar un corrent de nitrogen gas sobre el residu obtingut durant 1 hora. Es dissol el residu amb aigua destil·lada i es fan successives extraccions amb éter dietílic. L'aigua s'elimina a pressió reduïda obtenint el producte com un sòlid blanc, el qual es conserva sec, sota atmosfera de nitrogen i refrigerat a 4°C.

La reacció es segueix per cromatografia de capa prima en sílica, utilitzant com a fase mòbil una mescla AcOH/H<sub>2</sub>O (1:9).

**Rendiment:** 0.010 gr (0.012 mmols), 34.7%

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3500-2800 b.a. (st. OH, st. NH, st. CH arom., st. CH. alif.), 1745 (st. C=O éster, emmascarada per la banda ampla a 1678 cm<sup>-1</sup>), 1678 b.a. (st. C=O amida, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 1543 ( $\delta$  NH, st. si. N-C=O), 1520 ( $\delta$  NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 1440 ( $\delta$  ip NH), 1205 (st. CN; st. CO), 1138 (st. CF), 723 (st.si. COO<sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**ESI -MS (H<sub>2</sub>O/MeOH):** [M-CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>]<sup>+</sup> = 713 m/z.

### 3.2.2. [(dap-TTNYT-OCH<sub>3</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH].

Seguint el mateix procediment que en l'apartat 3.2.1. (pàg. 245), es realitza l'esterificació del pèptid addicionant lentament 36  $\mu$ L de clorur de tionil (10 eq.) sobre 150  $\mu$ L de MeOH absolut (3 mL/mmol) refredat en un bany de gel a 0°C. S'introdueix el pèptid H-TTNYT-OH (0.030 gr, 0.04 mmols) tot de cop. El producte obtingut s'utilitza en el següent pas sense purificació prèvia. **Rendiment:** 0.011 gr (0.017 mmols), 34.37%.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3500-2800 b.a. (st. OH, st. NH, st. CH alif., st. CH arom.), 1747 (st. C=O éster), 1667 (st. C=O amida), 1516 ( $\delta$  NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 1150 (st. as. CO éster), 1115 (st. si. CO éster). **RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300K):**  $\delta$ (ppm)= 1.08 (m, 9H, C-CH<sub>3</sub>), 2.3-3.3 (m, 4H, NOC-CH<sub>2</sub>, C<sub>arom</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.4-4.1 (m, 11H, CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>3</sub>, CH) 6.63 (m, 2H, CH fenol), 6.91 (m, 2H, CH fenol). **RMN.<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O+MeOD (ref.), 300K):**  $\delta$  (ppm)= 16.9 (C-CH<sub>3</sub>), 36.7 (CH<sub>2</sub>), 53.8 (O-CH<sub>3</sub>), 55.25 (CH), 57.5 (CH), 59.6 (CH), 60.4 (CH), 66.42 (CH), 67.44 (HO-CH), 68.28 (HO-CH), 70.5 (HO-CH), 116.7 (Carom.), 128.7 (Carom.), 131.7 (Carom), 155.8 (Carom), 169.2 (N-C=O), 172.4 (N-C=O), 173.4 (COOMe). **ESI -MS (H<sub>2</sub>O/MeOH):** [M]<sup>+</sup> = 628.7 m/z.

Es dissolen 0.016 gr de (BOC)<sub>2</sub>Hdap (0.052 mmols) en 2 mL de THF anhidre i sota atmosfera de nitrogen, i la dissolució resultant es refreda a -15 °C en un bany de gel/NaCl. A la mescla s'addiciona N-metilmorfolina (6.2  $\mu$ L, 0.056 mmols) i cloroformiat d'isobutil (6.8  $\mu$ L, 0.052 mmols) i es deixa en agitació durant 5 minuts. Un cop

transcorreguts, s'afageix una dissolució aquosa de ClH-H-TTNYT-OCH<sub>3</sub> (0.027 gr, 0.041 mmols) prèviament neutralitzada amb una solució de NaHCO<sub>3</sub> (0.0035 gr, 0.041 mmols). La barreja resultant es deixa en agitació en un bany de gel a 0 °C durant 6 hores. Seguint el mateix procediment que en l'apartat anterior (3.2.1., pàg. 245) s'obté el producte en forma de sòlid blanc, el qual es conserva sec, sota atmosfera de nitrogen i refrigerat a 4°C.

La formació del producte s'ha seguit per cromatografia de capa prima en sílica, utilitzant com a fase mòbil una barreja AcOH/H<sub>2</sub>O (1:9).

**Rendiment:** 0.010 gr (0.011 mmols), 26.3%.

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300K):** δ (ppm)= 1.01 (m, 9H, C-CH<sub>3</sub>), 2.82 (m, 2H, C<sub>arom</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.52 (m, 12H, CH-C=O, CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>3</sub>), 4.28 (m, 4H, O-CH, N<sup>+</sup>-CH), 6.63 (m, 2H, CH arom.), 6.94 (m, 2H, CH arom.)

**ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH):** [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup>= 814.4 m/z

### 3.2.3. [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH].

Es dissolen 0.022 gr de (BOC)<sub>2</sub>Hdap (0.072 mmols) en 5 mL de THF anhidre i sota atmosfera de nitrogen, i la dissolució resultant es refreda a -15 °C en un bany de gel/NaCl. A la mescla s'addiciona N-metilmorfolina (8.5 μL, 0.077 mmols) i cloroformiat d'isobutil (9.4 μL, 0.072 mmols) i es deixa en agitació durant 5 minuts. Un cop transcorreguts, s'afageix una dissolució aquosa de H-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub> (0.05 gr, 0.055 mmols). La barreja resultant es deixa en agitació en un bany de gel a 0 °C durant 6 hores. Seguint el mateix procediment que en l'apartat 3.2.1. (pàg. 245) s'obté el producte en forma de sòlid blanc, el qual es conserva sec, sota atmosfera de nitrogen i refrigerat a 4°C.

La formació del producte es segueix per cromatografia de capa prima en sílica utilitzant com a fase mòbil una barreja AcOH/H<sub>2</sub>O (1:9).

**Rendiment:** 0.033 gr (0.028 mmols), 51%.

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300K):** d (ppm)= 1.03 (m, 12H, C-CH<sub>3</sub> (T)), 1.24 (d, 3H, C-CH<sub>3</sub> (A), J= 4.1 Hz), 2.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Y)), 2.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (N)), 3.34 (d, 2H, CH<sub>2</sub> (dap), J=3.1 Hz), 3.67 (d, 2H, CH<sub>2</sub> (S), J= 3.1 Hz), 3.97-4.43 (m, 13H, CH-OH, CH-C=O, N<sup>+</sup>-CH), 6.62 (d, 2H, C<sub>arom</sub>, J=4.6 Hz), 6.92 (d, 2H, C<sub>arom</sub>, J=4.6 Hz).

**RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O + MeOD ref., 300K):** d (ppm)= 17.6 (CH<sub>3</sub> (A)), 19.6 (CH<sub>3</sub> (T)), 36.9 (C-CH<sub>2</sub>), 49.8 (N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 51.2 (CH (A)), 56.3-61.8 (CH-C=O), 67.9 (CH-OH), 116.5 (C<sub>arom</sub>), 128.8 (C<sub>arom</sub>), 131.4 (C<sub>arom</sub>), 155.4 (C<sub>arom</sub>), 172.04-175.2 (N-C=O).

**ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH):** [M-2CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>-H<sup>+</sup> + Na<sup>+</sup>]= 965; [M-2CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>-H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>]= 981 m/z

#### 3.2.4. PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)

A una dissolució (2 mL) de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (0.014 gr, 0.034 mmols) s'addiciona una solució aquosa (1 mL) de NaHCO<sub>3</sub> (0.006 gr, 0.071 mmols) i es comprova que el pH=7. Posteriorment, s'afageix una dissolució aquosa (5 mL) de [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH] (0.04 gr, 0.034 mmols) i es deixa en agitació a temperatura ambient, observant-se la formació d'un precipitat marronós. El sòlid es filtra i es renta amb aigua destil·lada i éter dietílic.

**Rendiment:** 0.011 gr (0.009 mmols), 27.8%.

**AE:** 12.13 %N, 34.34 %C, 5.43 %H. Calculat per PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)·6H<sub>2</sub>O (Mm= 1317.06 gr/mol): 12.76 %N, 34.65 %C, 5.66 %H.

**ESI-MS (H<sub>2</sub>O/MeOH):** [M]<sup>-</sup> = 1207 m/z

### 3.3. ASSAIGS BIOLÒGICS

#### 3.3.1. Estudi de la interacció Pt-DNA per dicroisme circular.

Per la preparació de les mostres i la realització de les mesures de dicroisme circular es segueix la mateixa metodologia que la descrita en el Capítol 3, apartat 3.3.1. pàg. 81.

### 3.3.2. Línies cel·lulars tumorals, condicions de cultiu i activitat citotòxica.

La línia **HeLa** (línia de carcionoma humà d'úter) ha estat cultivada en medi complet DMEM suplementat amb 10% FBS en flascons de cultiu estèrils. Els flascons s'han mantingut a 37 °C, 10% de CO<sub>2</sub> i 90% d'humitat en l'incubador. Les cèl·lules es deixen créixer fins que aconseguen un 90% de confluència, canviant el medi segons les necessitats de cultiu (cada 2-4 dies). Un cop aconseguida la monocapa cel·lular, les cèl·lules es tripsinitzen per realitzar nous subcultius. Es sembla entre 1:2 a 1:10 segons la proporció de subcultiu de la línia cel·lular. Es congela una alíquota amb nitrogen líquid.

La preparació i aplicació de les mostres es realitza de la mateixa manera que la descrita en el Capítol 3, apartat 3.3.5, pàg. 84, però utilitzant un 2% de DMSO per solubilitzar les mostres.

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.

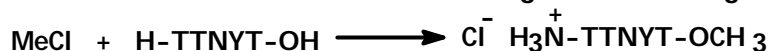
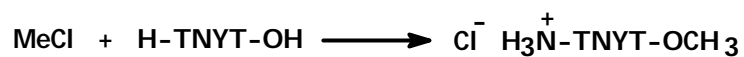
### 4.1. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ QUÍMICA DELS LLIGANDS I COMPLEXOS.

#### 4.1.1. Lligands [(dap-TNYT-OCH<sub>3</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH] i [(dap-TTNYT-OCH<sub>3</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH].

Per portar a terme la reacció d'acoblament d'un pèptid al lligand diaminoquelatant **Hdap·HCl** a través de la formació d'un enllaç amida entre el grup carboxílic de **Hdap·HCl** i el grup amina terminal del pèptid s'ha utilitzat el mètode descrit per Louloudi et al.<sup>12</sup>

En aquest cas, s'han emprat dos pèptids similars de longituds de cadena diferents. Els pèptids contenen en la seva estructura un grup NH<sub>2</sub> terminal i un grup COOH terminal, de manera que en el transcurs de la reacció, diferents molècules de pèptid podrien reaccionar entre si i formar-se enllaços peptídics entre elles. Per tal d'evitar aquest tipus d'acoblament, es fa necessari protegir el grup carboxílic terminal en forma d'èster. Seguint un mètode similar al descrit per Egberston et al.,<sup>13</sup> s'ha realitzat l'esterificació fent reaccionar clorur de tionil amb metanol per formar clorur

de metil, el qual en una següent etapa reacciona amb el grup carboxílic del pèptid per donar lloc a l'èster metílic. Un resum de la reacció es mostra en l'Esquema 1.




---

**Esquema 1. Reacció d'esterificació dels pèptids H-TNYT-OH i H-TTNYT-OH**

La formació de MeCl s'ha de realitzar en condicions inertes perquè el clorur de tionil és sensible a l'aigua i es pot hidrolitzar.

Els pèptids esterificats s'han caracteritzat per espectroscopia d'IR, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C i ESI-MS.

**Espectroscopia IR.** S'han enregistrat els espectres IR de ClH·H-TNYT-OCH<sub>3</sub> i ClH·H-TTNYT-OCH<sub>3</sub>, els quals es presenten en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 273), i les principals bandes d'absorció es mostren en la Taula 1. Com es pot observar a través dels valors presentats en la taula, en ambdós pèptids esterificats apareix una banda a 1745 cm<sup>-1</sup> aproximadament corresponent a la vibració st. C=O de l'èster metílic, inexistent en el pèptid inicial. Aquest últim, presenta una banda ampla a 1655 cm<sup>-1</sup> deguda a la vibració st. C=O del grup amida i del grup carboxílic (apareix a un valor de freqüència més baix que l'esperat per un àcid carboxílic, segurament perquè es troba en forma de zwitterió o formant ponts d'hidrogen intramoleculars)<sup>14</sup> (Figura 2). També són característiques dels ésters les bandes corresponents a la vibració st. C-O simètica i asimètrica a aproximadament 1110 cm<sup>-1</sup> i 1150 cm<sup>-1</sup> respectivament.

Vibracions	TNYT-OH/TTNYT-OH	TNYT-OCH <sub>3</sub>	TTNYT-OCH <sub>3</sub>
n OH (t)	3200-3600 b.a.	2800-3500 b.a.	2800-3500 b.a.
n NH (t)	3200-3600 b.a.	2800-3500 b.a.	2800-3500 b.a.
n CH <sub>alif.</sub> (t)	2977	2800-3500 b.a.	2800-3500 b.a.
n CH <sub>arom.</sub> (t)	3085	2800-3500 b.a.	2800-3500 b.a.
n C=O (t)	1655 b.a.	1745 éster/1671 amida	1747 éster/1667 amida
n NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (d)	1516	1515	1516
n CO (d)	1243 b.a.	1152 as./1109 si.	1150 as./1115 si.

Taula 1. Principals freqüències d'absorció IR (cm<sup>-1</sup>) dels pèptids inicials i dels pèptids esterificats. (t)= tensió o *stretching*, (d)= deformació o *bending* (b.a.)= banda ampla, (as)=assimètric, (s)=simètric.

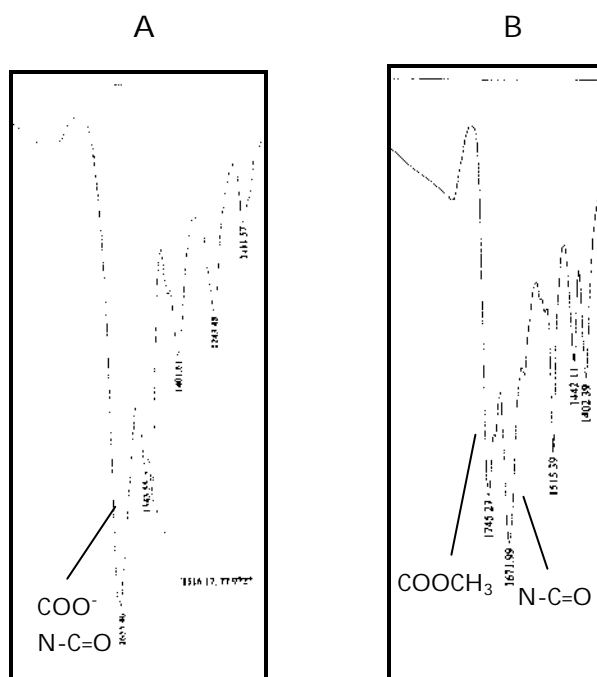


Figura 2. Zona espectral compresa entre 1400 i 1800 cm<sup>-1</sup> dels espectres IR de TNYT-OH (A) i TNYT-OCH<sub>3</sub> (B), on es pot observar les diferències de les bandes característiques de la vibració st. C=O entre 1650-1750 cm<sup>-1</sup>.

**Espectroscopia RMN-<sup>1</sup>H i RMN-<sup>13</sup>C.** S'han enregistrat els espectres de RMN-<sup>1</sup>H i RMN-<sup>13</sup>C dels dos pèptids esterificats, els quals es mostren en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 273), i els principals desplaçaments químics es recullen en la Taula 2.



<i>RMN-<sup>1</sup>H</i> <i>d (ppm)</i>	<i>C-CH<sub>3</sub></i>	<i>CH<sub>2</sub></i>	<i>O-CH<sub>3</sub>, CH</i>	<i>CH<sub>a</sub></i>	<i>CH<sub>b</sub></i>			
TNYT-OCH <sub>3</sub>	1.05 dd	2.45- 3.08 m	3.46- 3.83 m	6.56 s.a.	6.85 s.a.			
TTNYT-OCH <sub>3</sub>	0.88- 1.23 m	2.3- 3.3 m	3.4- 4.1 m	6.63 s.a.	6.91 s.a.			
<i>RMN-<sup>13</sup>C</i> <i>d (ppm)</i>	<i>CH<sub>3</sub></i>	<i>CH<sub>2</sub></i>	<i>O-CH<sub>3</sub></i>	<i>CH</i>	<i>HO-CH</i>	<i>C<sub>arom</sub></i>	<i>N-C=O</i>	<i>C=O</i>
TNYT-OCH <sub>3</sub>	19.41- 19.67	36.39	53.54	55.14- 59.38	67.17- 70.2	116.42- 155.47	168.79- 173.20	176.60
TTNYT-OCH <sub>3</sub>	16.9	36.7	53.8	55.25- 66.424	67.44- 70.5	116.7- 155.8	169.2- 172.4	173.4

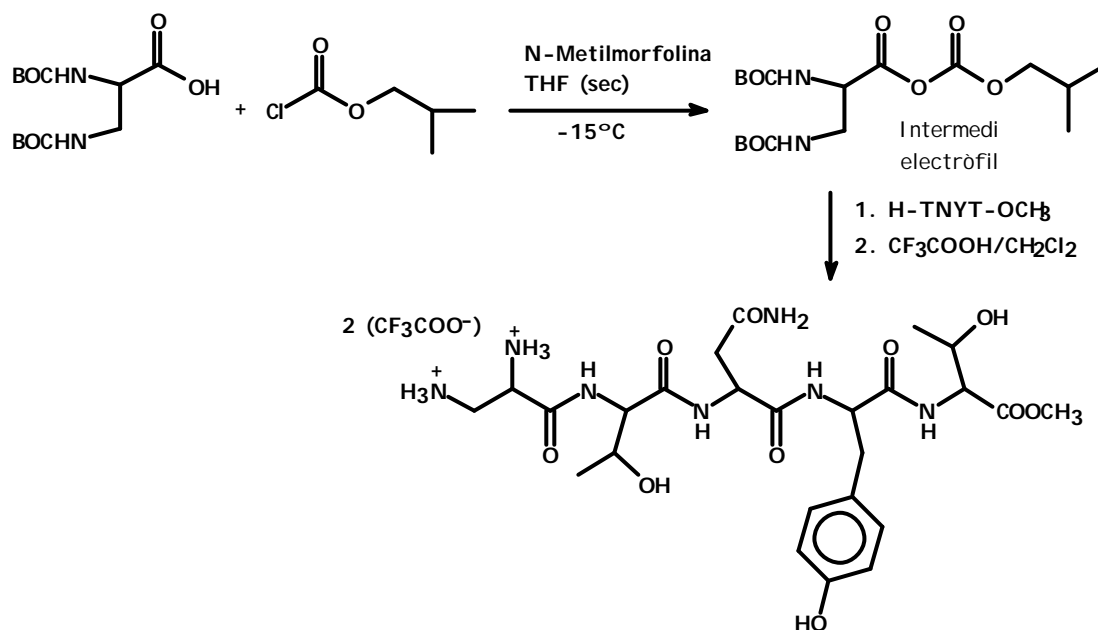
Taula 2. Valors dels desplaçaments químics (ppm) de protó i de carboni dels pèptids esterificats, CIH· H-TNYT-OCH<sub>3</sub> i CIH· H-TTNYT-OCH<sub>3</sub>.

Els senyals dels protons d'un mateix tipus de grup funcional apareixen molt propers entre si, de manera que en la taula s'han agrupat per rangs espectrals. El senyal corresponent als protons del grup COOCH<sub>3</sub> de l'èster metílic apareix com a singlet en la zona compresa entre 3 i 4 ppm juntament amb els senyals dels protons CH de la cadena peptídica. Els senyals dels protons de l'anell aromàtic del fenol apareixen com a dos senyals amples sense estructuració, però en realitat correspondrien a dos doblets, un pels protons en α (equivalents entre si) i l'altre pels protons en β (equivalents entre si). L'acoblament d'un protó en α amb un protó en β genera un doblet, de la mateixa manera que l'acoblament invers. Els protons en α respecte el C-OH apareixen a un desplaçament químic més baix que els que es troben en posició β. Aquest fenomen és degut a l'efecte electrodonador del -OH, el qual augmenta la densitat electrònica sobre els protons en α, augmentant l'apantallament d'aquests respecte els protons en posició β. L'augment de l'apantallament provoca que els protons en α apareguin a desplaçaments químics menors que els protons en posició β.

En l'espectre de RMN-<sup>13</sup>C també s'observa una agrupació dels senyals dels carbonis que pertanyen a un mateix tipus de grup funcional, de manera que els que es distingeixen de forma clara són els senyals de carboni C-CH<sub>3</sub> a 17-19 ppm, els senyals dels carbonis de l'anell aromàtic a 116-155 ppm, i finalment els senyals dels carbonis dels grups carbonil (N-C=O i COOMe) a 169-175 ppm.

El pèptid esterificat, un cop aïllat, s'utilitza en el següent pas d'acoblament amb el lligand Hdap.

Segons el mètode de Louludi et al.<sup>12</sup> que s'ha seguit per la formació d'un enllaç tipus amida entre el grup carboxílic de Hdap i el grup amina dels pèptids esterificats, el diaminoàcid Hdap ha de tenir els grups amina protegits amb BOC per tal que no intervinguin en la reacció. La reacció de protecció del lligand Hdap amb BOC ha estat presentada en el capítol 4. Aquest, es fa reaccionar en medi bàsic amb cloroformat d'isobutil per formar un intermedi electròfil que pot ser atacat nucleofílicament pel grup amina terminal del pèptid. És important treballar amb dissolvents anhidres durant la primera part de la reacció (formació de l'intermedi electròfil) perquè el cloroformat d'isobutil descomposa gradualment en presència d'aigua. En l'Esquema 2 es mostren els diferents passos de la reacció.



Esquema 2. Reacció d'acoblament del pèptid H-TNYT-OCH<sub>3</sub> al lligand diaminoquelatant Hdap seguint el mètode descrit per Louludi et al. El mateix procediment s'aplica al pèptid H-TTNYT-OCH<sub>3</sub>.

Els diferents subproductes que es formen durant el transcurs de la reacció (N-metilmorfolina hidroclorada, 2-metilpropanol, excés de base i de cloroformat d'isobutil)

s'eliminen amb successives extraccions àcides i bàsiques, excepte pel 2-metilpropanol, que s'elimina per evaporació.

La caracterització dels lligands s'ha portat a terme a través d'espectroscopia IR, RMN-<sup>1</sup>H i ESI-MS.

**Espectroscopia IR.** S'ha enregistrat l'espectre IR del lligand [(dap-TNYT-OCH<sub>3</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH], el qual es mostra en l'apartat de material suplementari d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 273), i en la Taula 3 es presenten les principals freqüències d'absorció.

<i>Vibracions</i>	<i>dap-TNYT-OCH<sub>3</sub></i>
n OH (t)	2800-3500 b.a.
n NH (t)	2800-3500 b.a.
n CH <sub>alif.</sub> (t)	2800-3500 b.a.
n CH <sub>arom</sub> (t)	2800-3500 b.a.
n C=O (t)	1678 b.a.
n NH (d)	1543
n NC=O (t)	1543
n NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (d)	1520
n CN (t)	1205
n CO (t)	1205
n CF (t)	1138

Taula 3. Principals bandes d'absorció IR del lligand [(dap-TNYT-OCH<sub>3</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH]. Els valors de les freqüències d'absorció es presenten en cm<sup>-1</sup>. (t)= tensió, (d)= deformació, (b.a.)= banda ampla.

Amb els valors presentats en la taula, es pot destacar la banda ampla que apareix a 1678 cm<sup>-1</sup>, la qual és resultat del solapament de les vibracions corresponents al st. C=O de l'éster (a 1745 cm<sup>-1</sup>), el st. C=O dels grups amida, i el st. C=O del contraió CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>. A 1520 cm<sup>-1</sup> apareix la banda corresponent a la deformació δ NH<sub>3</sub><sup>+</sup> provinent dels grups amina protonats, i en la zona compresa entre 2800-3500 cm<sup>-1</sup> apareix una banda molt

ampla que correspon al solapament de les vibracions st. OH, st. NH dels grups amina, st. CH alifàtics i st. CH aromàtics.

**Espectroscopia RMN-<sup>1</sup>H.** S'ha enregistrat l'espectre de RMN-<sup>1</sup>H del lligand [(dap-TTNYT-OCH<sub>3</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH], el qual es mostra en l'apartat de material suplementari d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 273), i els principals desplaçaments químics es presenten en la Taula 4. Es pot observar que la major part dels senyals de la molècula es concentren en la zona compresa entre 1-4.5 ppm .

<i>d(ppm)</i>	<i>C-CH<sub>3</sub></i>	<i>CH<sub>2</sub></i>	<i>O-CH<sub>3</sub>, CH</i>	<i>CH<sub>a</sub></i>	<i>CH<sub>b</sub></i>
<b>TTNYT-OCH<sub>3</sub></b>	0.88-1.23 (m)	2.3-3.3 (m) N,Y 3.4-4.1 (m) dap	3.4-4.1 (m)	6.63 s.a.	6.91 s.a.
<b>dap-TTNYT-OCH<sub>3</sub></b>	0.90-1.01 (m)	2.82 (m) Y 3.52 (m) N, dap	3.52-4.28 (m)	6.63 s.a.	6.94 s.a.

**Taula 4.** Desplaçaments químics de protó (en ppm) de TTNYT-OCH<sub>3</sub> i dap-TTNYT-OCH<sub>3</sub>. Els espectres s'han realitzat en D<sub>2</sub>O. (m) multiplet. (s.a.) senyal ample.

Com es pot observar en la Figura 3, a 1.01 ppm apareix el senyal ample corresponent als protons metàl·lics de l'aminoàcid treonina. Entre 3.4 ppm i 3.7 ppm apareix un altre senyal ample i intens el qual és resultat del solapament de diversos senyals de protons de grups diferents, com els protons metilènics de l'èster, els CH de la cadena peptídica, i els CH<sub>2</sub> de l'estructura exceptuant el CH<sub>2</sub> de l'asparagina (N). A desplaçaments químics una mica més alts apareixen els senyals dels protons CH adjacents als grups OH, COOCH<sub>3</sub> i NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, molt propers entre ells.

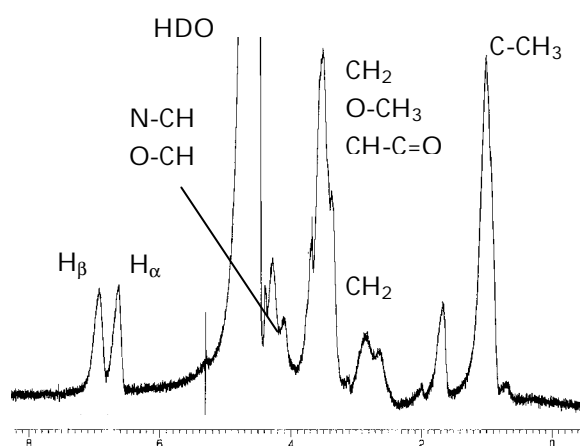


Figura 3. Rang comprès entre 0 i 7.5 ppm de l'espectre de RMN-<sup>1</sup>H del lligand [(dap-TTNYT-OCH<sub>3</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH]. L'espectre s'ha enregistrat utilitzant D<sub>2</sub>O.

En la zona espectral 6.6-7 ppm es distingeixen els senyals corresponents als protons de l'anell del fenol, els quals apareixen com a senyals amples, però correspondrien a dos doblets degut a l'acoblament dels protons α amb els protons β del mateix costat de l'anell, i viceversa.

**ESI-MS.** S'han enregistrat els espectres dels dos lligands, els quals es mostren en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 273), on es pot observar el senyal corresponent al catió resultant de la pèrdua d'un contraió CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, [M-CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>]<sup>+</sup>, a 713 m/z i 814 m/z respectivament (Figura 4). En cada cas s'ha realitzat la simulació teòrica, obtinguda una distribució isotòpica igual a l'obtinguda experimentalment.

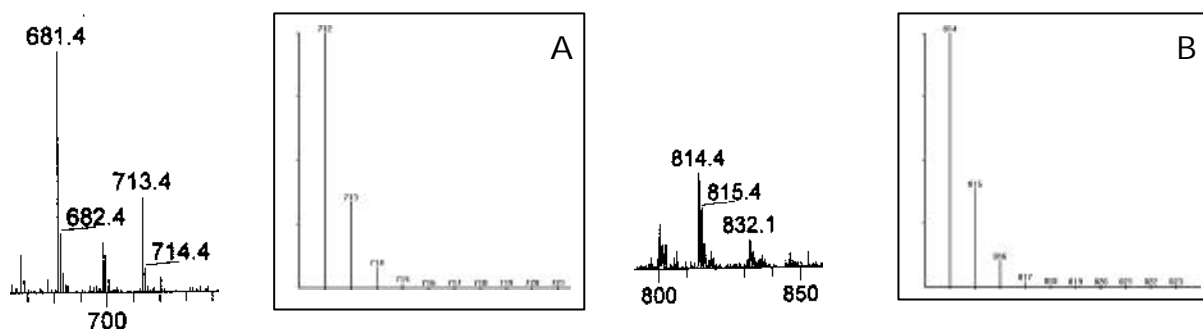


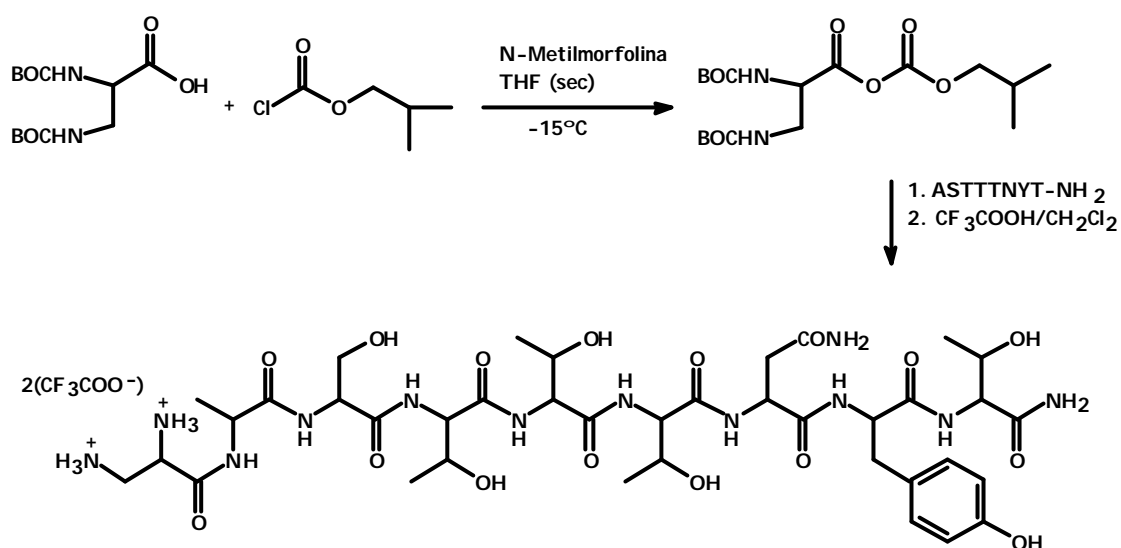
Figura 4. Senyals corresponents al ió molecular  $[M-CF_3COO]^{+}$  de l'espectre ESI-MS dels lligands  $[(dap-TNYT.OCH_3) \cdot 2CF_3COOH]$  (A) i  $[(dap-TTNYT-OCH_3) \cdot 2CF_3COOH]$  (B) amb les corresponents simulacions teòriques.

#### 4.1.2. Lligand $[(dap-ASTTTNYT-NH_2) \cdot 2CF_3COOH]$ .

La reacció d'acoblament entre el lligand diaminoquelatant **Hdap·HCl** i el pèptid **ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>** a través de la formació d'un enllaç amida entre el grup carboxílic de Hdap i el grup amina terminal del pèptid s'ha realitzat seguint el mateix mètode descrit per Louloudi et al.<sup>12</sup>

El pèptid H-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub> té el grup C-terminal protegit en forma d'amida, de manera que la reacció d'acoblament amb el lligand diaminoquelatant Hdap·HCl es pot realitzar sense perill que es produeixi enllaç de varies molècules de pèptid. Igual que en els altres dos pèptids descrits anteriorment, la reacció s'ha de dur a terme utilitzant el lligand **Hdap** N-protegit amb BOC, per tal que els dos grups amina no interfereixin en la reacció.

El procediment no difereix gaire dels dos casos anteriors i es mostra en l'Esquema 3.



**Esquema 3.** Reacció d'acoblament del pèptid H-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub> amb el lligand diaminoquelatant Hdap seguint el mètode descrit per Louloudi et al.

Cal destacar que, a diferència dels casos anteriors, l'intermedi de reacció que es forma, (BOC)<sub>2</sub>dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub> (producte obtingut abans de la desprotecció del BOC), és insoluble en EtOAc i en diversos dissolvents orgànics com CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, hexà, THF, entre altres, però en canvi és soluble en DMSO i DMF. Això dificulta el procés d'extracció dels subproductes formats, i es pot resoldre rentant el residu amb les solucions que en els altres casos s'utilitzaven com a fases aquoses extractants.

El producte final, [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH], ha estat caracteritzat per RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C i ESI-MS.

**Espectroscopia RMN-<sup>1</sup>H.** S'ha enregistrat l'espectre de RMN-<sup>1</sup>H utilitzant D<sub>2</sub>O com a dissolvent, el qual es presenta en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (apartat 7, pàg. 273) i els principals desplaçaments químics es resumeixen en la Taula 5. Com es pot observar en les dades de la taula i la Figura 5, en la zona propera a 1 ppm apareixen dos grups de senyals. Un primer senyal més intens corresponent als protons del grup CH<sub>3</sub> de les treonines, i un segon senyal menys intens (doblet) corresponent als protons CH<sub>3</sub> de l'alanina. Entre 2.4 i 2.8 ppm apareixen dos senyals corresponents als protons CH<sub>2</sub> de les cadenes laterals CH<sub>2</sub>-CONH<sub>2</sub> i CH<sub>2</sub>-fenol, essent

aquest últim el que apareix a un desplaçament químic més baix, ja que es troba més apantallat per la densitat electrònica del fenol. Els dos doblets que apareixen a 3.67 i 3.34 ppm corresponen al CH<sub>2</sub> de la serina i al CH<sub>2</sub> de dap respectivament, essent aquest últim inexistent en l'espectre del pèptid inicial ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>. Aquests protons s'acoblen als protons CH adjacents donant lloc a un doblet i no s'acoblen als protons del grup OH ni del grup NH<sub>3</sub><sup>+</sup> degut a l'intercanvi d'aquests protons per deuteris. Els senyals dels protons dels grups CH de la cadena d'aminoàcids i el CH del lligand dap apareixen molt propers en la zona compresa entre 3.8 ppm i 4.5 ppm.

<i>d(ppm)</i>	<i>C-CH<sub>3</sub></i>	<i>CH<sub>2</sub></i>	<i>CH</i>	<i>CH<sub>a</sub></i>	<i>CH<sub>b</sub></i>
ASTTTNYT-NH <sub>2</sub>	1.15-1.25 (m) T	2.77 (Y) m	4.1-4.8	6.88 (d)	7.17 (d)
	1.57-1.62 (m) A	3.08 (N) m			
		3.95 (S) m			
dap-ASTTTNYT-NH <sub>2</sub>	0.85-1.03 (m) T	2.49 (Y) m	3.97-4.43	6.62 (d)	6.92 (d)
	1.21-1.24 (d) A	2.79 (N) m			
		3.34 (dap) d			
		3.67 (S) d			

Taula 5. Desplaçaments químics de protó (en ppm) de ASTTTNYT-NH<sub>2</sub> i dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>. Els espectres s'han realitzat en D<sub>2</sub>O. (m) multiplet, (d) doblet.

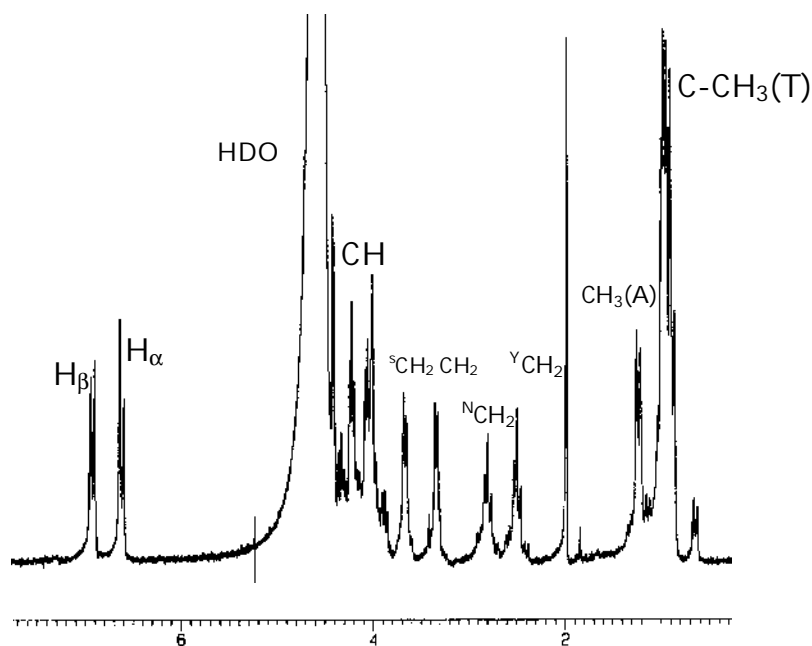


Figura 5. Espectre de RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) del lligand [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH] en el rang espectral comprès entre 0 i 7 ppm.



De forma destacable apareixen a 6.5-7 ppm els senyals dels protons aromàtics en forma de dos doblets, ja que cada un s'acobla al protó del grup CH adjacent. De la mateixa manera que en els altres dos pèptids anteriors, els protons en posició  $\alpha$  respecte el grup -OH del fenol apareixen a un desplaçament químic inferior que els protons en posició  $\beta$ , ja que es troben més apantallats degut a l'efecte electrodonador del grup hidroxil.

**Espectroscopia RMN- $^{13}\text{C}$ .** S'ha enregistrat l'espectre de RMN- $^{13}\text{C}$  del lligand [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH] i s'ha comparat amb el del pèptid inicial ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>. Ambdós es mostren en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 273), i els desplaçaments químics es resumeixen en la Taula 6. Tal i com es mostra en les dades de la taula, en l'espectre es poden distingir els senyals dels grups CH i CH<sub>2</sub> alifàtics en la zona compresa entre 18 ppm i 68 ppm. Cap a desplaçaments químics més alts apareixen dos grups de senyals, un corresponent als senyals del carbonis aromàtics (116-155 ppm) i l'altre corresponent als carbonis dels grups NH-C=O i del C=O del contraió trifluoroacetat.

<i>d</i> (ppm)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	N-CH <sub>2</sub>	CH (A)	CH	CH-OH	Carom.	N-C=O
ASTTTNYT	17.9 (A) 19.9 (T)	37.2	-	51.5	56.6-62.2	68.2	116.8-155.7	172.3-175.0
dap-ASTTTNYT	17.6 (A) 19.6 (T)	36.9	49.8	51.2	56.3-61.8	67.9	116.5-155.4	172.0-175.2

**Taula 6.** Desplaçaments químics de carboni (ppm) del pèptid ASTTTNYT-NH<sub>2</sub> i el lligand [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH]. Els espectres han estat realitzats en D<sub>2</sub>O, utilitzant com a referència MeOD. (-) emmascarat pel senyal de la referència.

La zona compresa entre 110 i 135 ppm és característica del quadruplet format pels senyals de carboni de l'enllaç C-F<sub>3</sub> del trifluoroacètic degut a l'acoblament C-F, però no es distingeixen clarament en l'espectre del lligand [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH] ja que en la mateixa zona apareixen els senyals dels carbonis aromàtics.

**ESI-MS.** S'ha enregistrat l'espectre ESI-MS de [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH] utilitzant com a fase mòbil MeOH/H<sub>2</sub>O, i es mostra en l'apartat de material suplementari d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 273). A través de l'espectre s'observa el senyal corresponent al catió resultant de la pèrdua de dues molècules de contraió (CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) i un protó, ([M-2CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>-H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>) (m/z=942), contenint ió sodi (m/z=965) i ió potassi (m/z=981) (Figura 6). Els senyals que apareixen a valors de m/z inferiors corresponen a diferents fragmentacions de la molècula.

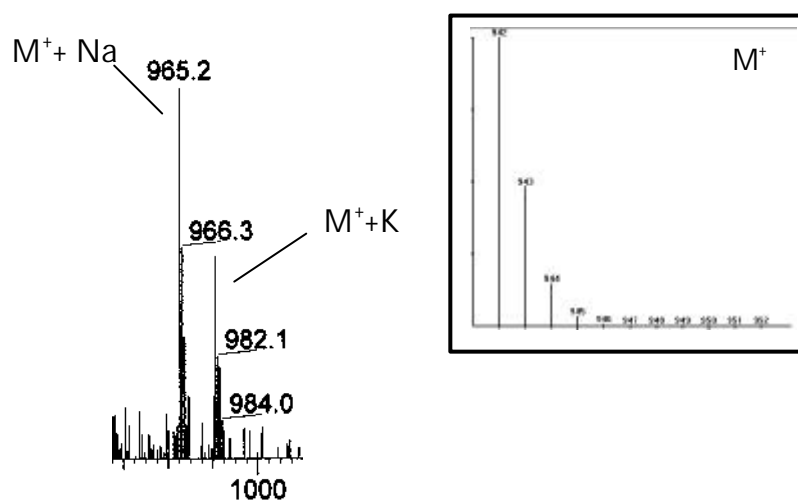
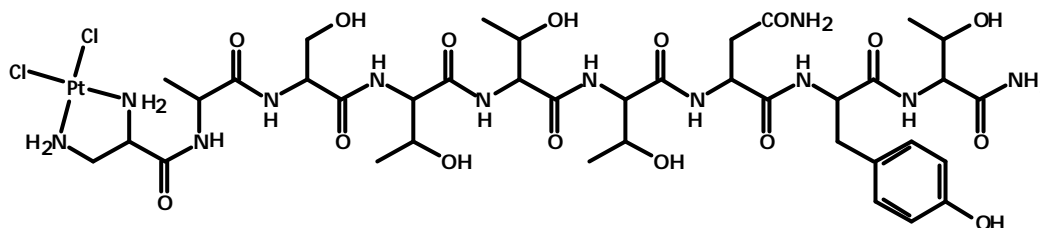
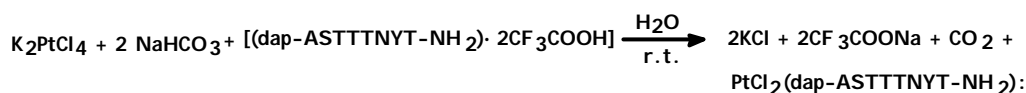


Figura 6. Espectre ESI-MS en el rang comprès entre 1000 i 950 m/z on s'observen els senyals corresponents a [M-2CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>-H<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup> i [M-2CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>-H<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>]<sup>+</sup>. En el requadre es presenta la simulació teòrica de [M-2CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>-H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>, on es pot observar que la distribució teòrica coincideix amb l'experimental.

#### 4.1.3. Complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>).

Per tal de complexar el lligand obtingut amb Pt(II), es fa reaccionar quantitats equimolars de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> i del lligand [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH], tal i com es mostra en l'Esquema 4. S'afageix el lligand sobre la sal de platí per afavorir la formació del complex amb estequiometria 1:1. La presència d'una base és necessària per neutralitzar els grups amina protonats, de manera que els àtoms de nitrogen tinguin els dos electrons lliures per coordinar-se dativament amb el Pt(II).

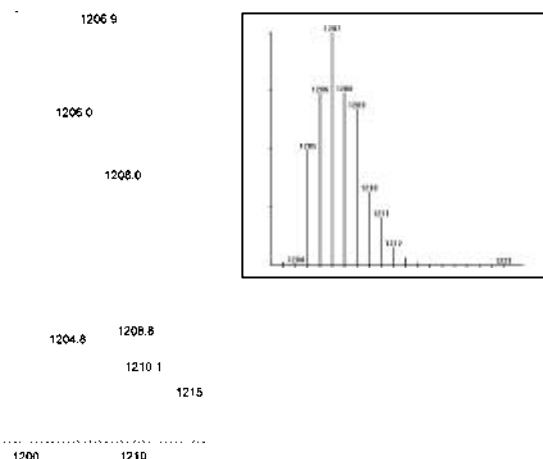


Esquema 4. Reacció de complexació del lligand  $[(\text{dap-ASTTTNYT-NH}_2) \cdot 2\text{CF}_3\text{COOH}]$  amb Pt(II), realitzada a temperatura ambient i en quantitats equimolars dels reactius.

El complex resultant és bastant insoluble en aigua i en molts dissolvents orgànics, exceptuant el DMSO i DMF. S'ha caracteritzat per anàlisi elemental i ESI-MS.

La complexació amb Pt(II) només s'ha pogut realitzar amb el lligand  $[(\text{dap-ASTTTNYT-NH}_2) \cdot 2\text{CF}_3\text{COOH}]$  perquè no s'ha disposat de quantitat de producte suficient pels altres compostos.

**ESI-MS.** S'ha enregistrat l'espectre ESI-MS del complex, dissolent-lo a pH bàsic i utilitzant com a fase mòbil MeOH/H<sub>2</sub>O. L'espectre obtingut es mostra en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 273). Com que el complex és neutre, per poder realitzar l'espectre ESI-MS ha calgut afegir una petita quantitat de base per tal de desprotonar algun grup hidroxílic de la molècula i formar una càrrega negativa, permetent també la solubilització del complex. L'espectre s'ha hagut d'analitzar en negatiu per poder detectar les espècies aniòniques, però degut a que la solubilització amb la base emprada no ha estat completa, la intensitat dels senyals no ha estat molt elevada. Tot i això, s'ha pogut observar el senyal corresponent a l'anió  $[\text{M-H}]^-$  (Figura 7).



**Figura 7.** Espectre ESI-MS en el rang comprès entre 1215 i 1200 m/z on s'observa el senyal corresponent a l'anió  $[M-H]^-$ . En el requadre es presenta la simulació teòrica, on es pot apreciar que la distribució teòrica coincideix amb l'experimental.

La distribució isotòpica del complex difereix de forma important a la distribució del respectiu lligand, ja que en aquest cas cal tenir en compte la presència dels diferents isòtops del platí i del clor, donant lloc a la distribució característica dels complexos de platí.

## 4.2. ASSAIGS BIOLÒGICS.

### 4.2.1. Estudi de la interacció Pt-DNA per dicroisme circular.

Per poder demostrar si el complex  $PtCl_2(dap-ASTTTNYT-NH_2)$  presenta la capacitat d'interaccionar amb el DNA i modificar la seva estructura secundària, s'ha enregistrat l'espectre de dicroisme circular del DNA-Calf Thymus incubat amb el complex i el respectiu lligand a 37 °C durant 48 hores. Els espectres obtinguts es mostren en la Figura 8, on es representa els valors d'el·lipicitat en front de la longitud d'ona, i les dades més significatives es presenten en la Taula 7. En tots ells es pot observar una banda positiva entre 310 i 260 nm, i una banda negativa entre 260 i 220 nm.

L'espectre del lligand s'enregistra per tal de comprovar si pot interaccionar amb el DNA i si l'efecte del lligand influeix en els canvis observats en l'espectre del DNA incubat amb el complex.

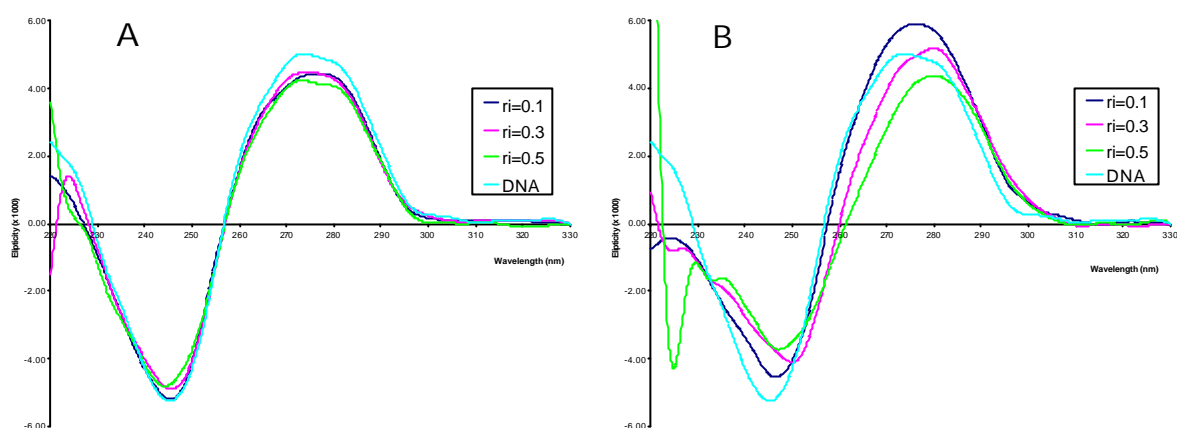


Figura 8. Espectres de DC del DNA-Calf Thymus incubat amb el lligand lliure [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH] (A) i el complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>) (B) a diferents valors de  $r_i$  (0.1, 0.3, 0.5). El·lipticitat ( $q$ )= graus·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>.

DNA				
$r_i$	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
-	273.6	$5.03 \cdot 10^3$	245.2	$-5.25 \cdot 10^3$
[(dap-ASTTTNYT-NH <sub>2</sub> )·2CF <sub>3</sub> COOH]				
$r_i$	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	276.8	$4.45 \cdot 10^3$	245.4	$-5.21 \cdot 10^3$
0.3	274.2	$4.48 \cdot 10^3$	245.8	$-4.90 \cdot 10^3$
0.5	273.4	$4.25 \cdot 10^3$	244.2	$-4.81 \cdot 10^3$
PtCl <sub>2</sub> (dap-ASTTTNYT-NH <sub>2</sub> )				
$r_i$	$l_{\max}$	$q_{\max}$	$l_{\min}$	$q_{\min}$
0.1	276.4	$5.91 \cdot 10^3$	246.6	$-4.55 \cdot 10^3$
0.3	280.2	$5.18 \cdot 10^3$	250	$-4.11 \cdot 10^3$
0.5	279.8	$4.36 \cdot 10^3$	247.2	$-3.73 \cdot 10^3$

Taula 7. Valors de  $l_{\max}$ ,  $l_{\min}$ ,  $q_{\max}$ ,  $q_{\min}$  obtinguts dels espectres de DC per cada raó molar estudiada ( $r_i$ = 0.1, 0.3, 0.5). ( $q$ )= graus·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>, ( $l$ )=nm.

En l'espectre de dicroisme circular del lligand [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH] es pot observar com aquest afecta de forma poc important l'estructura secundària del DNA, de manera que hi ha una certa interacció del lligand

amb el DNA, però no és tan significativa com la que produeix el complex. Es pot apreciar una disminució del valor de l'el·lipticitat respecte al valor del DNA lliure, i no hi ha canvis molt significatius del valor de la longitud d'ona.

En l'espectre del complex  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ASTTTNYT-NH}_2)$  es poden apreciar canvis importants en els valors de l'el·lipticitat i en els de la longitud d'ona. Respecte al DNA lliure, es produeix un desplaçament batocròmic de la longitud d'ona del màxim, i a l'augmentar la raó molar de complex disminueix l'el·lipticitat del màxim i del mínim. Aquests canvis s'atribueixen a una modificació de la conformació del DNA de la forma B a la forma C, augmentant la curvatura de l'hèlix del DNA per rotació de les bases.<sup>15,16</sup> La reducció de la banda positiva està relacionada amb la formació de segments curts d'una sola cadena contenint bases desaparellades.<sup>17</sup> Per tant, aquest complex interacciona covalentment amb el DNA i modifica la seva estructura secundària de forma diferent al cisplatí.

#### 4.2.2. Assaigs de proliferació cel·lular.

Amb els assaigs de proliferació cel·lular el que es pretén és estudiar els efectes que produeixen els complexos de Pt(II) en el creixement in vitro d'una línia cel·lular i determinar el valor de la  $\text{IC}_{50}$  (concentració de complex en la qual es produeix el 50% de mort cel·lular).<sup>18,19,20</sup>

En aquest estudi del creixement in vitro de les cèl·lules tractades amb els complexos de platí, s'estableix el número de cèl·lules vives que queden després del tractament, utilitzant un reactiu cromòfor basat en sals de tetrazol com a indicador, i es determina el valor de la  $\text{IC}_{50}$  (concentració de complex en la qual es produeix el 50% de mort cel·lular).

El temps d'incubació amb aquest reactiu depèn de la capacitat metabòlica de les cèl·lules. Per obtenir un increment significatiu de la intensitat de color són suficients de dues a cinc hores d'incubació a 37 °C. Transcorregut el temps necessari, es comptabilitza el número de cèl·lules vives en funció d'aquesta intensitat, mesurada a través d'un lector ELISA. Com més elevada és la intensitat, més gran és el percentatge de cèl·lules vives.

La citotoxicitat del complex  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ASTTTNYT-NH}_2)$  s'ha determinat en la línia cel·lular HeLa (línia de carcinoma humà d'úter) després de 72h d'incubació a 37°C utilitzant tres concentracions diferents de compost (0  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  i 414  $\mu\text{M}$ ). Per tal de solubilitzar completament el complex ha calgut l'addició d'un 2% de DMSO. Els resultats obtinguts s'han comparat amb els obtinguts pel pèptid lliure en les mateixes condicions d'incubació. Els efectes causats en la proliferació cel·lular es mostren en la Taula 8

<i>mM</i>	<i>0</i>	<i>150</i>	<i>414</i>	<i>500</i>
<b>ASTTTNYT</b>	100 ± 5.22	78.64 ± 6.32		20.75 ± 2.96
<b>PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT)</b>	100 ± 9.24	75.48 ± 9.91	0	

**Taula 8.** Valors de supervivència cel·lular expressats com a percentatge ± SD (desviació estàndard) després de 72h d'incubació de la línia cel·lular HeLa amb tres diferents concentracions de compost (mM).

Degut als pocs valors disponibles per a cada compost no es pot fer una representació exacta de la variació del percentatge de supervivència cel·lular amb la concentració de compost, però la gràfica permet veure la tendència que presenta l'activitat biològica (Figura 9).

**Figura 9.** Representació dels percentatges de supervivència cel·lular en front de la concentració de compost (mM) del pèptid ASTTTNYT-NH<sub>2</sub> i del complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>) incubats durant 72h en la línia cel·lular HeLa.

Com es pot observar en la gràfica anterior, el pèptid ASTTTNYT-NH<sub>2</sub> provoca una disminució de la supervivència cel·lular a mesura que augmenta la concentració de compost, assolint un percentatge de supervivència del 20% a una concentració elevada de 500 µM. Per altra banda, el complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>) també es mostra actiu en aquesta línia cel·lular, provocant una mort cel·lular total a una concentració de 400 µM. Els percentatges de supervivència són més baixos pel complex de Pt(II) que els presentats pel pèptid lliure. Aquest resultat suggereix que l'activitat biològica in vitro que mostra el complex no només prové del lligand, sinó que la capacitat que té l'àtom metàl·lic per coordinar-se covalentment amb el DNA incrementa el seu potencial de lesió. Semblaria així que el pèptid lliure pot atravesar la membrana i arribar a interaccionar amb el DNA, segurament a través d'un mecanisme d'intercal·lació de l'anell aromàtic entre les bases nitrogenades. Unit a l'àtom de platí, aquest pèptid pot actuar de molècula portadora, facilitant el transport del metall a través de la membrana i facilitant el seu accés al DNA nuclear.

El mateix comportament s'ha observat en altres compostos descrits en la bibliografia, els quals contenen lligands que tenen propietats antitumorals o antivirals per si mateixos, com els complexos PtCl<sub>2</sub>(razoxà) o [PtCl<sub>2</sub>(en)(acv)]<sup>2+</sup> acv= 9-(2-hidroxietoximetil)guanina.<sup>21,22</sup> També és coneguda la capacitat que tenen els aminoàcids de transportar complexos de platí a través de la membrana cel·lular, ja que els aminoàcids són bons nutrients per les cèl·lules.<sup>1</sup>

## 5. CONCLUSIONS.

- S'han sintetitzat i caracteritzat a través de diferents tècniques de determinació estructural tres nous lligands diaminoquelatants, derivats de l'aminoàcid Hdap-HCl, que contenen substituents de tipus peptídic. Aquests lligands són solubles en aigua i en dissolvents orgànics polars.



- S'ha sintetitzat i caracteritzat el complex de Pt(II) del lligand diaminoquelatant amb substituent peptídic [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH], el qual és bastant insoluble en aigua i en molt dissolvents orgànics, excepte el DMSO i DMF.
- Dels resultats de dicromisme circular es dedueix que el complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>) té la capacitat d'interaccionar amb el DNA-Calf Thymus després de 48h d'incubació a 37°C, modificant l'estructura secundària de la doble hèlix de forma important. El lligand [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)-2CF<sub>3</sub>COOH] també mostra una certa capacitat d'interacció, però no és tan remarcable com la del respectiu complex de Pt(II).
- La modificació de l'estructura secundària del DNA provocada pel complex es genera per un canvi de la conformació de la forma B a la forma C, augmentant la curvatura de l'hèlix per rotació de les bases.
- Els assaigs de proliferació cel·lular amb la línia cel·lular HeLa han demostrat que el pèptid ASTTTNYT-NH<sub>2</sub> i el complex PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>) presenten activitat antitumoral in vitro, essent l'activitat del complex més gran que la del pèptid lliure.
- L'activitat antitumoral del complex pot ser deguda, per una banda, a la capacitat del lligand d'atravessar la membrana cel·lular i poder interaccionar amb el DNA per intercal·lació, i per altra banda, a la capacitat de l'àtom de platí d'interaccionar covalentment amb el DNA una vegada ha entrat en el nucli, fent més important la lesió sobre la doble hèlix.



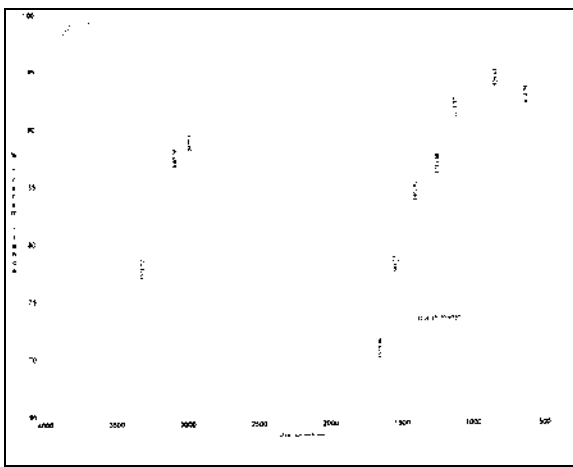
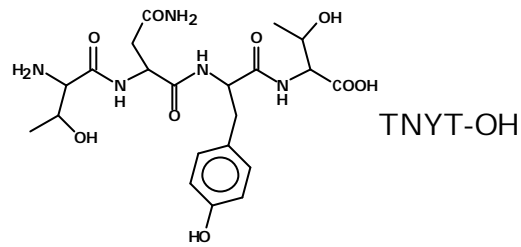
## 6. REFERÈNCIES

---

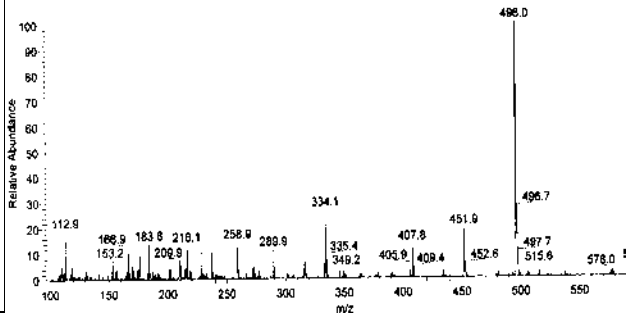
- <sup>1</sup> a) A. Iakovidis, N. Hadjiliadis. *Coord. Chem. Rev.*, **1994**, 135/136, 17-63. b) T.W. Hambley. *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, 166, 181-223.
- <sup>2</sup> a) E. Wong, E.M. Giandomenico. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2451-2466. b) T.W. Hambley, A.R. Jones. *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, 212, 35-59.
- <sup>3</sup> M.S. Robillard, A. Rob, P.M. Valentijn, N.J. Meeuwenoord, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, J. Reedijk. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 3096-3099.
- <sup>4</sup> J. Altman, M.Wilchek. *Inorg. Chim. Acta*, **1985**, 101, 171-173.
- <sup>5</sup> T.G. Appleton, J.R. Hall, T.V. Hambley, P.D. Prenzler. *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 3562.
- <sup>6</sup> B.E. Schwederski, H.D. Lee, D.W. Margerum. *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 3569.
- <sup>7</sup> S.R. Stone, J. Hofsteenge. *Biochemistry*, **1990**, 25, 4622.
- <sup>8</sup> a) T.O. Matsunaga, A.M. Laurocastrucci, M.E. Hadley, V.J. Hruby,. *Peptides*, 10, 349-354. b) V.J. Hruby. *Life Science*, **1982**, 31, 189-199. c) T.K. Sawyer, P.J. Sanfilippo, V.J. Hruby, M.H. Ergel, C.B. Heward, C.B. Burnett, M.E. Hadley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, 77, 5754-5758.
- <sup>9</sup> a) V.J. Hruby, S. Fang, R. Knapp, W.M. Kazmierski, G.K. Lui, H.I. Yamamura. *Int. J. Pept. Protein. Res.*, **1990**, 35, 566-573. b) C. Poniolo. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1990**, 35, 287-300.
- <sup>10</sup> a) A. Iakovidis, N. Hadjiliadis. *Inorg. Chim. Acta*, **1989**, 164, 221-229. b) C. Molenaar, J-M. Teuben, R.J. Heetebrij, H.J. Tanke, J. Reedijk. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2000**, 5, 655-665.
- <sup>11</sup> J.E. Byfield, P.M. Calabro Jones. *Nature*, **1981**, 294, 281.
- <sup>12</sup> M. Louloudi, Y. Diligiannakis, N. Hadjiliadis. *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 6847-6851.
- <sup>13</sup> M.S. Egberston, C.F. Homnick, G.D. Hartman. *Synthetic Communications*, **1993**, 23, 5, 703-709.
- <sup>14</sup> E. Pretsch, T. Clerc, J. Sebl, W. Simon. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos., **1995**, Alhambra Longman.
- <sup>15</sup> a) J.P. Macquet, J.L. Butour. *Biochimie*, **1978**, 60, 901. b) V. Brobec, V. Kleinwächter, J.P. Butour, M.P. Johnson. *Biophys. Chem.*, **1990**, 35, 129.

- <sup>16</sup> a) W.C. Johnson, M.S. Itzkowitz, Y. Tinoco. *Biopolymers*, **1972**, 11, 225. b) G. Cervantes, M.J. Prieto, V. Moreno. *Metal Based Drugs*, **1997**, 4, 9.
- <sup>17</sup> X. Riera, A. Caubet, C. López, V. Moreno. *Polyhedron*, **1999**, 18, 2549-2555.
- <sup>18</sup> a) E. Lindauer, E. Holler. *Biochem. Pharm.*, **1996**, 52, 7-14. b) H. Mese, A. Sasaki, R.E. Alcalde, S. Nakayama, T. Matsumura. *Chemotherapy*, **1998**, 44, 414-420.
- <sup>19</sup> a) M.S. Newman, G.T. Colbern, P.K. Working, C. Engbers, M.A. Amantea. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1999**, 43, 1-7. b) G.B. Onoa, V. Moreno, E. Freisinger, B. Lippert. *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, 1.
- <sup>20</sup> a) M.S. Robillard, M. Galanski, W. Zimmermann, B. Keppler, J. Reedijk. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 88, 254-259. b) M.S. Robillard, B.A.J. Jansen, M. Lochner, H. Geneste, Y. Li, J. Brouwer, M. Hesse, J. Reedijk. *Helvetica Chimica Acta*, **2001**, 84, 3023-3030.
- <sup>21</sup> H.O. Davies, D.A. Brown, A.I. Yanousky, K.B. Nolan. *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 268, 313-316.
- <sup>22</sup> a) M. Coluccia, A. Boccarelli, C. Camelli, M. Portondi, G. Natile. *Metal Based Drugs*, **1996**, 2, 249. b) S. Grabner, J. Plavec, N. Bukovec, D. DiLeo, R. Cini, G. Natile. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1998**, 1447-1451.

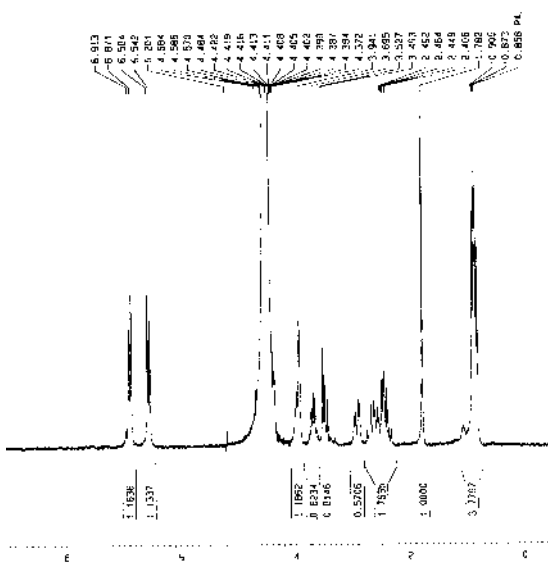
7. MATERIAL SUPLEMENTARI.



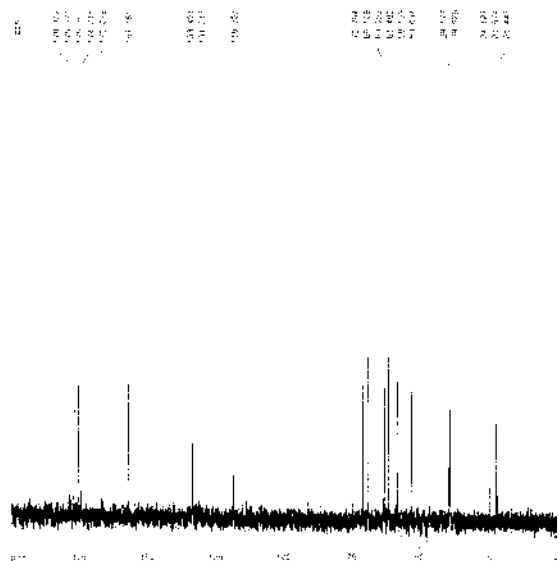
IR



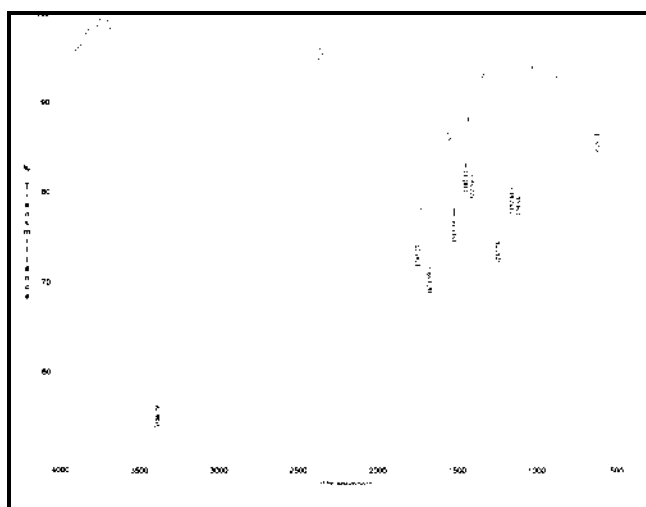
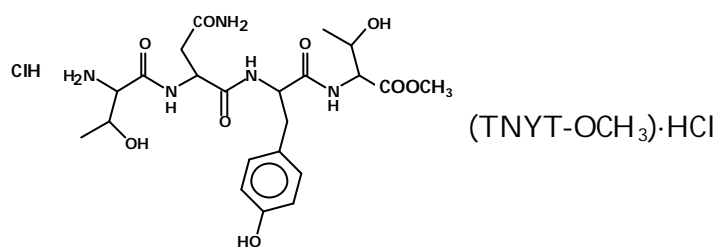
ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O)



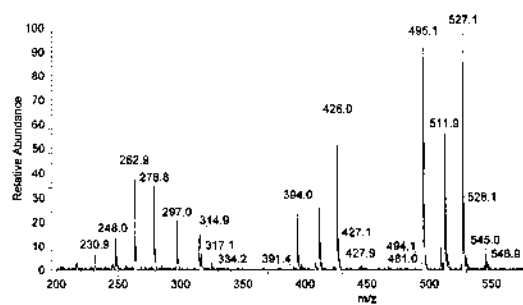
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



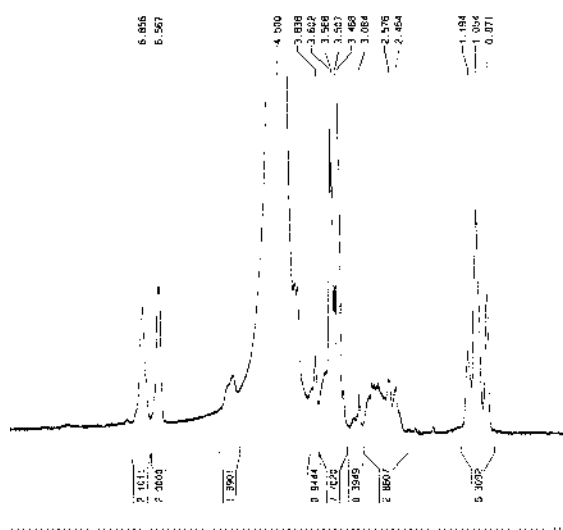
RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O)



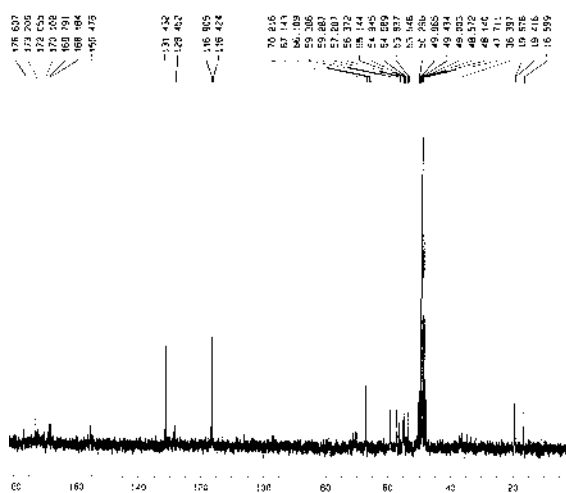
IR



ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O)

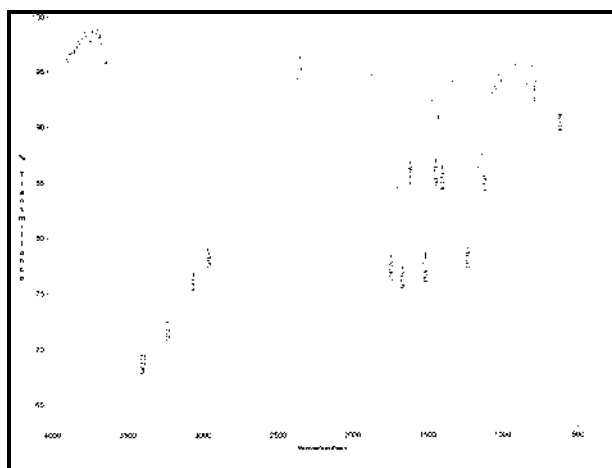
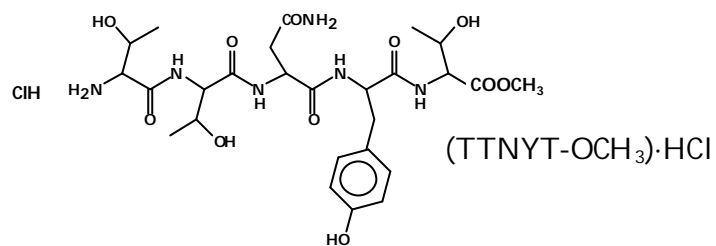


RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)

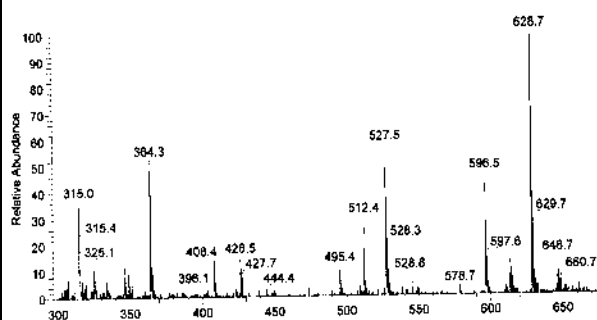


RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O + MeOD)

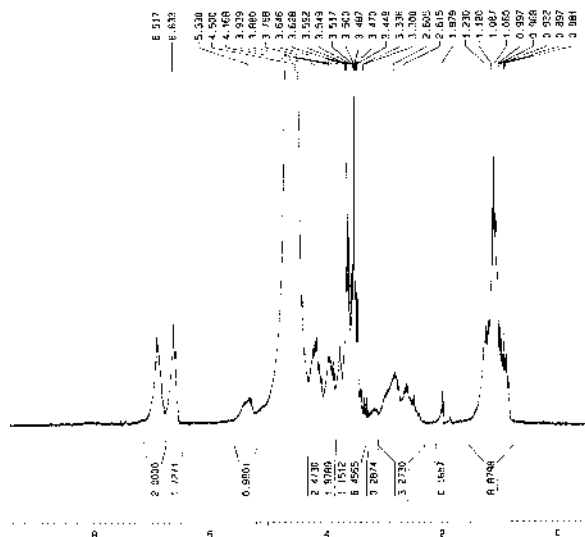




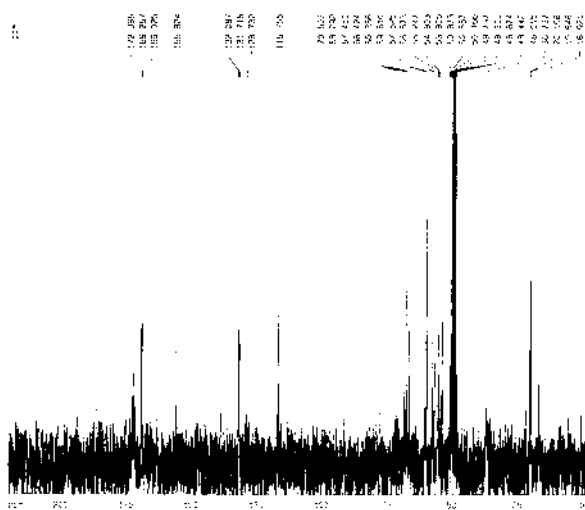
IR



ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O)

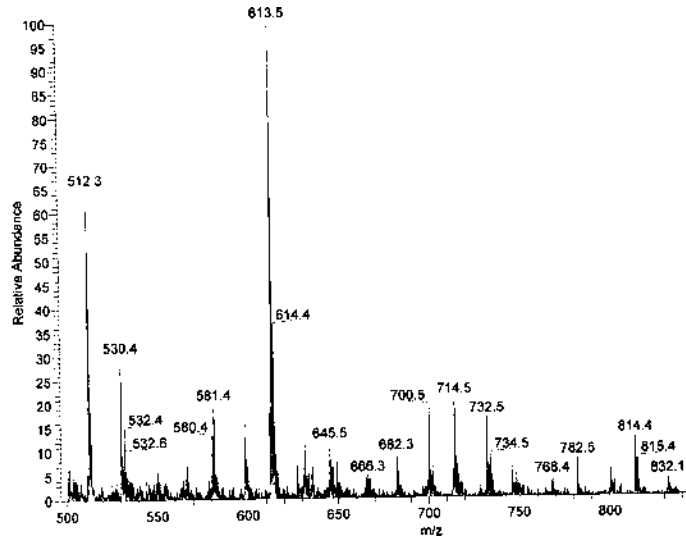
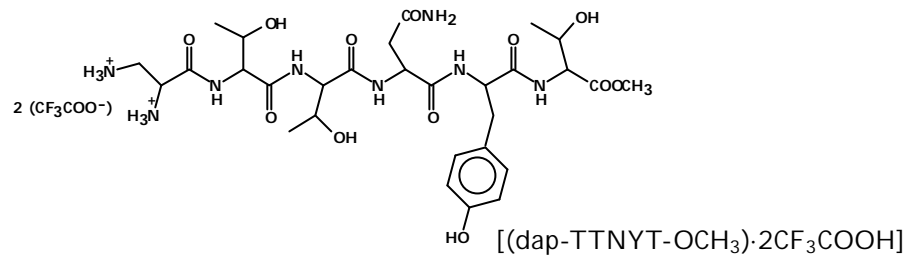


RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)

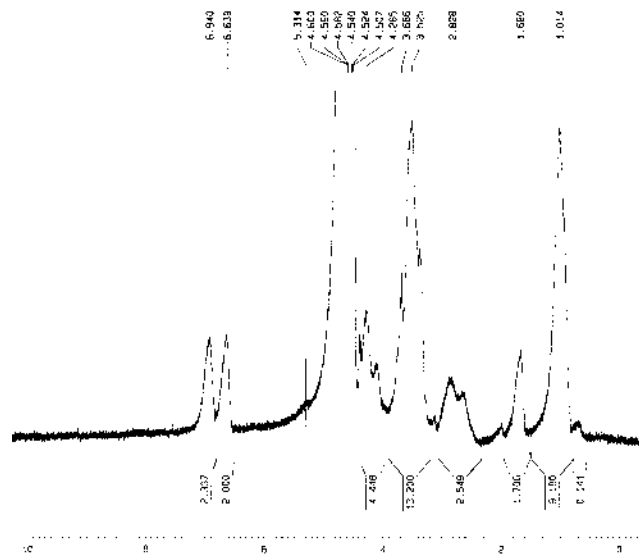


RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O + MeOD)

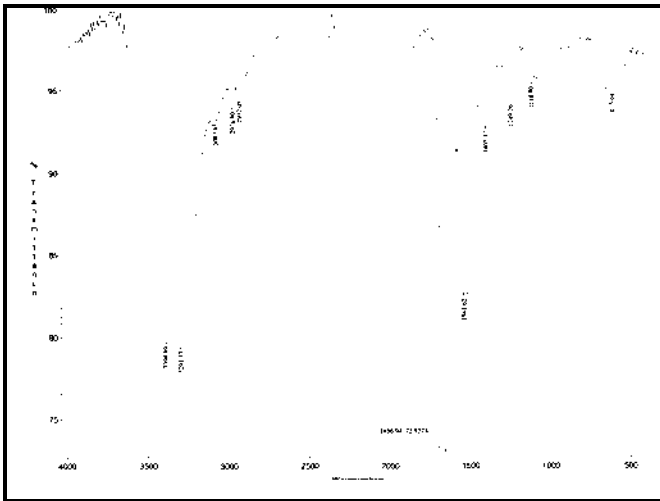
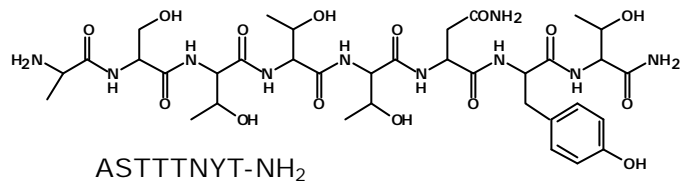




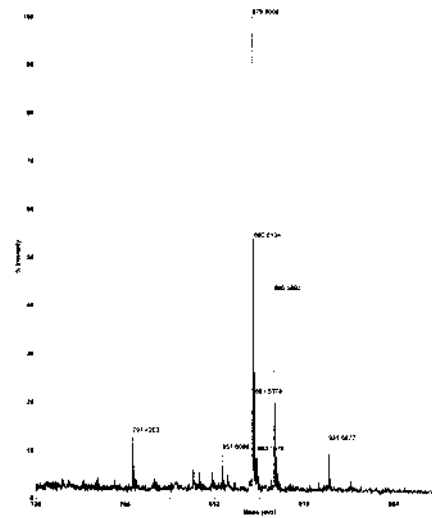
ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O)



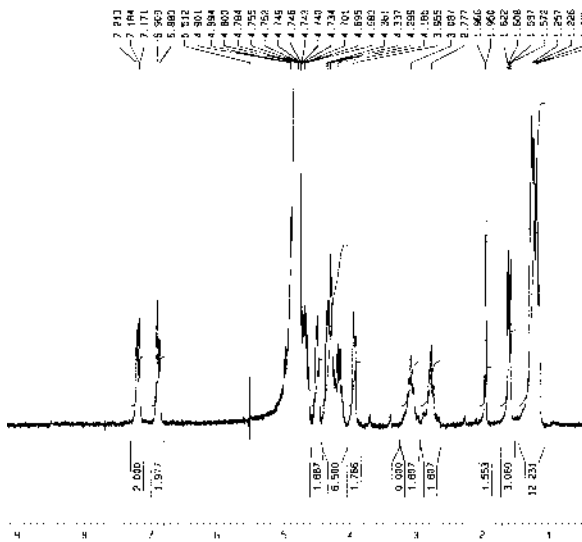
RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



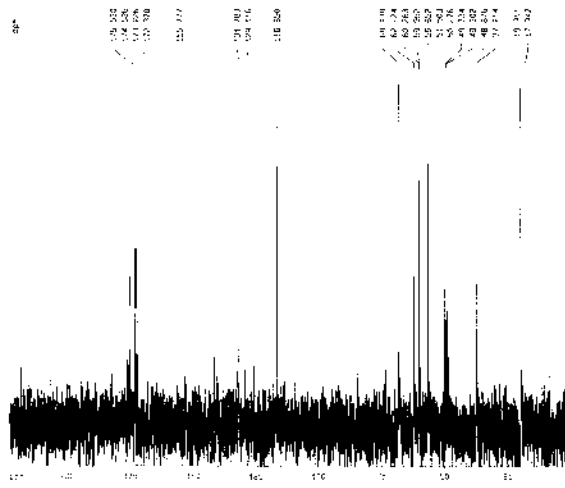
IR



ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O)

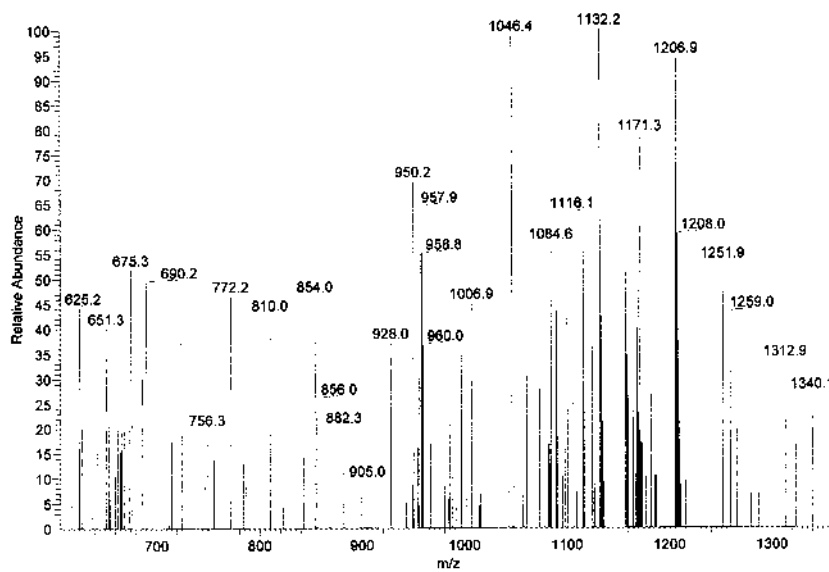
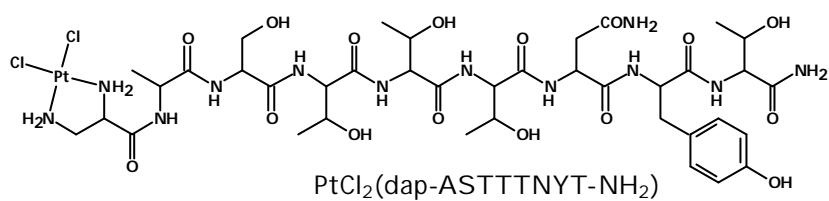


RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)



RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O + MeOD)



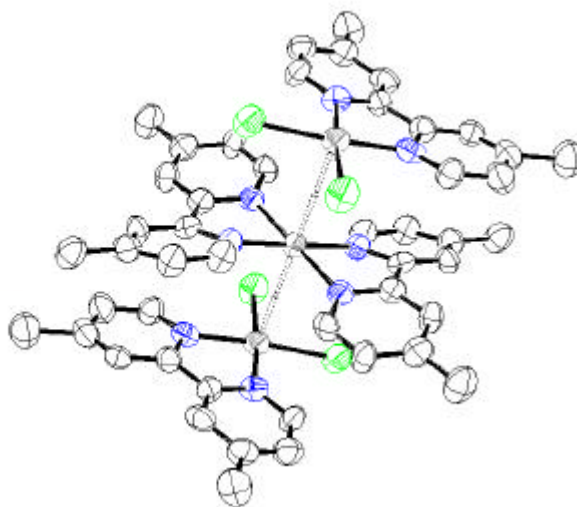


ESI-MS (MeOH/H<sub>2</sub>O)

## CAPÍTOL 6

---

SÍNTESI D'UN NOU COMPLEX TRINUCLEAR DE Pt (II).  
CARACTERITZACIÓ ESPECTROSCÒPICA I ESTRUCTURAL.



**Síntesi d'un nou complex trinuclear de Pt(II). Caracterització espectroscòpica i estructural.**

Í NDEX

1. RESUM	285
2. INTRODUCCIÓ	285
3. EXPERIMENTAL	287
3.1. Material i instrumentació	287
3.2. Síntesi dels complexos	288
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	290
4.1. Síntesi dels complexos	290
4.2. Caracterització espectroscòpica dels complexos	292
4.3. Caracterització estructural per difracció de Raigs-X	296
5. CONCLUSIONS	301
6. REFERÈNCIES	303
7. MATERIAL SUPLEMENTARI	307



## 1. RESUM

En aquest capítol es descriu la síntesi casual d'un complex trinuclear de Pt(II),  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$  essent  $\text{Me}_2\text{Bpy} = 4,4'$ -dimetil-2,2'-dipiridil, el qual presenta una unitat de  $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2]$  en un pla central, i en un pla superior i inferior presenta una unitat  $[\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]$ . L'obtenció d'aquest complex es va produir en l'intent de substituir els lligands clorur del complex  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  per la  $\text{Me}_2\text{Bpy}$  en condicions de reflux.

El complex s'ha pogut caracteritzar per tècniques espectroscòpiques com IR, RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$  i per difracció de raigs X. La resolució de la seva estructura cristal·lina mostra l'existència d'una interacció Pt-Pt intermolecular de l'ordre de 3.474 Å.

## 2. INTRODUCCIÓ

És ben coneguda l'existència d'unions M-M intermoleculars en el rang  $2.7 \text{ \AA} < d < 3.5 \text{ \AA}$ , inferior a la suma de Van der Waals, en estructures cristal·lines de complexos de Pt(II) planoquadrats o altres ions metàl·lics  $d^8$ , tant en estructures dimèriques com en cadenes.<sup>1,2</sup> També hi ha evidències de la presència d'associacions intermoleculars en solució.<sup>3</sup> En tots aquests compostos, la interacció  $d^8-d^8$  no es pot representar com una estructura de Lewis.<sup>4</sup> A més, en el cas de molts dímers coneguts de Pt(II), els dos àtoms metàl·lics estan units per lligands pont.<sup>5,6</sup>

El prototip de les famílies de compostos de tipus cadena està format per les sals de  $[\text{Pt}(\text{CN})_4]^{2-}$ , per les quals les distàncies Pt-Pt són bastant grans (3.3-3.7 Å). En  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ , la distància Pt-Pt és de 4.105 Å i els ions propers sembla que estan units entre ells per interaccions iòniques Cl-K-Cl.<sup>7</sup>

S'ha predit que els models de complexos dimèrics són estables a la dissociació si presenten energies d'enllaç en excés de 3 Kcal/mol i distàncies Pt-Pt entre 3.25 i 3.32 Å.<sup>4</sup> Les interaccions lligand-lligand i els enllaços dèbils M-M són importants per determinar l'estabilitat dels dímers. L'estudi de l'efecte d'addicionar un grup en posició axial suggereix que l'enllaç d'àcids de Lewis (A) i/o bases (B) a l'àtom metàl·lic en posició



axial té l'efecte d'augmentar la fortalesa de l'enllaç M-M segons:  $L_4BM-MBL_4 < L_4BM-ML_4 \approx L_4AM-ML_4 \approx L_4M-ML_4 < L_4M-MAL_4 < L_4BM-MAL_4$ .<sup>4</sup>

El compost de cadena més llarga conegut fins ara és el  **$[Pt_8(NH_3)_{16}(CH_3CONH)_8](NO_3)_{10} \cdot 4H_2O$** , el qual consisteix en quatre unitats dinuclears de cis-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> unides amb dos lligands acetamidat en cada una. En aquest compost l'estat d'oxidació promig del Pt és 2.25, però les separacions Pt-Pt es poden interpretar com una unió d'un tetràmer Pt (2.5) amb dos dímers Pt (2.0).<sup>8</sup>

Les espècies monomèriques de Pt(III) han estat relacionades a intermedis de temps de vida mitja curts en reaccions de substitució de complexos de Pt(IV), entre altres.<sup>9</sup> Fins ara hi havia un consens general de que tots els complexos de Pt(III) aïllats eren compostos de valència mixta Pt(II) i Pt(IV).<sup>10</sup> Avui es coneix al menys un cas ben establert d'un compost mononuclear de Pt(III) aïllat, (NBu<sub>4</sub>)[Pt(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>].<sup>11</sup> Els complexos diamagnètics de diplatí (III) amb enllaços simples Pt-Pt són molt més comuns.<sup>5,6,12,13</sup>

Per altra banda, dues de les classes més importants de lligands són, en general, les polipiridines i les porfirines. En el primer tipus de lligands es pot incloure la 2,2'-bipiridina, 2,2':6',2''-terpiridina, 1,10-fenantrolina, i una gran varietat d'altres homòlegs i derivats benzofusionats.<sup>14,15</sup> Les bipiridines són considerades els lligands de tipus diimina, ja que en una de les seves formes de ressonància presenten la funcionalitat N=C-C=N, les quals quan s'orienten de forma adequada poden coordinar-se de tal manera que formen anells quelats de cinc membres amb un metall adequat.<sup>16</sup> Lippard i els seus col·laboradors han mostrat que els complexos de Pt(II) amb anells heteroaromàtics com la 2,2'-bipiridina i 1,10-fenantrolina s'intercal·len entre els parells de bases del DNA.<sup>17</sup> La càrrega positiva d'aquests complexos de Pt(II) contribueix en la interacció a través d'interaccions electrostàtiques amb les càrregues negatives dels grups fosfat del DNA. Els complexos de Pt(II) tenen una tendència intrínseca a associar-se amb els nucleòtids i nucleòsids en solucions aquoses diluïdes.<sup>18</sup> L'extensió d'aquesta associació depèn del tamany i la densitat electrònica de l'anell que interacciona, a més de l'efecte de les interaccions hidrofòbiques i hidrofíliques en les quals els dissolvents juguen un paper molt important.<sup>19</sup>

Tenint en compte aquests antecedents presentats, en aquest capítol es descriu la síntesi d'un complex trinuclear de Pt(II) amb el lligand 4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil (Me<sub>2</sub>Bpy), format per una unitat de tipus [Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub>] i dues unitats de tipus [PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)] (Figura 1). Els diferents fragments estan units entre si per interaccions Pt-Pt de l'ordre de 3.474 Å, i no a través dels lligands.

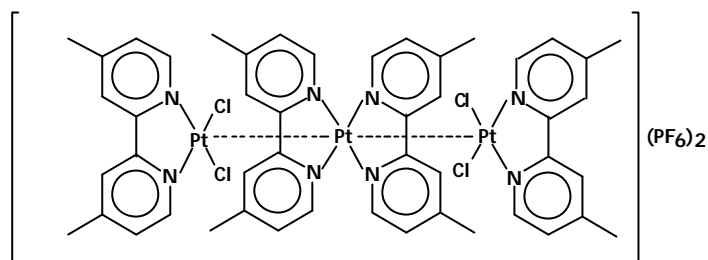


Figura 1. Representació de l'estructura del complex trinuclear de Pt(II)  $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})_2](\text{PF}_6)_2$  sintetitzat.

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIAL I INSTRUMENTACIÓ.

##### 3.1.1. Material

Els reactius comercials han estat emprats sense purificació prèvia: 4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil (Fluka), hexafluorofosfat d'amoni (Fluka), HCl (Aldrich).

La sal K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> ha estat proporcionada per gentilesa de Johnson Matthey.

Els dissolvents de qualitat PS han estat obtinguts de Panreac i SDS.

El nitrogen gas ha estat proporcionat per Abelló-Linde.

##### 3.1.2. Instrumentació

Els espectres IR han estat enregistrats en estat sòlid (pastilla de KBr) en un espectròmetre FT-IR Mattson Satellite en el rang de 400-4000 cm<sup>-1</sup>. Els espectres de RMN-<sup>1</sup>H han estat enregistrats en un espectròmetre Bruker DPX 200 utilitzant CD<sub>3</sub>CN i DMSO-d<sub>6</sub> com a dissolvents. Els anàlisis elementals s'han portat a terme en un microanalitzador Carlo Erba 1108. Els espectres ESI-MS s'han realitzat en un

espectròmetre Navigator Thermo Quest Finigan utilitzant CH<sub>3</sub>CN com a dissolvent. La resolució de l'estructura cristal·lina per difracció de raigs X s'ha portat a terme amb un difractòmetre Bruker SMART equipat amb un monocromador de grafit, amb una radiació de tipus Mo K $\alpha$ . Les estructures han estat resoltes per la tècnica SHELXS-97 i el refinament en F<sup>2</sup> per la tècnica SHELXL-97 (G.M. Sheldrick, programa pel refinament d'estructures cristal·lines. Universitat de Göttingen, Göttingen, Alemanya, 1997). Els dibuixos estructurals i càlculs geomètrics s'han realitzat amb un Bruker SHELXTL.

### 3.2. SÍNTESI DELS COMPLEXOS

#### 3.2.1. Síntesi del complex {[Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub>][PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)]<sub>2</sub>}(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.

S'addicionen 0.022 gr de Me<sub>2</sub>Bpy (0.118 mmols) sobre 10 mL d'una suspensió del complex PtCl<sub>2</sub>(Hdab) en EtOH/H<sub>2</sub>O (3:1) (0.050 gr, 0.13 mmols). La barreja resultant s'escalfa a reflux durant 24 h, obtenint-se finalment una dissolució de color taronja, la qual es filtra en calent. Sobre la dissolució filtrada s'afegeix una dissolució aquosa saturada de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> fins a observar la formació d'un precipitat taronja clar. El precipitat obtingut es filtra i es renta amb aigua i éter dietílic.

La reacció de formació del complex es segueix per cromatografia de capa prima en alumina, utilitzant com a fase mòbil una mescla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexà (2:1).

Per l'obtenció dels cristalls del complex, es dissol una quantitat de producte compresa entre 5-10 mg en acetona i la dissolució resultant es deixa en difusió amb éter. Passats diversos dies, s'observa la formació d'uns cristalls de color taronja intens.

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3145 b.a. (st. CH arom), 2800-3000 b.a. (st. CH), 1669 (st. C=N), 1622 (st. C<sub>arom</sub>-C), 1401 b.a. (st. C<sub>arom</sub>-C,  $\delta_{as}$  -CH<sub>3</sub>,  $\delta_{si}$  -CH<sub>3</sub>), 837 (st. P-F,  $\delta$  oop C<sub>arom</sub>-H).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO d<sub>6</sub>, 300K):**  $\delta$  (ppm) = 2.403 (s, 12H, C-CH<sub>3</sub> [PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)]), 2.626 (s, 12H, C-CH<sub>3</sub> [Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)]), 7.25 (s.a., 4H, CH<sub>5,5'</sub> [PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)]), 7.78 (s.a. 4H, CH<sub>5,5'</sub> [Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub>]), 8.21 (s.a., 4H, CH<sub>3,3'</sub> [PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)]), 8.50 (s.a. 4H, CH<sub>3,3'</sub> [PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)]), 8.52 (s.a., 4H, CH<sub>6,6'</sub> [PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)]), 8.61 (s.a., 4H, CH<sub>6,6'</sub> [PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)]).

3.2.2. Cis-diclor-(4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil)platí (II). [PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)].

La síntesi del complex s'ha realitzat de la mateixa manera que el mètode descrit per E.Bielli et al.<sup>20</sup>

**Rendiment:** 83%

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3073 b.a. (st. CH arom.), 2920 b.a. (st CH), 1619 (st. C=N, st. C=C), 1482 (st. C<sub>ar</sub>-C,  $\delta_{as}$ -CH<sub>3</sub>), 1447 ( $\delta_{si}$ -CH<sub>3</sub>,  $\delta_{as}$ -CH<sub>3</sub>), 835 ( $\delta$  oop C<sub>ar</sub>-H).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN, 300 K):**  $\delta$  (ppm)= 2.54 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 7.55 (s.a., 2H, CH<sub>5,5'</sub>), 8.10 (s, 2H, CH<sub>3,3'</sub>), 9.45 (d, 2H, CH<sub>6,6'</sub>, J= 6.2 Hz).

**A.E.:** 5.94 %N, 32.18 %C, 2.83 %H. Calculat per PtCl<sub>2</sub>C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub> (Mm= 450.22 gr/mol): 6.22 %N, 32.01 %C, 2.69 %H.

**ESI -MS (CH<sub>3</sub>CN) :** [M-Cl+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup>= 455.9 m/z.

3.2.3. Cis-bis-(4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil)platí(II) di(hexafluorofosfat). [Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.

Sobre 50 mL d'una suspensió aquosa de PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy) (0.100 gr, 0.222 mmols) s'addicionen 0.04 gr de 4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil (0.217 mmols). La barreja s'escalfa a reflux fins a l'obtenció d'una solució homogènia. Es filtra la solució en calent, i en el filtrat s'hi addiciona una solució saturada de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> fins a l'obtenció d'un precipitat groc pàlid. Es filtra el producte i es renta amb aigua i éter dietílic.

**Rendiment:** 0.127 gr (0.149 mmols), 67.30 %

**IR (KBr):**  $\nu^{-1}$  (cm<sup>-1</sup>)= 3142-3091 (st. CH arom.), 2968 b.a. (st CH), 1624 (st. C=N, st. C=C), 1489 (st. C<sub>ar</sub>-C,  $\delta_{as}$ -CH<sub>3</sub>), 1448 ( $\delta_{si}$ -CH<sub>3</sub>,  $\delta_{as}$ -CH<sub>3</sub>), 833 ( $\delta$  oop C<sub>ar</sub>-H, st. P-F).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN, 300 K):**  $\delta$  (ppm)= 2.73 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 7.79 (d, 2H, CH<sub>5,5'</sub> J=5.8 Hz), 8.32 (s, 2H, CH<sub>3,3'</sub>), 8.69 (d, 2H, CH<sub>6,6'</sub>, J= 6 Hz).

**A.E.:** 6.42 %N, 33.92 %C, 3.19 %H. Calculat per PtCl<sub>2</sub>C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>P<sub>2</sub>F<sub>6</sub> (Mm= 853.49 gr/mol): 6.56 %N, 33.77 %C, 2.83 %H.

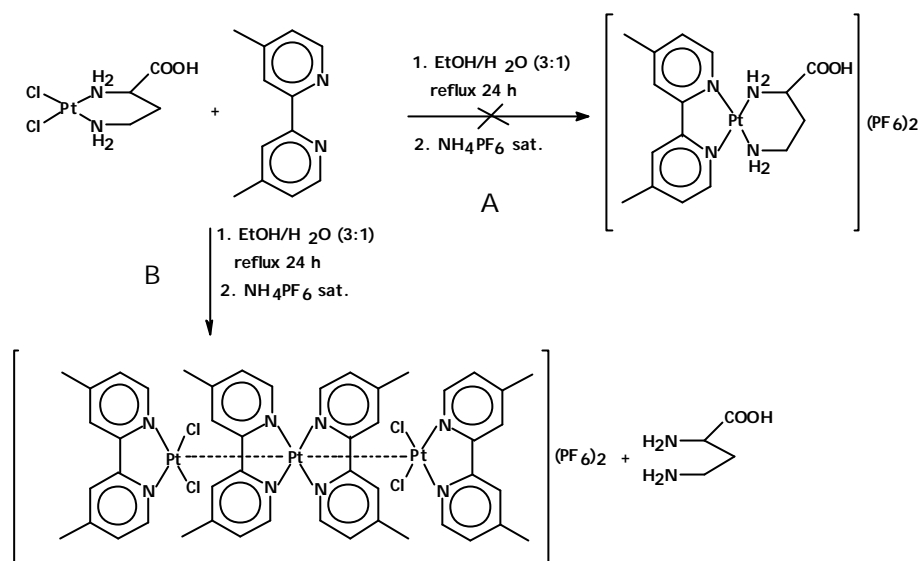
**ESI -MS (CH<sub>3</sub>CN) :** [M-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>= 708.7 m/z.

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.

### 4.1. SÍNTESI DEL COMPLEX $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]\}(\text{PF}_6)_2$ .

Seguint el mètode descrit per Wu et al.<sup>16</sup> i amb la finalitat de substituir els lligands clorur del complex  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  (la síntesi del qual s'ha presentat en el capítol 3) per un lligand diaminoquelatant d'estructura plana, com la 4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil ( $\text{Me}_2\text{Bpy}$ ), s'ha escalfat a reflux una suspensió formada pel lligand  $\text{Me}_2\text{Bpy}$  i el complex  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$ , tal i com es mostra en l'Esquema 1A. El complex que s'hauria de formar presentaria càrrega positiva, de manera que es mantindria solubilitzat en el medi. Per tal de precipitar-lo i aïllar-lo del medi aquós s'addiciona un ió voluminos,  $\text{PF}_6^-$ , el qual té la propietat de formar compostos insolubles en aigua. Al caracteritzar el complex obtingut a través de les tècniques espectroscòpiques IR i RMN- $^1\text{H}$ , s'ha pogut comprovar que el compost obtingut no presenta cap senyal característic del lligand Hdab. Aquests resultats han permès concloure que el producte sintetitzat no ha estat el desitjat.

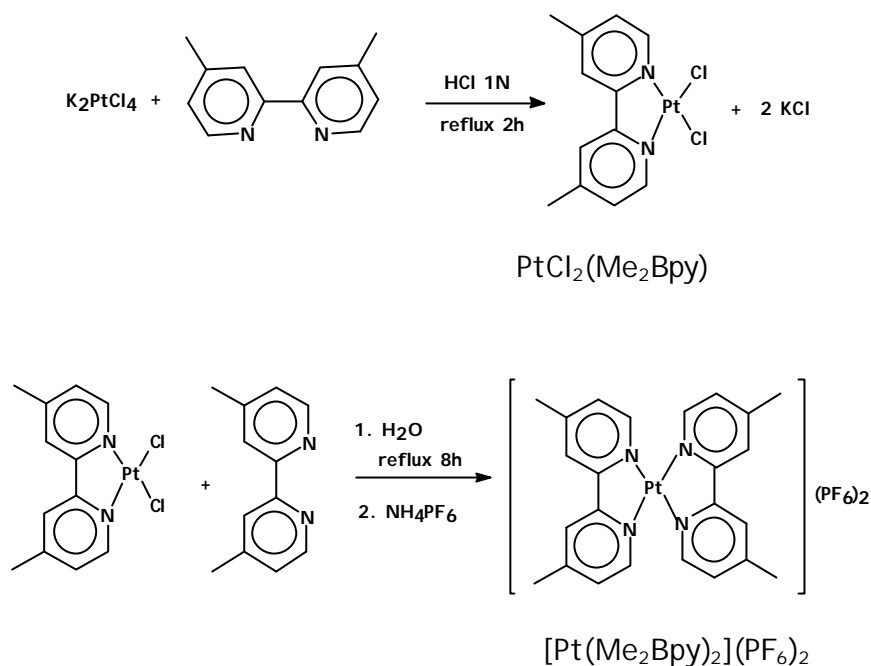
Gràcies a l'obtenció de cristalls adequats per la difracció de raigs-X s'ha pogut resoldre l'estructura cristal·lina del complex aïllat. Aquest consisteix en un compost trinuclear de Pt(II) format per una unitat de  $\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2$  i dues unitats de  $\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$ , les quals es mantenen unides a través d'interaccions intermoleculars Pt-Pt (Esquema 1B).



**Esquema 1.** Esquema de la reacció que té lloc en la formació del complex trinuclear de Pt(II).

Per tant, en les condicions de reflux emprades, el lligand Hdab és desplaçat per la Me<sub>2</sub>Bpy formant-se el complex [PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)], el qual en presència de Me<sub>2</sub>Bpy lliure té la capacitat de reaccionar formant-se [Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub>],<sup>20</sup> en comptes de desplaçar-se els lligands clorur. Aquest fenomen es pot atribuir a la protonació dels grups amina del lligand diaminoquelatant Hdab degut a les condicions del medi de reacció, provocant que l'enllaç Pt-N es debiliti, ja que el nitrogen es queda sense electrons disponibles per enllaçar-se amb el platí.

Per tal de comparar les similituds i diferències del complex trinuclear de Pt(II) amb les seves unitats constitutives per separat, s'ha realitzat la síntesi del complex PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy) a través del mètode ja descrit per Bielli et al.,<sup>20</sup> i la síntesi del complex [Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>. El complex PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy) es sintetitza en condicions de reflux i en medi àcid a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> i Me<sub>2</sub>Bpy en quantitats equimolars. El complex [Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> es forma a partir de PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy) en presència de lligand Me<sub>2</sub>Bpy lliure i a reflux (Esquema 2). Aquestes condicions de síntesi explicarien la formació del complex trinuclear de Pt(II), ja que són molt similars a les condicions emprades.



Esquema 2. Reaccions de síntesi dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$  i  $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2](\text{PF}_6)_2$ .

#### 4.2. CARACTERITZACIÓ ESPECTROSCÒPICA DELS COMPLEXOS.

**Espectroscopia IR.** S'ha enregistrat l'espectre IR del complex  $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})_2](\text{PF}_6)_2$ , el qual es mostra en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 307), i s'ha comparat amb els espectres enregistrats dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$  i  $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2](\text{PF}_6)_2$ . Les principals bandes d'absorció es mostren en la Taula 1.

Vibracions	$\text{CH}_{\text{arom}} (\text{t})$	$\text{CH}_{\text{alif}} (\text{t})$	$\text{C}=\text{N} (\text{t})$	$\text{C}_{\text{arom}}-\text{C} (\text{t})$	$d_{\text{as}} \text{CH}_3$ $d_{\text{si}} \text{CH}_3$	$d_{\text{oop}} \text{C}_{\text{arom}}-\text{H}$	$\text{P}-\text{F} (\text{t})$
Tri-Pt	3145 ba.	3000-2800	1669	1622 1401	1401 b.a.	837	837
$\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$	3073 b.a.	2920 b.a.	1619	1619 1482	1447 b.a.	835	
$\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2$	3142-3091	2968 b.a.	1624	1624 1489	1448 b.a.	833	833

Taula 1. Principals bandes d'absorció de IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) dels complexos sintetitzats. (t)= tensió o stretching, (b.a.)=banda ampla, tri-Pt= $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})_2](\text{PF}_6)_2$ .

Les diferents assignacions dels senyals s'han realitzat a través de les dades bibliogràfiques.<sup>21,22</sup> Com es pot observar a través de les dades presentades, en la zona

compresa entre 2800 i 3200  $\text{cm}^{-1}$  apareix, en tots tres complexos, una banda molt ampla i poc estructurada que correspon al solapament de les bandes de vibració st.  $\text{CH}_{\text{arom}}$  (3100-3200  $\text{cm}^{-1}$ ) i del st. CH dels grups metílics (2800-2950  $\text{cm}^{-1}$ ). En el rang 1600-1670  $\text{cm}^{-1}$  apareixen les bandes corresponents al st. C=N i st  $\text{C}_{\text{arom.}}-\text{C}$ , que en el cas del complex  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$ , apareixen solapades donant lloc a una banda molt ampla, mentre que en els altres dos complexos les dues bandes apareixen solapades donant lloc a una banda menys ampla i molt intensa. La banda molt intensa que apareix a 835  $\text{cm}^{-1}$  aproximadament en els complexos  $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2](\text{PF}_6)_2$  i  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$  correspon a la vibració st. P-F del contraió  $\text{PF}_6^-$ . En la mateixa zona també apareix la banda corresponent a la vibració  $\delta_{\text{oop}} \text{C}_{\text{arom}}-\text{H}$ .

En l'interval de freqüències estudiat (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) no s'observen les vibracions de tensió  $\nu(\text{M}-\text{N})$  ni les vibracions  $\nu(\text{M}-\text{Cl})$  ja que aquestes apareixen generalment entre 400-200  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>22</sup>

**Espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H.** S'ha enregistrat l'espectre de RMN-<sup>1</sup>H del complex  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$  utilitzant DMSO- $d_6$  com a dissolvent, i es mostra en l'apartat de *material suplementari* d'aquest capítol (Apartat 7, pàg. 307). L'espectre de RMN-<sup>1</sup>H d'aquest compost s'ha comparat amb l'espectre dels complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$  i  $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2](\text{PF}_6)_2$ . Els desplaçaments químics (ppm) de protó es presenten en la Taula 2.

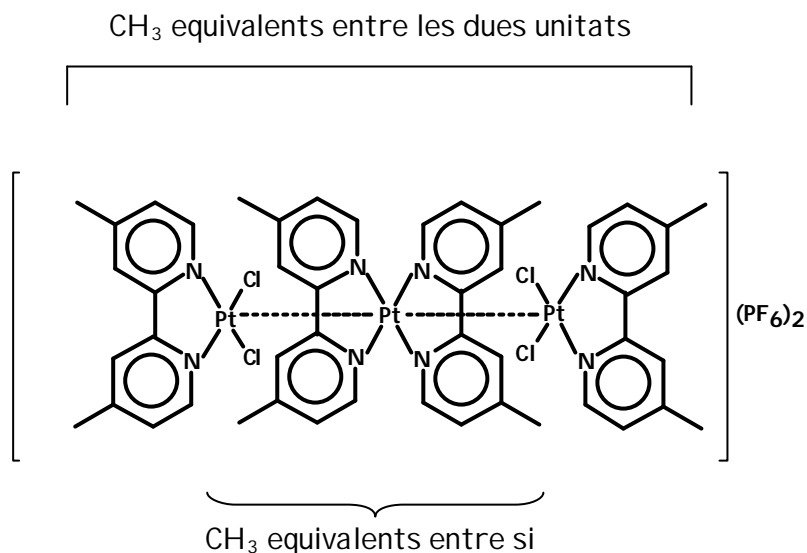
RMN- <sup>1</sup> H d (ppm)	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_{5,5'}$	$\text{CH}_{3,3'}$	$\text{CH}_{6,6}$
Tri-Pt (DMSO)	2.40 s	7.25 s.a.	8.21 s.a.	8.52 s.a.
	2.62 s	7.78 s.a.	8.50 s.a.	8.61 s.a.
$\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$ ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )	2.54 s	7.55 s.a	8.10 s	9.45 d
$\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2$ ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )	2.73 s	7.79 d	8.32 s	8.69 d

Taula 2. Desplaçaments químics de protó (ppm) dels complexos sintetitzats. (s)= singlet, (d)= doblet, (s.a.)= senyal ample, tri-Pt=  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$ .

Com es pot observar en les dades de RMN-<sup>1</sup>H del complex  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$ , en la zona compresa entre 2.4 i 2.6 ppm apareixen dos singlets corresponents als protons metílics. Un pertany al  $\text{CH}_3$  del fragment



Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub> i l'altre al fragment PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy). Els protons metílics de la unitat Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub> són equivalents ja que presenten un mateix entorn electrònic (Figura 2), dos clorurs i un lligand Me<sub>2</sub>Bpy en el pla superior o inferior, i un lligand Me<sub>2</sub>Bpy en el mateix pla.



**Figura 2.** Representació del complex  $\{[Pt(Me_2Bpy)][PtCl_2(Me_2Bpy)]_2\}(PF_6)_2$  indicant les equivalències dels protons metílics.

Els protons metílics dels fragments PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy) també presenten una mateixa equivalència entre ells ja que en un mateix pla tenen la influència dels lligands clorur, i en un pla inferior o superior presenten un grup Pt-Me<sub>2</sub>Bpy (Figura 2).

Els protons aromàtics apareixen en la zona compresa entre 7 i 10 ppm (Figura 3) com a dos grups de tres senyals: un grup de tres senyals pertanyents a les dues unitats PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy) i un segon grup de tres senyals que corresponen a la unitat Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub>.

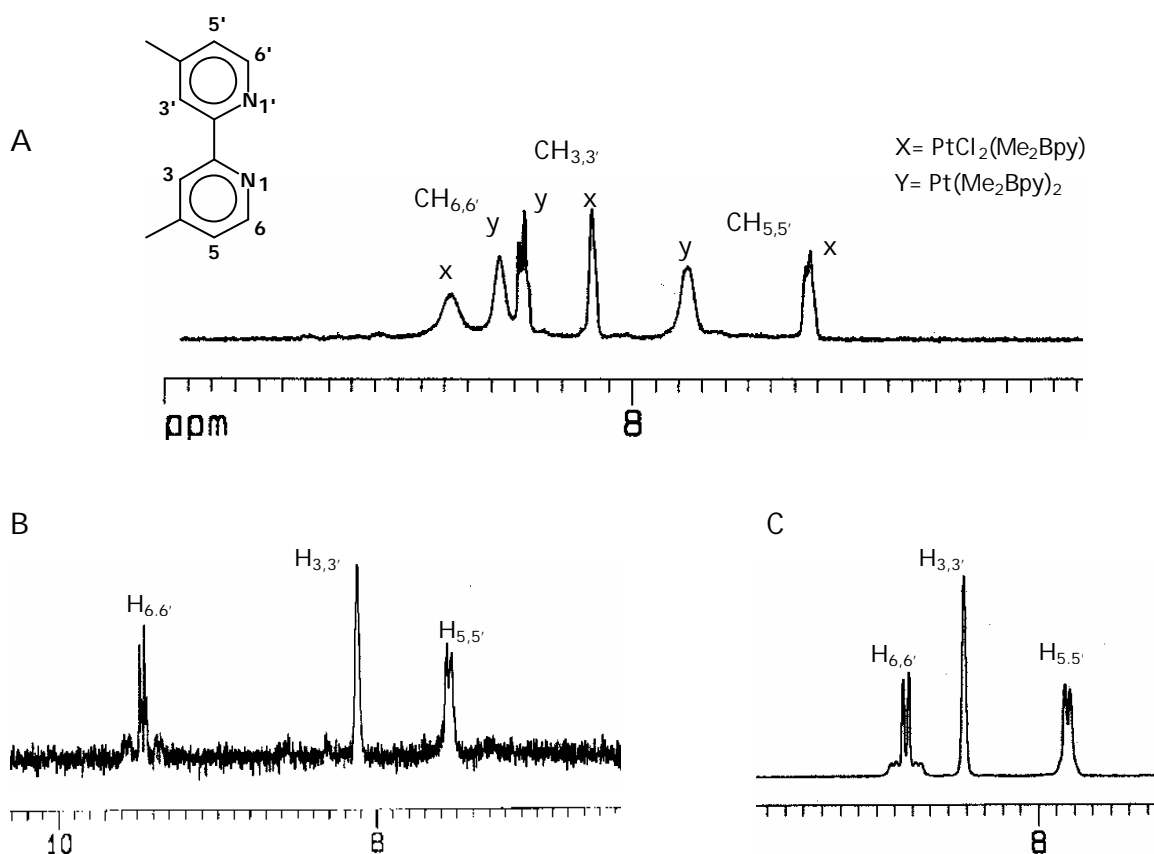


Figura 3. Part aromàtica dels espectres de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  dels complexos  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$  (A),  $\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$  (B) i  $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2](\text{PF}_6)_2$  (C).

Els protons  $\text{H}_5$  i  $\text{H}_6$  estan situats en carbonis adjacents en l'anell de bipyridina, de manera que s'acoblen entre si donant lloc a un doblet cada un i amb unes constants d'acoblament de l'ordre de 6 Hz. En l'espectre del complex trinuclear de Pt(II), aquests senyals apareixen amples i amb poca resolució. Els protons  $\text{H}_6$  són els que apareixen a desplaçament químic més alt, perquè estan més propers a l'àtom de nitrogen de l'anell i es troben més desapantellats.

En general, els desplaçaments químics dels senyals de protó de  $\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2$  apareixen a valors més alts que els senyals equivalents en  $\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$ . Aquest fenomen s'atribueix a la càrrega del complex. El  $\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2$  presenta menys densitat electrònica que el complex diclorur, de manera que els nuclis de protó es troben més desapantellats i com a conseqüència augmenta el valor del desplaçament químic.

Els desplaçaments químics dels senyals en el complex trinuclear de Pt(II) difereixen lleugerament dels desplaçaments de protó de les seves unitats constitutives, degut a que cada part no està aïllada, sinó que rep la influència de l'entorn. També cal tenir en compte que els dissovents emprats no són iguals, degut a la diferent solubilització dels compostos.

#### 4.3. CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL PER DIFRACCIÓ DE RAIGS-X.

L'obtenció de cristalls del complex trinuclear de Pt(II) adequats per la difracció de raigs-X ha permès resoldre la seva estructura cristal·lina i s'ha pogut comparar les dades cristal·logràfiques amb les dades presentades per Connick i col·laboradors<sup>23</sup> sobre l'estructura cristal·lina de PtCl<sub>2</sub>(Bpy).

El complex trinuclear de Pt(II), {[Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)][PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)]<sub>2</sub>}(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, cristal·litza segons un sistema monoclínic i un grup espacial P2(1)/n amb Z=4, formant cristalls prismàtics de color taronja. Les principals dades cristal·logràfiques es mostren en la Taula 3, i les principals distàncies d'enllaç i angles d'enllaç es presenten en la Taula 4 i Taula 5 respectivament.

Com es pot observar en el diagrama ORTEP de l'estructura, Figura 4, el complex està format per una unitat central [Pt(Me<sub>2</sub>Bpy)<sub>2</sub>], i dues unitats PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy) disposades en la part superior i inferior i en posició alternada. Aquestes tres unitats estan situades de forma quasi paral·lela (angle N2-Pt1-Pt2= 89.6°, angle N1-Pt1-Pt2=95.6°) al llarg de la xarxa cristal·lina (Figura 5). En la Figura 6 es mostra la xarxa cristal·lina sense incloure els lligands Me<sub>2</sub>Bpy, i es pot veure com les unitats constitutives del cristall sempre es troben agrupades de tres en tres amb la mateixa disposició espacial.

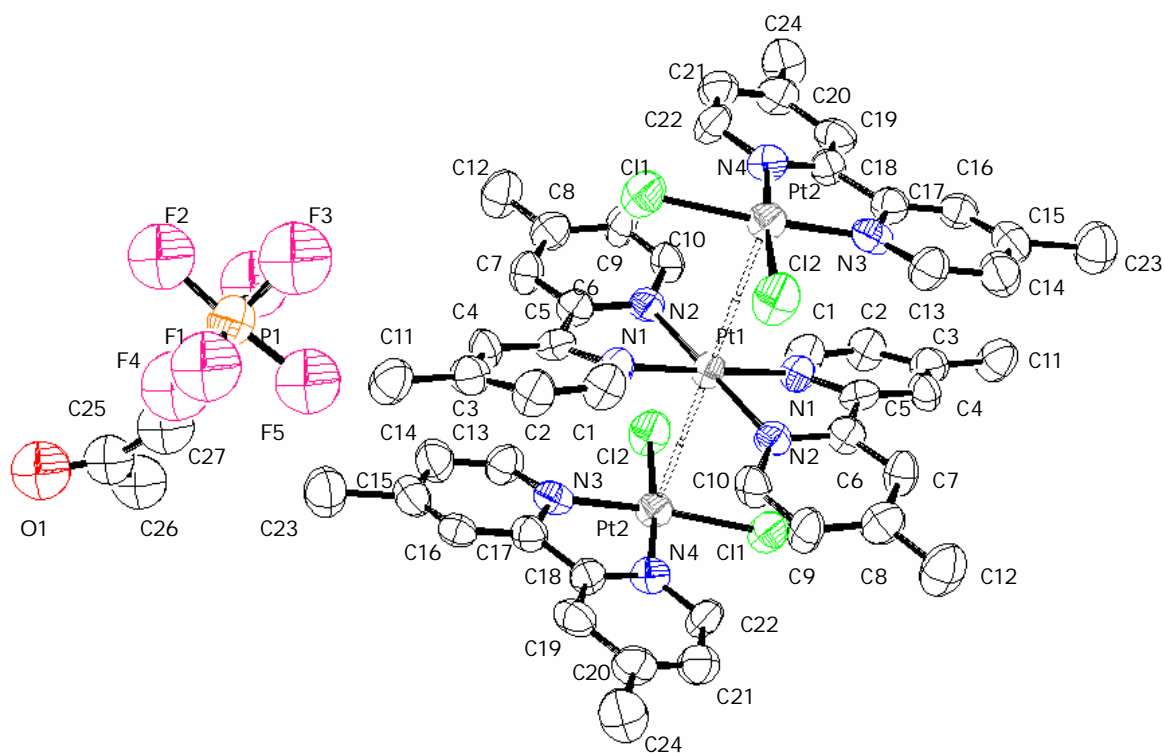


Figura 4. Diagrama ORTEP de l'estructura cristal·lina del complex trinuclear  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$ .

<i>Dades Cristal·logràfiques</i>	
Fòrmula empírica	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{F}_6\text{N}_4\text{OPPt}_{1.5}$
Pes fòrmula, gr/mol	935.06
Sistema cristal·lí, grup espacial	Sistema monoclínic, $P2(1)/n$
a, Å	8.8821(6)
b, Å	12.2768(9)
c, Å	29.030(2)
$\alpha, \beta, \gamma$ deg	90.00, 97.235(2), 90.00
Volum, Å <sup>3</sup>	3140.3
Unitats fòrmula/cel·la	4
Temperatura, K	296
$\lambda$ (MoK $\alpha$ ) Å	0.71073
$\rho_{\text{calc.}}$ , gr/cm <sup>3</sup>	1.978
$\mu$ , mm <sup>-1</sup>	6.969
R <sup>a</sup>	0.06221
R <sub>w</sub> <sup>b</sup>	0.1594

Taula 3. Principals dades cristal·logràfiques i paràmetres de refinament de l'estructura del complex  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$ .

Es defineixen  $R^a$  i  $R_w^b$  com:

$$R^a = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$$

$$R_w^b = [\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2]]^{1/2}$$

<i>Distàncies d'enllaç (Å)</i>					
Pt1-N2	2.013	C9-C10	1.402	C19-C20	1.442
Pt1-N1	2.022	Pt2-N3	1.988	C20-C21	1.356
Pt1-Pt2	3.474	Pt2-N4	1.996	C20-C24	1.509
N1-C1	1.331	Pt2-C12	2.291	C21-C22	1.371
N1-C5	1.377	Pt2-C11	2.295	P1-F6	1.457
N2-C10	1.338	N3-C13	1.346	P1-F3	1.498
N2-C6	1.373	N3-C17	1.399	P1-F2	1.526
C1-C2	1.361	N4-C18	1.338	P1-F5	1.562
C2-C3	1.410	N4-C22	1.348	P1-F4	1.550
C3-C4	1.376	C13-C14	1.368	P1-F1	1.557
C3-C11	1.488	C14-C15	1.378	F3-F4	1.974
C4-C5	1.369	C15-C16	1.307	O1-C25	1.214
C5-C6	1.477	C15-C23	1.624	C25-C27	1.480
C6-C7	1.375	C16-C17	1.363	C25-C26	1.480
C8-C9	1.377	C17-C18	1.484		
C8-C12	1.501	C18-C19	1.364		

Taula 4. Principals distàncies d'enllaç en Å de l'estructura del complex trinuclear de Pt(II) sintetitzat.

<i>Angles d'enllaç (graus)</i>					
N2-Pt1-N2	180.0	N3-Pt2-C11	175.6	F3-P1-F2	89.0
N2-Pt1-N1	101.2	N4-Pt2-C11	95.8	F6-P1-F5	90.1
N1-Pt1-N1	180.0	C12-Pt2-C11	89.66	F3-P1-F5	84.7
N2-Pt1-Pt2	89.6	N3-Pt2-Pt1	92.5	F2-P1-F5	173.1
N1-Pt1-Pt2	95.6	N4-Pt2-Pt1	89.0	F6-P1-F4	96.2
Pt2-Pt1-Pt2	180.0	C12-Pt2-Pt1	89.1	F3-P1-F4	80.7
C1-N1-C5	115.6	C11-Pt2-Pt1	90.2	F2-P1-F4	93.1
C1-N1-Pt1	129.8	C13-N3-C17	116.2	F5-P1-F4	88.8
C5-N1-Pt1	114.5	C13-N3-Pt2	128	F6-P1-F1	80.9
C10-N2-C6	117.0	C17-N3-Pt2	115.6	F3-P1-F1	102.0
C10-N2-Pt1	127.8	C18-N4-C22	116.9	F2-P1-F1	89.2
C6-N2-Pt1	115.2	C18-N4-Pt2	116.1	F5-P1-F1	89.2
N1-C1-C2	124.8	C22-N4-Pt2	126.9	F4-P1-F1	176.5
N1-C5-C4	122.4	N3-C13-C14	124.1	P1-F3-F4	50.8
N1-C5-C6	113.0	C16-C17-N3	120.4	P1-F4-F3	48.5
C7-C6-N2	122.7	N3-C17-C18	112.2	O1-C25-C27	120.2
N2-C6-C5	113.4	N4-C18-C19	124.0	O1-C25-C26	122.4
N2-C10-C9	122.9	N4-C18-C17	114.9		
N3-Pt2-N4	80.7	N4-C22-C21	123.2		
N3-Pt2-C12	93.9	F6-P1-F3	174.0		
N4-Pt2-C12	174.2	F6-P1-F2	96.3		

Taula 5. Angles d'enllaç de l'estructura cristal·lina del complex trinuclear de Pt(II) sintetitzat.

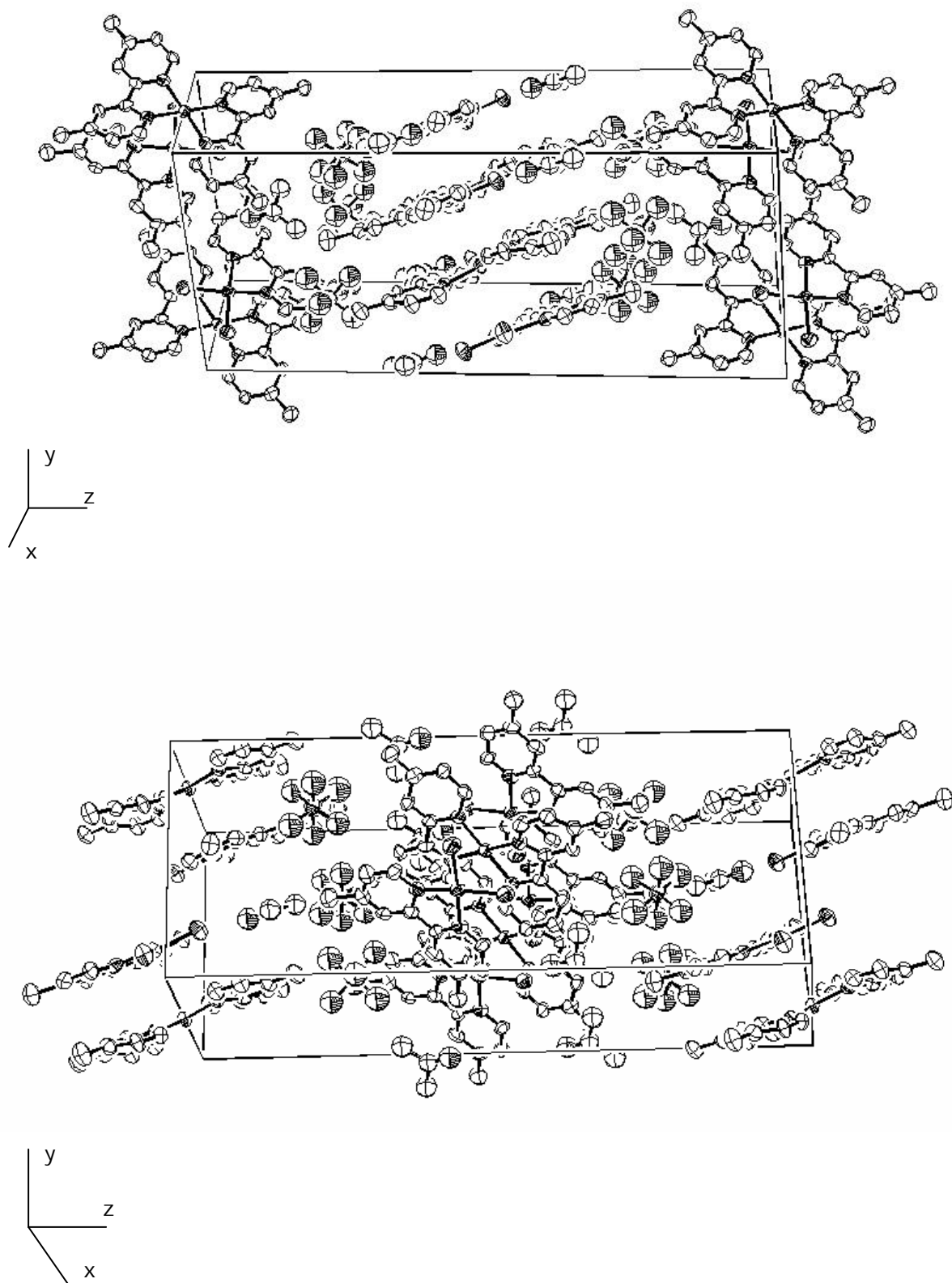


Figura 5. Xarxa cristal·lina del complex trinuclear  $\{[Pt(Me_2Bpy)][PtCl_2(Me_2Bpy)]_2\}(PF_6)_2$ .

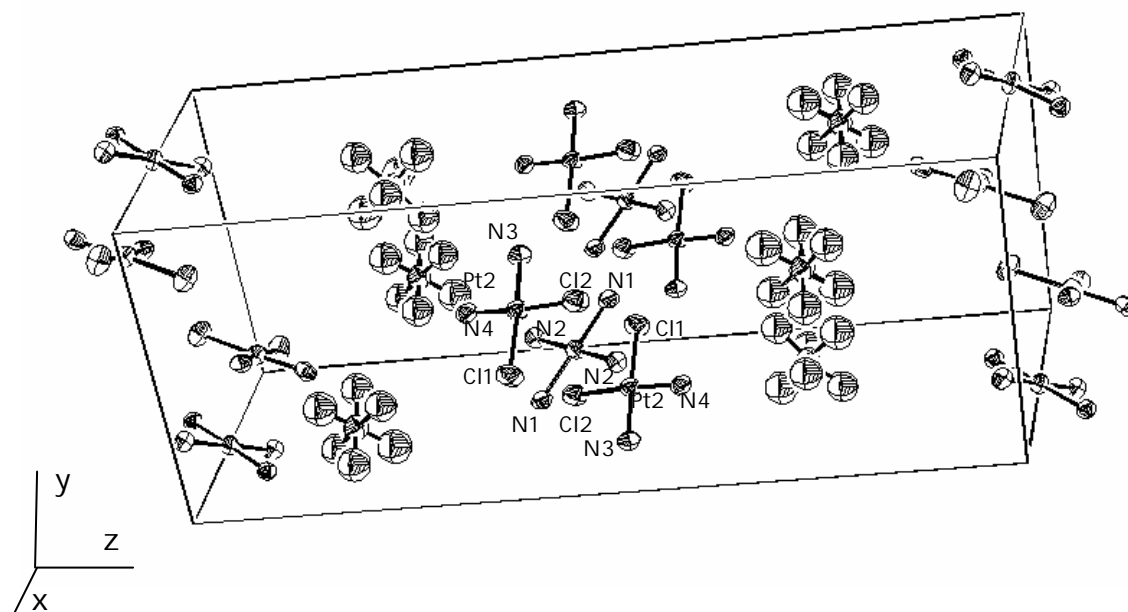


Figura 6. Xarxa cristal·lina del complex  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$  on s'han exclòs els lligands  $\text{Me}_2\text{Bpy}$  per observar millor la disposició de cada unitat constitutiva.

Les dues unitats constitutives de l'estructura trinuclear de Pt(II) estan unides entre si a través d'interaccions intermoleculars Pt-Pt de 3.474 Å, i no existeixen unions a través dels lligands ja que aquests no actuen de pont. La interacció Pt-Pt es troba dins el rang esperat d'unions M-M pels complexos de Pt(II),  $2.7 < d < 3.5$  Å inferior a la suma de Van der Waals.<sup>4,24,25</sup>

Existeixen diversos complexos dinuclears de Pt units per lligands pont on la distància Pt-Pt és molt similar a la del complex trinuclear sintetitzat de l'ordre de 3.440 Å, i molts complexos mononuclears de Pt estan disposats en la xarxa cristal·lina formant empaquetaments de les molècules de tal manera que les distàncies Pt-Pt són de l'ordre de 3.44 Å.<sup>26,27,28</sup>

Els complexos polinuclears de Pt de valència mixta coneguts presenten distàncies Pt-Pt compreses entre 2.7-2.9 Å,<sup>29,30,31</sup> una mica inferiors a les observades en els casos

anteriorment mencionats. De la mateixa manera, els complexos diamagnètics de diplatí presenten unes distàncies d'enllaç Pt-Pt inferiors a 3 Å, i varien segons el tipus de complex entre 2.4-2.7 Å. D'aquests complexos, els que presenten quatre lligands pont unint dos àtoms de Pt presenten un enllaç Pt-Pt inferior que els complexos de diplatí units només per dos lligands pont.<sup>32,33,34</sup>

Les dues unitats constitutives del complex  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$  presenten distàncies Pt-N molt similars properes als 2 Å (2.013 i 2.022 Å per  $\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})$ ; 1.988 i 1.996 Å per  $\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$ ), i la geometria de coordinació del metall és aproximadament planoquadrada. Les principals distàncies d'enllaç i angles d'enllaç que presenta el fragment  $\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$  estan d'acord amb els valors de l'estructura cristal·lina de  $\text{PtCl}_2(\text{Bpy})$  presentada a l'any 1996 per W.B.Connick i col·laboradors.<sup>23</sup>

El lligand  $\text{Me}_2\text{Bpy}$  de cada unitat del complex trinuclear de Pt(II) presenta la mateixa geometria, amb distàncies d'enllaç C-C de l'ordre de 1.4 Å, i la distància  $C_{\text{arom.}} - C_{\text{metil}}$  és lleugerament més gran, de l'ordre de 1.5 Å.

En l'estructura resolta apareixen molècules d'acetona provinents dels dissolvent de cristal·lització.

## 5. CONCLUSIONS

-S'ha sintetitzat i cristal·litzat un complex trinuclear de Pt(II),  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$ , format per una unitat central  $\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2$  i dues unitats  $\text{PtCl}_2\text{Me}_2\text{Bpy}$  disposades de forma quasi paral·lela. El complex s'ha caracteritzat per IR, RMN-<sup>1</sup>H i s'ha comparat aquests resultats amb els espectres de  $\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$  i  $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2](\text{PF}_6)_2$ .

-A través de la resolució de l'estructura cristal·lina per difracció de raigs-X s'ha observat que les tres unitats constitutives del complex es mantenen unides per interaccions intermoleculares Pt-Pt de 3.474 Å i no existeixen unions de tipus pont a



través dels lligands. En cada unitat l'entorn geomètric de l'àtom metàl·lic és gairebé planoquadrat.

-Al llarg de la xarxa cristal·lina les unitats de  $\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})$  es mantenen agrupades de tres en tres, i cada agrupació de tres unitats presenta dues molècules de contraió  $\text{PF}_6^-$  i dues molècules d'acetona de cristal·lització.

## 6. REFERÈNCIES

---

- <sup>1</sup> a) R. Cini, F.P. Fanizzi, F.P. Intini, L. Maresca, G. Natile. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 5123-5131. b) D.C. Smith, H.B. Gray. *Coord. Chem. Rev.*, **1990**, 100, 169-181.
- <sup>2</sup> a) H-K. Yip, L.K. Cheng, K-K. Cheung, C. Che. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1993**, 2933. b) D.M. Washecheck, S.W. Peterson, A.H. Reis, J.M. Williams. *Inorg. Chem.*, **1976**, 15, 74.
- <sup>3</sup> S.F. Rice, S.J. Milder, R.A. Goldbeck, D.S. Kliger, H.B. Gray. *Coord. Chem. Rev.*, **1982**, 43, 349.
- <sup>4</sup> J.N. Novoa, G. Aullón, P. Alemany, S. Álvarez. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 27, 7169-7171.
- <sup>5</sup> a) X. Zhu, E. Rusanov, R. Kluge, H. Schmidt, D. Steinborn. *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 2667-2671. b) K. Akdi, R.A. Vilaplana, J.A.R. Navarro, J.M. Salas, F. González-Vilchez, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 90, 51-60.
- <sup>6</sup> a) A Hagmans, Y. Qu, L.R. Kelland, J.D. Roberts, N. Farrell. *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 24, 6108-6114. b) E. Wong, C.M. Giandomenico. *Chem. Rev.*, **1999**, 2451-2466. c) T.W. Hambley, A.R. Jones. *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, 212, 35-59.
- <sup>7</sup> P.L. Johnson, T.R. Koch, J.J. Williams. *Acta Crystallogr.*, **1997**, 884, 1293.
- <sup>8</sup> K. Sakai, K. Matsumoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 3074.
- <sup>9</sup> W.L. Waltz, J. Lilie, S. Chandrasekhar, D. Woo, K. Brown. *Inorg. Chem.*, **1996**, 124.
- <sup>10</sup> B. Lippert. *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 182, 263-295.
- <sup>11</sup> R. Uson, J. Forniés, M. Tomás, B. Menjón, K. Sünkel, R. Bau. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1984**, 751.
- <sup>12</sup> a) J.D. Woollins, P.F. Kelly. *Coord. Chem. Rev.*, **1985**, 65, 115. b) D.M. Roundhill, H.B. Gray, C-M. Che. *Acc. Chem. Res.*, **1989**, 22, 55. c) T.G. Appleton, K.A. Byriel, J.M. Garret, J.R. Hall, C.H.L. Kennard, M.T. Mathieson. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 7305.
- <sup>13</sup> a) T.G. Appleton, K.A. Byriel, J.M. Garret, J.R. Hall, C.H.L. Kennard, M.T. Mathieson, R. Stranger. *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 5646. b) G. Cervantes, M.J. Prieto, V. Moreno. *Metal-Based Drugs*, **1997**, 4, 1, 9-18. c) V.M. González, M.A. Fuertes, M.J. Pérez-Álvarez, G. Cervantes, V. Moreno, C. Alonso, J.M. Pérez. *Biochem. Pharm.*, **2000**, 60, 374-379.

- 
- <sup>14</sup> A. Juris, V. Balzani, F. Barigelletti, S. Campagna, P. Belser, A. Von Zelewsky. *Coord. Chem. Rev.*, **1988**, 84, 85.
- <sup>15</sup> A.M.W. Cargill Thomson. *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, 160, 1.
- <sup>16</sup> F. Wu, C.H. Chamchoumis, R.P. Thummel. *Inorg. Chem*, **2000**, 39, 584-590.
- <sup>17</sup> a) K.W. Jennette, S.J. Lippard, G.A. Vassiliades, W.R. Bauer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1974**, 71, 3839-3843. b) S.J. Lippard, P.J. Bond, K.C. Wu, W.R. Bauer. *Science*, **1976**, 194, 726-728. c) S.J. Lippard. *Acc. Chem. Res.*, **1978**, 11, 211-217.
- <sup>18</sup> O. Yamauchi, A. Odani, R. Schimata, Y. Kosaka. *Inorg. Chem.*, **1986**, 25, 3337-3339.
- <sup>19</sup> G. Baldini, G. Varani. *Biopolymers*, **1985**, 25, 2187-2208.
- <sup>20</sup> E. Bielli, P.M. Gidney, R.D. Gillard, B.T. Heaton. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1974**, 4, 323, 2133-2139.
- <sup>21</sup> E. Pretsch, T. Clerc, J.S ebl, W. Simon. *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*, **1995**, Alhambra Longman.
- <sup>22</sup> K. Nakamoto. *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*, **1996**, 4<sup>th</sup> Edition, Wiley, New York.
- <sup>23</sup> W.B. Connick, L.M. Henling, R.E. Marsh, H.B. Gray. *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 6261-6265.
- <sup>24</sup> S. Komeda, M.Lutz, A.L. Spek, M. Chikuma, J. Reedijk. *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 4230-4236.
- <sup>25</sup> S. Komeda, M. Lutz, A.L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chkuma, J. Reedijk. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 4738-4746.
- <sup>26</sup> B. Splinger, D.A. Whittington, S.J. Lippard. *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 5596-5602.
- <sup>27</sup> X. Riera, A. Caubet, C.López, V. Moreno, X. Solans, M. Font-Bardía. *Organometallics*, **2000**, 19, 1384-1390.
- <sup>28</sup> F. Teixidor, P. Anglès, C. Viñas, R. Kivekäs, R. Sillanpää. *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 1642-1644.
- <sup>29</sup> a) J.P. Davison, P.J. Faber, R.G. Fischer, S. Mansy, B. Rosenberg, L. Vancamp. *Cancer Chemother. Rep.*, **1975**, 59, 287. b) B. Lippert. *J. Clin. Hematol. Oncol.*, **1977**, 7, 26. c) R.J. Sperr, H. Ridgway, L.M. Hall, D.P. Stewart, R.E. Howe, D.Z. Lieberman, A.D. Newman, J.M. Hill. *Cancer Chemother.*, **1975**, 59, 629.

---

<sup>30</sup> J.K. Barton, H.N. Rabinowitz, D.J. Szalda, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 2827.

<sup>31</sup> a) A.P. Ginsberg, T.V. O'Halloran, P.E. Fanwick, L.S. Hollis, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 5430. b) P. Arrizabalga, P. Cestan, M. Geoffroy, J-P Laurent. *Inorg. Chem.*, **1985**, 24, 3656. c) T.V. O'Halloran, P.K. Mascharek, I.D. Williams, S.J. Lippard. *Inorg. Chem.*, **1987**, 26, 1261.

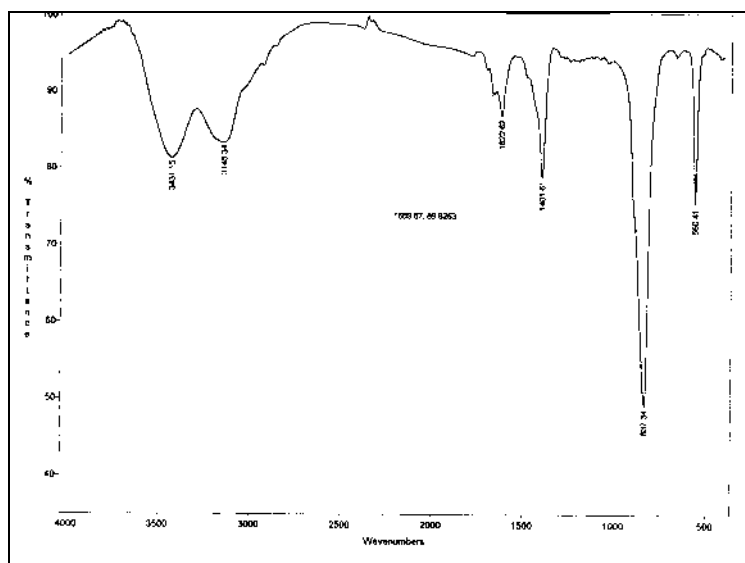
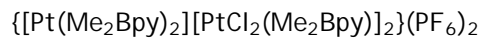
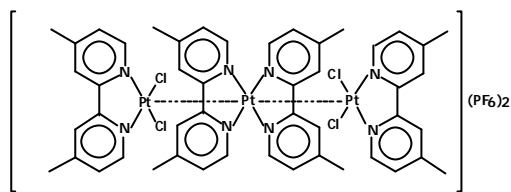
<sup>32</sup> J.D. Woollins, P.F. Kelly. *Coord. Chem. Rev.*, **1985**, 65, 115.

<sup>33</sup> D.M. Roundhill, H.B. Gray, C-M. Che. *Acc. Chem. Res.*, **1989**, 22, 55.

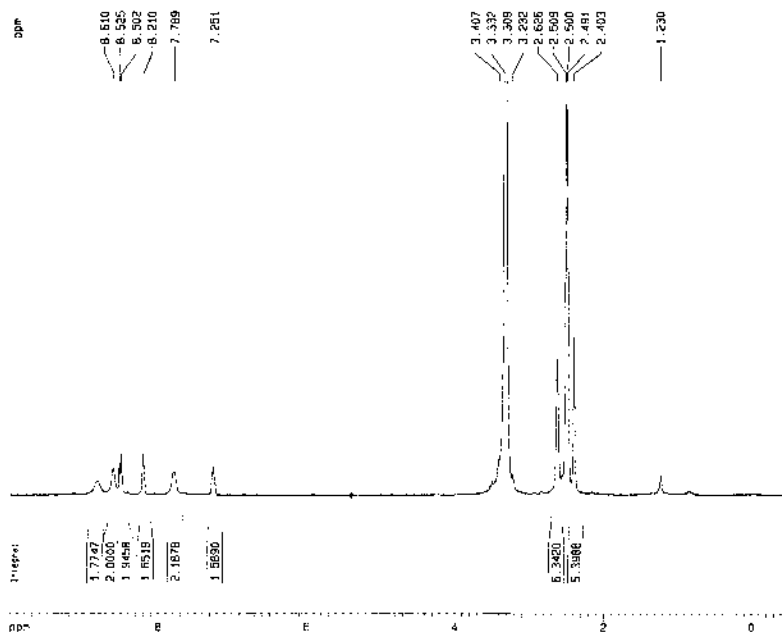
<sup>34</sup> a) T.G. Appleton, K.A. Byriel, J.R. Hall, C.H.L. Kennard, M.T. Mathieson. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 7305. b) T.G. Appleton, K.A. Byriel, J.M. Garrett, J.R. Hall, C.H.L. Kennard, M.T. Mathieson, R. Stranger. *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 5646.



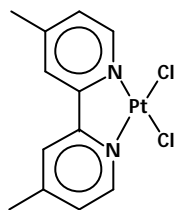
## 7. MATERIAL SUPLEMENTARI



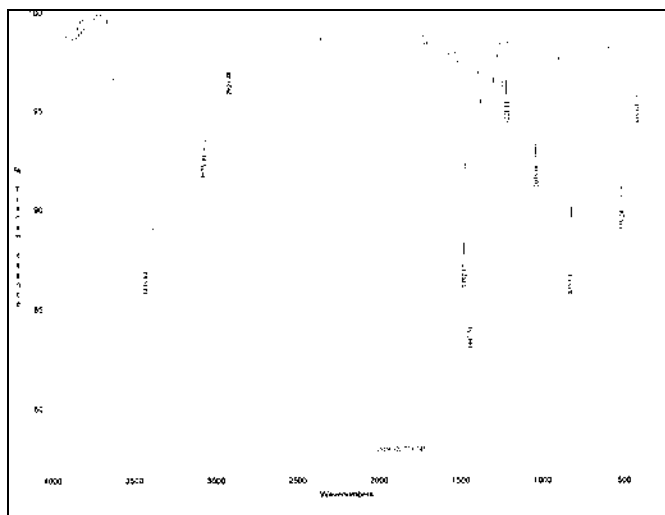
IR



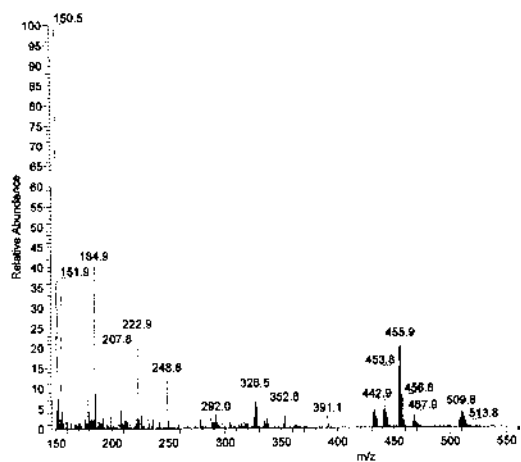
RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)



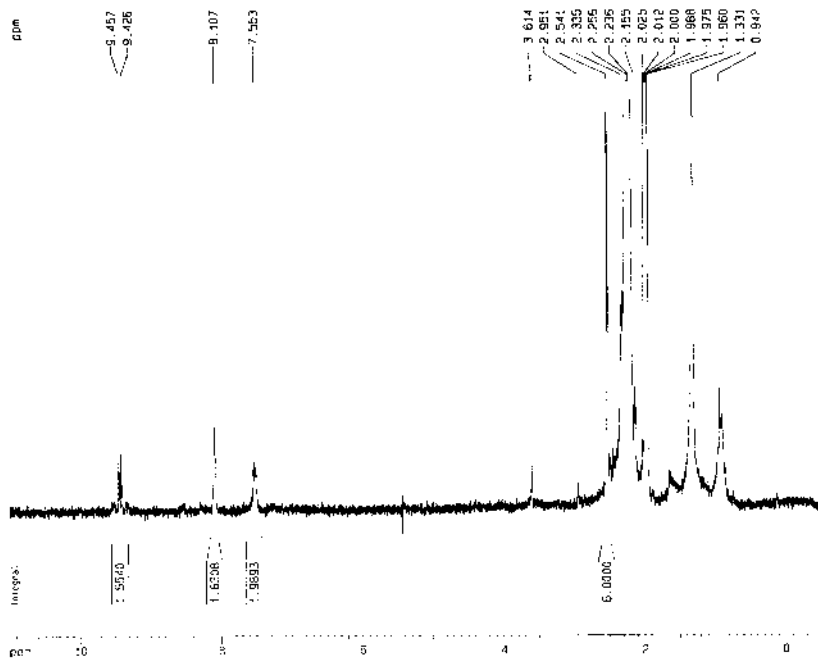
PtCl<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Bpy)



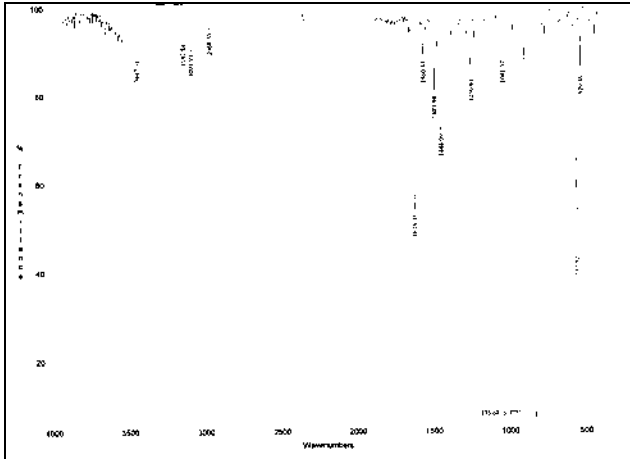
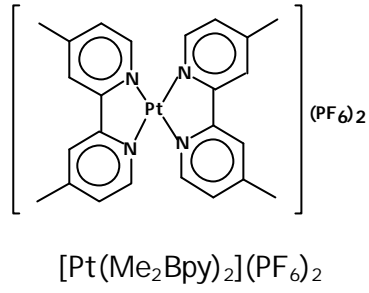
IR



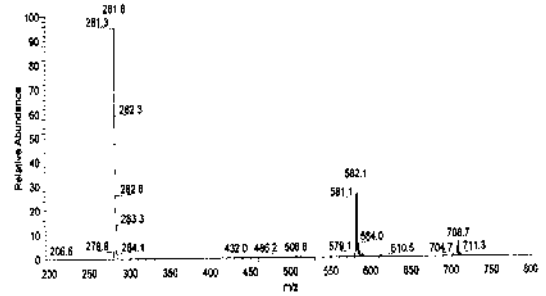
ESI-MS (CH<sub>3</sub>CN)



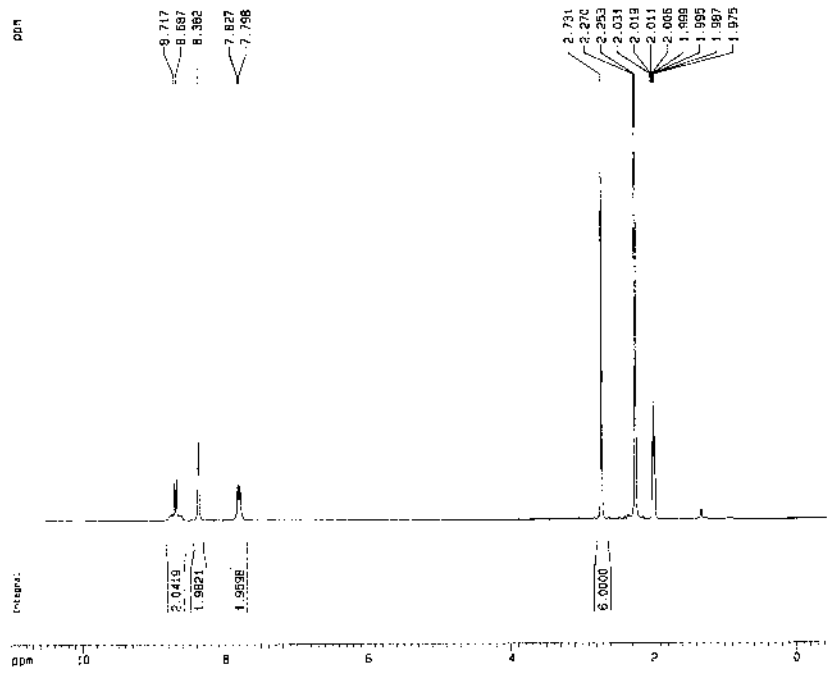
RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN)



IR



ESI-MS (CH<sub>3</sub>CN)



RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN)





## CAPÍTOL 7

---

### CONCLUSIONS GENERALS



## CONCLUSIONS GENERALS

S'han sintetitzat i caracteritzat un total de 13 complexos de Pt(II) planoquadrats amb la finalitat d'utilitzar-los com a agents antitumorals. Aquests complexos presenten unes característiques estructurals comunes: geometria cis, dos lligands làbils tipus clorur i un lligand diaminoquelatant derivat dels àcids comercials 2,3-diaminopropiònic i 2,4-diaminobutíric. S'han dissenyat unes estratègies sintètiques a partir de les quals els lligands han estat funcionalitzats amb diferents grups de tipus éster, aminoàcid i peptídic: Etdap·2HCl, Etdab·2HCl, [(dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-Mettrp)·2CF<sub>3</sub>COOH] i [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH]. Aquests lligands diaminoquelatants s'han utilitzat per sintetitzar els complexos PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab), PtCl<sub>2</sub>(Etdap), PtCl<sub>2</sub>(Etdab), PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala), PtCl<sub>2</sub>(dab-Metala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe), PtCl<sub>2</sub>(dap-Mettrp), PtCl<sub>2</sub>(dab-Mettrp) i PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>). Comparant els diferents compostos de Pt(II) s'ha pogut realitzar un estudi de la relació estructura-activitat.

Els complexos que contenen un grup carboxílic terminal en la seva estructura, com PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab), PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe), es mostren mitjanament solubles en aigua i resulten òptims per la realització d'estudis biològics. En canvi, aquells complexos que contenen un grup éster o amida terminals, com PtCl<sub>2</sub>(Etdap), PtCl<sub>2</sub>(Etdab), PtCl<sub>2</sub>(dap-Metala), PtCl<sub>2</sub>(dab-Metala), PtCl<sub>2</sub>(dap-Mettrp), PtCl<sub>2</sub>(dab-Mettrp), (PtCl<sub>2</sub>(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)), es mostren insolubles en aigua i només es poden solubilitzar en DMSO o DMF.

A través de la tècnica de DC s'ha pogut demostrar que els lligands lliures Hdap·HCl, Hdab·2HCl, Etdap·2HCl, Etdab·2HCl, [(dap-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-Metala)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dab-phe)·2CF<sub>3</sub>COOH], [(dap-ASTTTNYT-NH<sub>2</sub>)·2CF<sub>3</sub>COOH], no s'uneixen covalentment al DNA i no modifiquen l'estructura secundària de la doble hèlix. En canvi, els respectius complexos de Pt(II) han demostrat

tenir capacitat per interaccionar amb el DNA i modificar la seva estructura secundària. Els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{dab-phe})$  mostren un comportament similar al cisplatí, generant adductes cis-bifuncionals que distorcionen la doble hèlix de forma no desnaturalitzant amb obertura de la doble cadena. Els altres complexos,  $\text{PtCl}_2(\text{Etdap})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dap-Metala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dab-Metala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dap-phe})$ , quan interaccionen amb el DNA provoquen un canvi en la conformació del DNA de la forma B a la forma C, produint-se un augment de la curvatura de la hèlix per rotació de les bases.

En els estudis de DC s'ha comprovat que l'estructura del complex influeix en els canvis que es produeixen en l'el·lipticitat i longitud d'ona al modificar-se la raó molar de complex. En primer lloc, existeix una diferència en el comportament en funció del tamany de l'anell que forma el lligand quelatant, de manera que els complexos amb el lligand dab provoquen en general unes modificacions de l'el·lipticitat i longitud d'ona de l'espectre del DNA en funció de la raó molar molt més remarcables. També s'observa aquest canvi de comportament al passar dels complexos que tenen el grup carboxilat esterificat als que tenen el grup carboxilat protonat. Així, s'observa un major efecte sobre l'estructura secundària del DNA en aquells complexos que tenen el lligand diaminoquelatant de tres metilens, i a més amb el grup carboxilat terminal protonat. Aquests resultats suggereixen que el protó acídic permet la formació d'una interacció per pont d'hidrogen entre el complex i les bases nitrogenades del DNA, de manera que contribueix en l'efecte de la distorsió de la doble hèlix i en l'estabilització de l'adducte.

Per tal de modelitzar la interacció d'aquests complexos amb el DNA, s'ha estudiat la interacció complex-5'-GMP a través de RMN- $^1\text{H}$ , centrant-se en la variació dels senyals corresponents al H8 de 5'-GMP. S'ha pogut demostrar que els complexos  $\text{PtCl}_2(\text{Hdap})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{Hdab})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{Etdap})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dap-Metala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dab-Metala})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dap-phe})$ ,  $\text{PtCl}_2(\text{dab-phe})$ , interaccionen amb la 5'-GMP a través d'un enllaç covalent Pt-N7, de la mateixa manera a com interacciona el cisplatí.

A través d'electroforesi en gel d'agarosa i AFM s'ha pogut determinar l'efecte que generen els lligands lliures i els respectius complexos de Pt(II) sobre l'estructura terciària del DNA. En general, tots els lligands estudiats produeixen un lleuger augment de la compactació i una important agregació de les molècules de DNA. Aquest efecte pot ser degut a la capacitat que tenen els lligands de generar interaccions dèbils per pont d'hidrogen amb les bases nitrogenades del DNA a través de diversos grups funcionals de llur estructura. Els complexos de Pt(II), PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab), PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe), provoquen un important augment de la compactació i una agregació del DNA, degut a una unió covalent Pt-DNA i a possibles interaccions dèbils per pont d'hidrogen a través dels lligands.

L'activitat citotòxica dels complexos de Pt(II) sintetitzats s'ha avaluat a través d'assaigs de proliferació cel·lular en diferents línies cel·lulars, A431, HeLa i HL60 i en diferents temps d'incubació (24, 48 i 72h). Els complexos solubles en aigua, PtCl<sub>2</sub>(Hdap), PtCl<sub>2</sub>(Hdab), PtCl<sub>2</sub>(dap-ala), PtCl<sub>2</sub>(dab-ala), PtCl<sub>2</sub>(dap-phe), PtCl<sub>2</sub>(dab-phe), mostren activitat antitumoral, produint una disminució de la supervivència cel·lular de forma gradual a mesura que augmenta la concentració de complex. L'activitat d'aquests complexos segueix la mateixa tendència que el comportament del carboplatí, i difereixen molt del comportament del cisplatí. Els valors de IC<sub>50</sub> que mostren aquests complexos de Pt(II) sintetitzats són superiors als valors que presenta el carboplatí, i molt superiors als valors de IC<sub>50</sub> del cisplatí. L'avantatge potencial que presenten aquests compostos en front del cisplatí, és que podrien permetre una millor dosificació de la droga degut a la més lenta reactivitat i això podria derivar a una disminució dels efectes secundaris que poden produir. Tots aquests complexos presenten l'activitat antitumoral més alta en temps d'incubació alts (72h). Els complexos que en general es mostren més inactius són PtCl<sub>2</sub>(dap-phe) i PtCl<sub>2</sub>(dab-phe). Això es pot atribuir a la voluminositat del lligand, de manera que el seu transport a través de la membrana cel·lular es veu més impedit i la quantitat de droga que pot entrar a l'interior de la cèl·la és inferior en un determinat temps d'incubació. Els complexos PtCl<sub>2</sub>(dap-ala) i PtCl<sub>2</sub>(dab-ala) es mostren lleugerament més actius que PtCl<sub>2</sub>(Hdap) i PtCl<sub>2</sub>(Hdab) en temps d'incubació alts. Per tant s'observa

una millora en l'activitat antitumoral al incorporar un aminoàcid poc voluminós com a substituent. El fet que el complex  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$  sigui en molts casos més actiu que el  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ala})$  s'atribueix a la solubilitat. El  $\text{PtCl}_2(\text{dab-ala})$  és més lipofílic que el seu anàleg ja que presenta un metilè addicional, i el seu transport a través de la membrana cel·lular està més afavorit, permetent, en un mateix temps d'incubació, una concentració més gran de complex en la cel·lula.

Els complexos insolubles en aigua,  $\text{PtCl}_2(\text{Etdap})$  i  $\text{PtCl}_2(\text{Etdab})$ , aparentment no mostren activitat antitumoral degut a la quantitat de DMSO necessària per dissoldre els complexos (12%). En aquestes condicions no provoquen una disminució de la supervivència cel·lular a l'augmentar la concentració de compost. Sota les mateixes condicions d'incubació l'activitat del cisplatí queda també anul·lada. Aquests resultats permeten concloure que la presència d'un 12% de DMSO anul·la l'activitat d'aquests complexos, ja que el DMSO pot coordinar-se amb el Pt, ocupant les posicions làbils del complex i evitant que es pugui coordinar amb el DNA.

El complex  $\text{PtCl}_2(\text{dap-ASTTTNYT-NH}_2)$ , també és insoluble en aigua, però es pot solubilitzar amb un 2% de DMSO. Els assaigs de proliferació cel·lular demostren que tant el pèptid lliure,  $\text{ASTTTNYT-NH}_2$ , com el complex presenten activitat citotòxica. Tot i això, l'activitat del complex és superior a la del pèptid lliure, ja que el platí pot interaccionar covalentment amb el DNA i augmentar l'efecte citotòxic. Per tant, si el transport del pèptid lliure a través de la membrana cel·lular està facilitat, el lligand actua de transportador a través de la cel·lula i facilita la interacció del metall amb el DNA.

Els estudis de citometria de flux han permès demostrar que la mort cel·lular generada per aquests complexos de Pt(II) estudiats és per apoptosi. L'electroforesi en gel d'agarosa del DNA tractat amb aquests complexos dona lloc al patró típic que genera l'apoptosi, observant-se la fragmentació del DNA en fragments de 200 pb.

S'ha sintetitzat i caracteritzat un complex de Pt(II) trinuclear,  $\{[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{Bpy})_2][\text{PtCl}_2(\text{Me}_2\text{Bpy})]_2\}(\text{PF}_6)_2$ . La resolució de la seva estructura cristal·lina per difracció de Raix-X ha permès determinar l'existència d'una interacció intermolecular Pt-Pt de 3.474 Å.

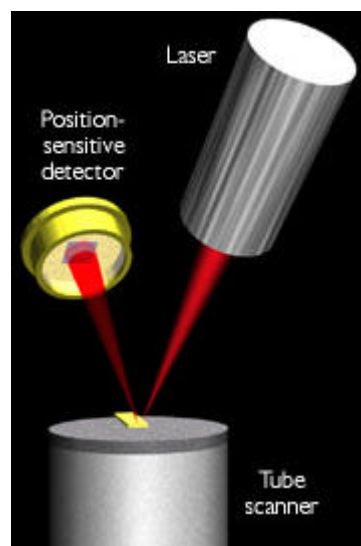




## ANNEX

---

# BREUS FONAMENTS DE LES TÈCNIQUES D'ANÀLISI DE L'ACTIVITAT BIOLÒGICA DE COMPOSTOS AMB PROPIETATS ANTITUMORALS



## Breus fonaments de les tècniques d'anàlisi de l'activitat biològica de compostos amb propietats antitumorals

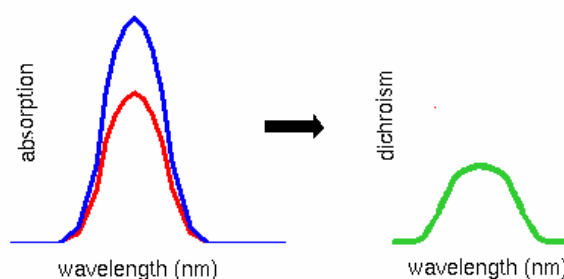
### ÍNDIX

1. Dicroisme Circular	323
2. Electroforesi en gel d'agarosa	326
3. Microscopia de Forces Atòmiques	328
4. Assaigs de proliferació cel·lular	331
5. Citometria de Flux	332



## 1. DICROISME CIRCULAR.

L'espectroscopia de dicroisme circular (CD) és un tipus d'espectroscopia d'absorció que proporciona informació sobre l'estructura de molts tipus de macromolècules biològiques. Es basa en la mesura de la diferència d'absorció de la llum polaritzada circularment a la dreta i a l'esquerra (Figura 1). Aquesta absorció diferencial suposa una variació de l'amplitud de les ones transmeses i per això la suma vectorial de les dues components descriu gràficament una el·lipse.



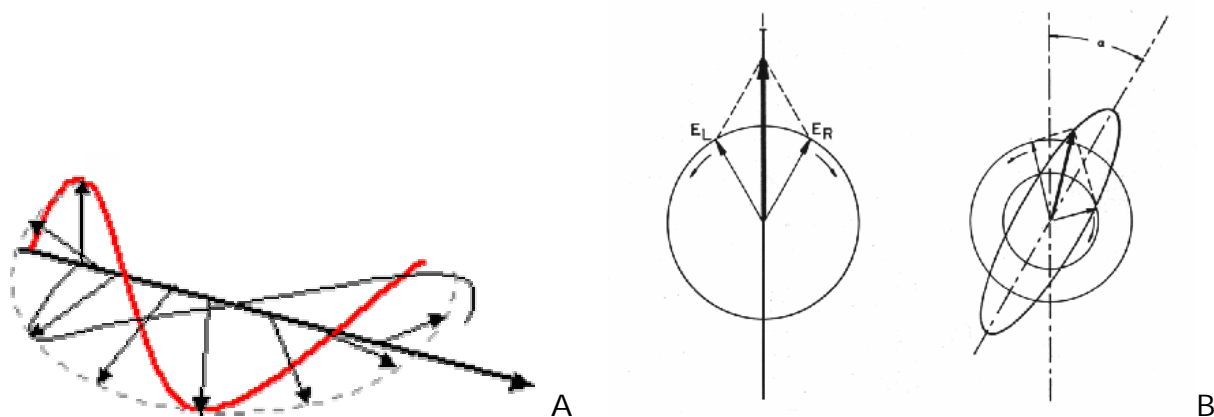
**Figura 1.** Representació general de la diferència d'absorció de la llum polaritzada a la dreta i a l'esquerra mesurada en funció de la longitud d'ona.

El fenomen del dicroisme circular és molt sensible a l'estructura secundària de polipèptids, proteïnes i àcids nucleics. L'aplicació d'aquesta tècnica als àcids nucleics permet establir una correlació entre l'espectre i la conformació que presenta la biomolècula, perquè el dicroisme circular és molt sensible als petits canvis d'orientació en les bases nitrogenades que poden provocar tant l'obertura com l'enrotllament de la doble hèlix.

### PRINCIPIS FÍSICS DEL DICROISME CIRCULAR.<sup>1-7</sup>

La teoria del dicroisme circular va ser desenvolupada per Biot i Fresnel. Un raig de llum polaritzada en un pla es pot considerar format per dues components polaritzades circularment, una a la dreta i l'altra a l'esquerra. Aquestes components estan en fase i són de la mateixa amplitud. Al passar per un medi òpticament actiu, cada component

interactua de manera diferent amb els centres quirals de les molècules presents. La interacció de la radiació amb la mostra indueix un desfasament i un canvi de magnitud diferencials en les dues components circularment polaritzades de la llum, i aquests fenòmens provoquen una rotació del pla de polarització en un angle  $\alpha$  determinat i la distorsió d'aquest pla genera una el·lipse (Figura 2).



**Figura 2. A) Diagrama esquemàtic de les components de la llum polaritzada circularment. B) Distorsió del pla de polarització deguda a la rotació en un angle  $a$ .**

La rotació del pla i l'absorció diferent de les components circularment polaritzades (dicroisme circular) varien segons la longitud d'ona, obtenint-se espectres d'aquests fenòmens, els quals són gràfiques de la rotació o el·lipticitat en front de la longitud d'ona. L'el·lipticitat es defineix com:

$$\Theta = \frac{\Delta e}{10 \times c \times l}$$

On:

$$\theta = \text{graus} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$$

$$\Delta \epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r, \text{ en mgraus.}$$

C= molaritat de la dissolució

l= camí òptic en cm.

Els espectres de dicroisme circular s'obtenen generalment en les regions de l'ultraviolat proper (250-350 nm) i llunyà (180-250 nm) de la radiació electromagnètica, perquè aquestes són les regions de les transicions electròniques de l'esquelet dels pèptids, cadenes laterals de les proteïnes i les bases nitrogenades del DNA. Els espectres en aquesta regió són un reflex de la conformació global de la biomolècula i a més, els senyals en aquesta regió són extremadament sensibles als canvis de conformació.

Per tant, el dicroisme circular permet l'estudi de:

- a. Estructura secundària.
- b. Canvis conformacionals.
- c. Efectes del medi.
- d. Desnaturalització de proteïnes.

El DNA es pot presentar en diverses formes (A, B, C, Z, etc.) que corresponen a diferents conformacions. Cadascuna té un espectre de dicroisme circular característic (Figura 3). D'aquesta manera, la tècnica permet l'estudi qualitatiu dels canvis conformacionals globals induïts pels compostos en l'estructura secundària del DNA.<sup>8,9</sup>

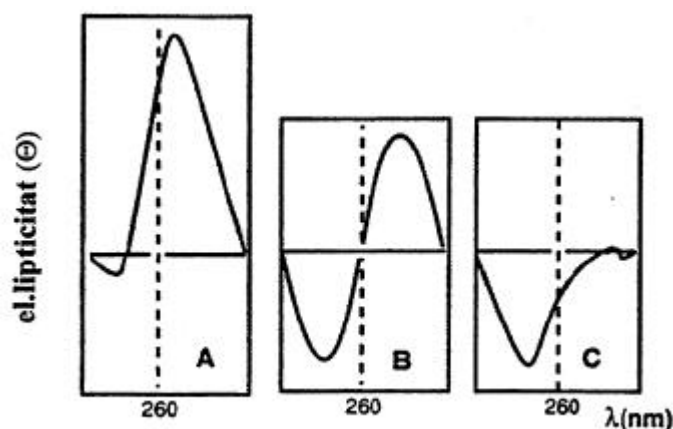


Figura 3. Espectres de dicroisme circular de les diferents formes de DNA (A, B, C).

### Referències bibliogràfiques:

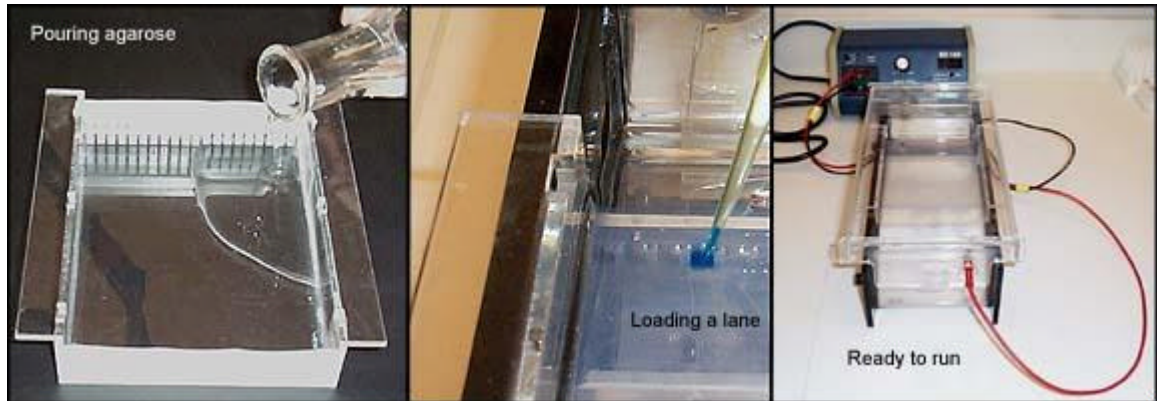
- <sup>1</sup> D. Freifelder. *Técnicas de Bioquímica i Biología Molecular. Serie de Biología Molecular*. Reverté, Barcelona. **1991**.
- <sup>2</sup> K. Nakanishi, N. Berova, R.W. Woody. *Circular Dichroism. Principles and Applications*, **1994**, VCH Publishers, New York.
- <sup>3</sup> Mathews, Van Holde, Ahern. *Bioquímica*, **2002**, Addison Wesley.
- <sup>4</sup> <http://galeon.hispavista.com/scienceducation/Dicroismo.htm>.
- <sup>5</sup> [http://www.cryst.bbk.ac.uk/BBS/wahatis/cd\\_website.html](http://www.cryst.bbk.ac.uk/BBS/wahatis/cd_website.html).
- <sup>6</sup> [http://broccoli.mfn.ki.se/pps\\_course\\_96/ss\\_960723\\_21.html](http://broccoli.mfn.ki.se/pps_course_96/ss_960723_21.html).
- <sup>7</sup> <http://www.newark.rutgers.edu/chemistry/grad/chem585/lecture1.html>.
- <sup>8</sup> V.I. Ivanov, L.E. Minchekova, A.K. Schvolkina, A.I. Poletavov. *Biopolymers*, **1973**, 12, 89.
- <sup>9</sup> R.L.P. Adams, J.T. Knowler, D.P. Leader. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, **1992**, Chapman and Hill, London.

## 2. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA.

L'electroforesi és una tècnica utilitzada per separar i a vegades purificar macromolècules, especialment proteïnes i àcids nucleics, que difereixen en tamany, càrrega o conformació. Per això, és una de les tècniques més àmpliament utilitzades en bioquímica i biologia molecular.<sup>1-3</sup>

Quan les molècules carregades es col·loquen en un camp elèctric, migren cap a l'ànode o el càtode, segons la càrrega. Els àcids nucleics tenen una càrrega negativa degut als grups fosfat, i per tant migren cap a l'ànode.

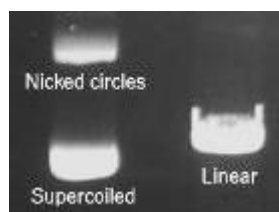
L'electroforesi es realitza en un gel submergit amb un tampó, el qual proporciona ions per mantenir un corrent i un pH a un valor constant (Figura 4).



**Figura 4.** Muntatge tècnic requerit per la realització de l'electroforesi en gel d'agarosa. En la primera figura es mostra la col·locació del gel de forma uniforme. En la segona imatge es mostra l'aplicació de les diferents mostres en el gel. En la tercera imatge es mostra la connexió dels electodes sobre el gel.

El DNA circular migra de forma diferent que el DNA lineal, encara que tinguin la mateixa massa. Normalment els plasmidis no tallats migren més ràpidament que el mateix plàsmid lineal. A més, moltes preparacions de plasmidi contenen al menys dues formes diferents de DNA, la superenrotllada i la circular (Figura 5).<sup>4-6</sup>

Els complexos metàl·lics poden provocar una disminució del superenrotllament o una compactació del DNA. Per tant, cal esperar una variació de la mobilitat electroforètica de les diferents formes, i d'aquesta manera, l'electroforesi permetrà posar de manifest les possibles modificacions en l'estructura terciària del DNA provocades pels complexos.<sup>6-12</sup>



**Figura 5.** Electroforesi d'un DNA circular amb les respectives conformacions i d'un DNA lineal, on es pot observar els diferents desplaçaments de cada espècie sobre el gel d'agarosa.

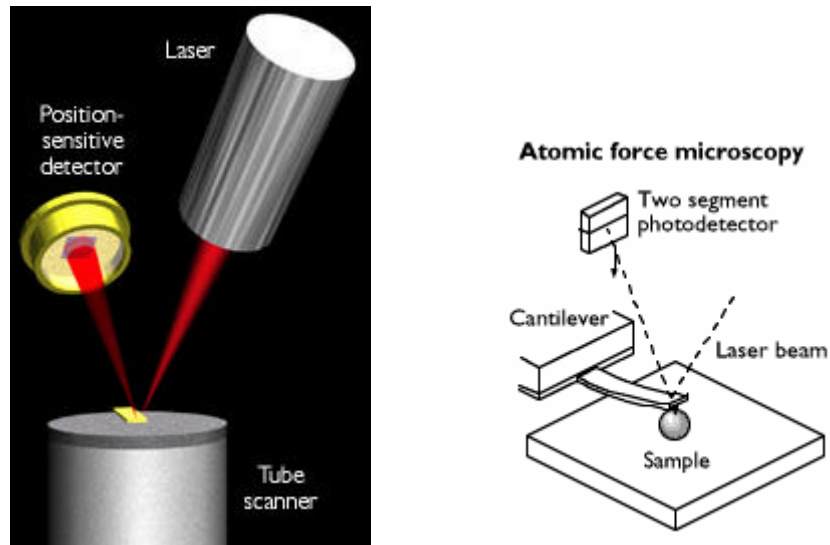


### Referències bibliogràfiques:

- <sup>1</sup> Mathews, Van Holde, Ahern. *Bioquímica*, **2002**, Addison Wesley.
- <sup>2</sup> <http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html>.
- <sup>3</sup> <http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/principles.html>.
- <sup>4</sup> J. Grinsted, P. Bennett. *Methods in Biology: Plasmid Technology*, **1988**, Vol 21, Academic Press, London.
- <sup>5</sup> P. Nielsen, W. Zhen, U. Henriksen, O. Buchardt. *Biochemistry*, **1988**, 27, 67.
- <sup>6</sup> M.V. Keck, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3386.
- <sup>7</sup> S.J. Lippard. *Acc. Chem. Res.*, **1978**, 11, 211.
- <sup>8</sup> J.P. Macquet, J.L. Butour. *Biochimie*, **1978**, 60, 901.
- <sup>9</sup> B.E. Bowler, L.S. Holis, S.J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 6102.
- <sup>10</sup> R.T. Espejo, J. Lebowitz. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 95.
- <sup>11</sup> G.L. Cohen, W.R. Bauer, J.K. Barton, S.J. Lippard. *Science*, **1979**, 203, 1014.
- <sup>12</sup> S. Mong, Y. Daskal, A.W. Prestayko, S.T. Crooke. *Cancer Res.*, **1981**, 41, 4020.

### 3. MICROSCOPIA DE FORCES ATÒMIQUES (AFM).

La AFM és un tipus de microscopia que opera mesurant les forces atractives i repulsives entre una punta i la mostra (Figura 6).<sup>1-3</sup> Aquesta microscopia pot aconseguir una resolució de 10 pm, i a diferència dels microscopis electrònics, pot donar imatges de mostres en l'aire o en líquids. Incorpora tota una sèrie de refinaments que li permeten aconseguir una resolució a escala atòmica.



**Figura 6.** Representació simplificada del funcionament de la microscòpia de forces atòmiques. El tub scanner mesura 24 mm de diàmetre, mentre que la punta mesura 100 nm d'allargada.

L'habilitat de la AFM de donar imatges a resolució atòmica, combinada amb la seva habilitat de donar imatges d'una gran varietat de mostres sota diferents condicions, ha donat lloc a un gran interès en aplicar-la en l'estudi d'estructures biològiques. En la literatura han aparegut imatges mostrant DNA, proteïnes i cèl·lules vives.<sup>4</sup> L'àrea que està en progressiu avanç és la dels àcids nucleics.<sup>5-8</sup> La generació d'imatges resoltes d'àcids nucleics no modificats a escala de nm ha ampliat les seves aplicacions: transcripció de cromosomes, interaccions DNA-molècules petites, intercal·lació de mutàgens, entre altres. La primera imatge altament reproducible del DNA es va obtenir a l'any 1991.<sup>8</sup>

Molts processos biològics, com la replicació del DNA, síntesi de proteïnes, interacció de drogues, i altres, estan governats per forces intermoleculares. La AFM pot mesurar forces en el rang de nanonewtons. Això fa possible quantificar la interacció molecular en sistemes biològics.

La AFM permet investigar tant propietats estructurals com funcionals de biomolècules en estat líquid a través d'una única combinació d'una resolució espacial de

subnanòmetres, resolució temporal de mil·lisegons i una sensibilitat de força de piconewtons.

Les imatges del DNA revelen informació directa sobre la tipologia de les molècules de DNA i d'interaccions específiques amb proteïnes. S'ha demostrat a través de AFM com les propietats de les molècules de DNA varien en absència i presència de petites molècules intercal·ladores.<sup>9,10</sup>

En l'estudi de biomolècules, només es necessita una petita quantitat de mostra. Això és especialment important per experiments d'investigació de mostres rares o cares. En el futur, una resolució més alta en l'espai, temps i força, permetrà investigar en processos dinàmics a escala molecular. Aquest fet donarà impacte en la identificació fonamental de mecanismes moleculars importants i estimularà noves visions i estratègies en farmacologia molecular, identificació de drogues i també per la nanotecnologia biomolecular i mèdica.

### Referències bibliogràfiques:

<sup>1</sup> G. Binning, C.F. Quate, Ch. Gerber. *Phys. Rev. Lett*, **1986**, 56, 9, 930-933.

<sup>2</sup><http://stm2.nrl.navy.mil/how-afm/how-afm.html>.

<sup>3</sup><http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm729/afm/introdn.htm>.

<sup>4</sup> J.H. Hoh, P.K. Hansma. *Trends. Cell. Biol.*, **1992**, 2, 208-213.

<sup>5</sup> R. Guckenberger, M. Heim, G. Cevc, H.F. Kapp, W. Wiegräbe, A. Hillebrand. *Science*, **1994**, 266, 1538-1540.

<sup>6</sup> S. Wennmelm, L. Edman, R. Rigler. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1997**, 94, 10641-10646.

<sup>7</sup> S.B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante. *Science*, **1996**, 271, 795-799.

<sup>8</sup> H.G. Hansma, R.L. Sinsheimer, M.Q. Li, P.K. Hansma. *Nucleic Acids Res.*, **1991**, 20, 3585-3590.

<sup>9</sup> D. Anselmetti, J. Fritz, B. Smith, X. Fernandez-Busquets. *Single Molecules*, **2000**, 1, 1, 53-58.

<sup>10</sup> G.B. Onoa, G. Cervantes, V. Moreno, M.J. Prieto. *Nucl. Acids. Res.*, **1998**, 26, 6, 1473-1480.

#### 4. ASSAIGS DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR.

Els assaigs de proliferació són àmpliament utilitzats en biologia cel·lular per l'estudi de factors de creixement, citoquines, nutrients i per l'anàlisi d'agents citotòxics o quimioterapèutics.<sup>1,2</sup>

Existeixen diversos mètodes per determinar el número de cèl·lules:

1. Mètodes directes:

- observació per microscopi.
- utilització d'un comptador de partícules.

2. Mètodes indirectes:

- mesura de la incorporació de precursors radioactius.
- quantificació de la proteïna total amb colorants cromòfors.
- mesura de l'activitat metabòlica d'enzims cel·lulars.

L'assaig indirecte més comú per la proliferació cel·lular és la incorporació de 3H-timidina en l'interior del DNA cel·lular. Tot i això, l'assaig de la 3H-timidina és molt laboriós ja que requereix eliminar l'excés de reactiu no incorporat abans de la mesura.<sup>3,4</sup>

A l'any 1956 es va publicar el primer article on s'utilitzava les **sals de tetrazol** com a indicadors de la viabilitat cel·lular. Les sals de *tetrazol* (incolors o poc colorejades) són reduïdes metabòlicament a productes finals colorejats anomenats **formazans**. Aquesta reducció requereix ribosomes funcionals els quals queden inactivats pocs minuts després de la mort cel·lular. Tot i que la naturalesa d'aquesta bio-reducció cel·lular no està del tot entesa, proporciona una excel·lent eina per discriminar les cèl·lules vives de les cèl·lules mortes.<sup>5,6</sup>

Les primeres sals de *tetrazol* utilitzades tenien alguns desavantatges, com per exemple la insolubilitat dels productes formazans que es formaven. Per tant, es requeria un temps per solubilitzar els productes i alguna vegada calia afegir algun agent solubilitzant.<sup>7</sup>

Aquests inconvenients van donar lloc al desenvolupament de sals de *tetrazol* no tòxiques, les quals produïssin productes de reducció solubles. Tot i que el procediment de l'assaig es va simplificar amb aquests colorants solubles, a la pràctica l'ús estava limitat degut a la inestabilitat dels colorants de formazà i la relativa baixa absorbància del producte final en comparació amb els assaigs clàssics.<sup>8</sup>

Actualment s'han realitzat nous avanços en aquest camp, millorant la velocitat dels assaigs i la facilitat d'ús, i eliminant la toxicitat.

#### **Referències bibliogràfiques:**

<sup>1</sup> T. Mosmann. *J. Immunol. Math.*, **1983**, 65, 55-63.

<sup>2</sup> H. Tada . *J. Immunol. Math.*, **1986**, 93, 157-165.

<sup>3</sup> M.B. Hansen, S.E. Nielsen, K. Berg. *J. Immunol. Math*, **1989**, 119, 203-210.

<sup>4</sup> F. Denizoit, R. Lang. *J. Immunol. Math.*, **1986**, 89, 271-277.

<sup>5</sup> J. Carmichael. *Cancer Res.*, **1987**, 47, 943-946.

<sup>6</sup> P.J. Stoward, A.G.E. Pearse. *Histochemistry, theoretical and applied*, **1991**, 1-25.

<sup>7</sup> M.V. Berridge, A.S. Tan, K.D. Coy, R. Wang. *Biochemica*, **1996**, 4, 14-19.

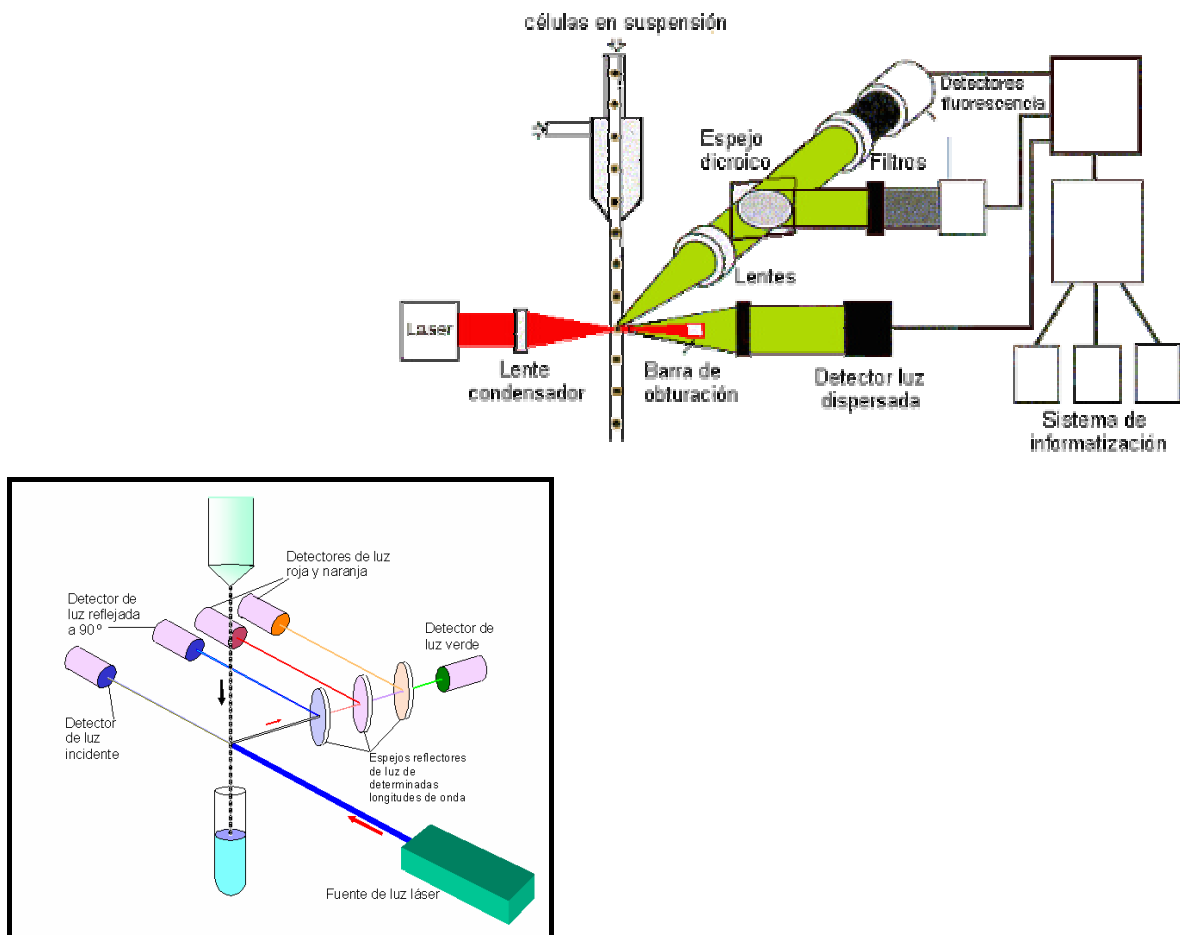
<sup>8</sup> N.J. Marshall, C.J. Goodwin, S.J. Holt. *Growth Regulation*, **1995**, 5, 69-84.

## **5. CITOMETRIA DE FLUX.**

La citometria de flux és una tècnica que permet obtenir informació sobre poblacions cel·lulars a partir d'un estudi individualitzat d'un gran nombre de cèl·lules (habitualment

entre 5000 i 10000), que serà una mostra el suficientment representativa del conjunt de la població. La suspensió de cèl·lules en solució isotònica es fa passar a través d'un petit orifici, de manera que surten d'una en una, formant part d'un corrent continu o flux cilíndric.

Sobre aquest corrent de cèl·lules es fa incidir un feix de llum làser, la dispersió i reflexió del qual són analitzades en durada, intensitat i espectre. Les dades obtingudes s'emmagatzemen i es passen a arxius binaris que poden ser analitzats posteriorment (Figura 7).<sup>1,2</sup>



**Figura 7.** Representació esquemàtica del funcionament d'un citòmetre de flux. Les cèl·lules tenyides al passar per davant d'un feix de llum làser emeten una llum fluorescent i dispersada que és separada en funció de la longitud d'ona per filtres i miralls.

En els estudis de distinció de les cèl·lules apoptòtiques a través de la tècnica de citometria de flux es coloreja el DNA amb diferents cromòfors fluorescents. D'aquesta

manera es poden analitzar diverses característiques metabòliques de la cèl·lula i es poden caracteritzar els canvis que acompanyen el procés d'apoptosi.<sup>3-9</sup>

La integritat de la membrana plasmàtica de les cèl·lules apoptòtiques generalment es manté i gran part de les funcions de la membrana queden intactes. Aquestes cèl·lules exclouen indicadors com el **iodur de propidi (PI)** o el **blau de tripà**, ja que no poden unir-se al DNA. En canvi, les cèl·lules en necrosi perden la funció i la integritat estructural de la membrana, i els colorants poden interaccionar amb el DNA nuclear. Amb la utilització del PI es podria classificar erròniament les cèl·lules apoptòtiques per cèl·lules sanes. Per això és aconsellable fer un assaig simultani amb un altre cromòfor fluorescent, com l'annexina-FITC.

L'annexina marcada amb fluorescència és una proteïna que s'uneix a la fosfatidilserina de la cara interna de la membrana plasmàtica. D'aquesta manera, una cèl·lula normal, la qual presenta la fosfatidilserina localitzada en la cara interna de la membrana, no incorpora annexina i no es detecta la fluorescència. Però les primeres fases d'apoptosi es caracteritzen per alterar la membrana, desplaçant la fosfatidilserina cap a la cara extracel·lular de la membrana, quedant exposada a l'exterior, i s'uneix amb l'annexina donant fluorescència a les cèl·lules apoptòtiques (Figura 8).<sup>10,11</sup>

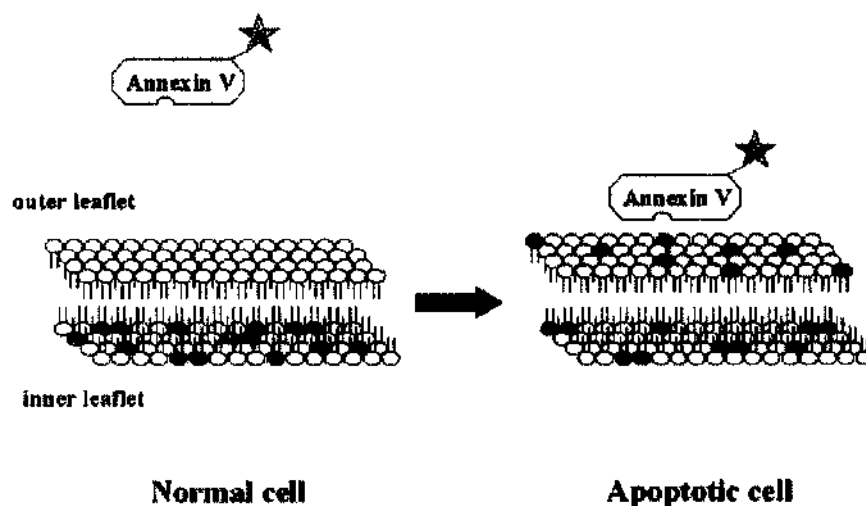


Figura 8. Representació esquemàtica de la pèrdua de l'assimetria lipídica de la membrana durant l'apoptosi. Les cèl·lules vives mantenen l'assimetria estricta de la composició de la bicapa, amb els residus de fosfatidilserina (en negre) en la cara interna. Durant l'apoptosi aquests residus queden exposats en la cara externa i l'Annexina s'hi pot enllaçar.

El PI s'uneix al DNA emetent fluorescència, però en una cèl·lula viva amb la membrana intacta no pot penetrar. Per tant la cèl·lula en **apoptosi recent** és + per l'annexina i - pel PI. La cèl·lula que és + per l'annexina i + pel PI pot ser **necròtica** o **apoptòtica tardana** (quan el procés d'apoptosi ja està molt avançat i la cèl·lula ja està fragmentada).

Els canvis morfològics que es produeixen en les cèl·lules en apoptosi afecten a les propietats de dispersió de la llum de la cèl·lula. Aquest fenomen s'aprofita en la mesura de citometria quan es fa incidir radiació làser sobre el flux de la població cel·lular.

#### Referències bibliogràfiques:

- <sup>1</sup> [http://photonics.cnb.uam.es/Photonic\\_sp/Review/citometria\\_de\\_flujo.htm](http://photonics.cnb.uam.es/Photonic_sp/Review/citometria_de_flujo.htm)
- <sup>2</sup> a) [http://www.opolanco.es/Apat/Boletin\\_2/CI\\_TOFLUJO.htm](http://www.opolanco.es/Apat/Boletin_2/CI_TOFLUJO.htm). b) A. Orfao, M. Gonzalez, J. Ciudad, M.C. Lopez-Berges, A. López, J.F. San Miguel A. López-Borrasca. *Biol. Clin. Hematol.* **1992**. c) T.W. McCloskey, N. Oyaizu, M. Coronesi, S. Pahwa. *Clin. Immunopathol.*, **1994**, 71, 14-18.
- <sup>3</sup> Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota, F. Traganos. *Cytometry*, **1992**, 13, 795-808.
- <sup>4</sup> M. Barinaga. *Science*, **1993**, 259, 762-763.
- <sup>5</sup> W. Bursch. *Biochem. Cell. Biol.*, **1990**, 68, 1071-1074.
- <sup>6</sup> T.G. Cotter. *Anticancer Res.*, **1990**, 10, 1153-1160.
- <sup>7</sup> J. Marx. *Science*, **1993**, 259, 760-761.
- <sup>8</sup> D.L. Vaux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 786-789.
- <sup>9</sup> G.T. Williams. *Cell*, **1991**, 65, 1097-1098.
- <sup>10</sup> M. Van Engeland, L.J.W. Nieland, F.C.S. Ramaekers, B. Schutte, C.P.M. Reutelingsperger. *Cytometry*, **1998**, 31, 1-9.
- <sup>11</sup> Z. Darzynkiewicz, G. Juan, X. Li, W. Gorczyca, T. Murakami, F. Traganos. *Cytometry*, **1997**, 27, 1-20.



