



Università degli Studi di Cagliari

Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche

Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Chimiche

XXVII Ciclo

**STUDIO DI COMPLESSI DI RAME(II) E
PLATINO(II) CON PROPRIETA' ANTITUMORALI**

SSD CHIM/01

Presentata da: Federica Trudu

Relatore: Dott.ssa Tiziana Pivetta

Coordinatore Dottorato: Prof. Mariano Casu

Esame finale A.A. 2013 – 2014



Unione europea
Fondo sociale europeo



Ministero dell'Istruzione
dell'Università e Ricerca



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



Università degli Studi di Cagliari

Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche

Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Chimiche

XXVII Ciclo

**STUDIO DI COMPLESSI DI RAME(II) E PLATINO(II) CON
PROPRIETA' ANTITUMORALI**

SSD CHIM/01

Dott.ssa Federica Trudu

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche dell'Università degli Studi di Cagliari, A.A. 2013/2014 - XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali.

Esame finale A.A. 2013 - 2014

“Ci sono infiniti numeri tra 0 e 1. C’è 0,1 e 0,12 e 0,112 e una lista infinita di altri numeri. Naturalmente c’è una serie infinita di numeri ancora più grande tra 0 e 2, o tra 0 e un milione. Alcuni infiniti sono più grandi di altri infiniti.”

— John Green, Colpa delle stelle

Abstract

Cisplatin is one of the most active drugs in anticancer therapy, and it is currently used for the treatment of a wide range of cancers, in particular advanced ones. After its introduction in clinical therapy, the research in this field has focused on the preparation of new metal complexes with increased activity and lower side-effects. Besides, the use of drug combinations with synergistic effect, *i.e.* an effect greater than the sum of the effects of the single drugs, has been introduced. This thesis is focused on the preparation of Cu(II) and Pt(II) complexes and on the study of their cytotoxic properties, alone or in combination with cisplatin.

Cu(II) complexes with 1,10-phenantroline (phen), 1,10-phenantroline-5,6-dione and 1,10-phenantroline-5,6-diol, with 1:1 or 1:2 metal:ligand stoichiometry, have been synthesized. In addition, mixed Cu(II) complexes with phen and thiophene derivatives of general formula $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T})](\text{ClO}_4)_2$ (T=1-methylthio-thiophene-2-carboxylic acid, 2-methylthio-thiophene-1-carboxylic acid, 2-thiophenecarboxamide, 2-thiophenecarboxylate) have been prepared. A family of Pt(II) complexes of general formula $[\text{Pt}(\text{P})(\text{D})_2](\text{ClO}_4)_2$, being P a derivative of phen and D a derivative of imidazolidin-2-thione, has been synthesized.

In order to find the species present in solution in conditions similar to the physiological ones (37 °C and NaCl 0.1 M), the formation constants of the complexes have been determined through potentiometric titrations. The dipole moments of the platinum complexes have been determined through quantum mechanical calculations.

The *in vitro* cytotoxic activity of ligands and metal complexes has been evaluated against a panel of human tumour cell lines, and it has been correlated to their structures.

Finally, a new method, based on experimental design and artificial neural networks, has been proposed for the evaluation of the synergy in mixtures of two or more drugs. Exploiting this method, the cytotoxic activity of mixture of cisplatin and three Cu(II) complexes $([\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2)$, $([\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2)$ e $([\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{imidazolidin-2-thione})](\text{ClO}_4)_2)$ has been studied, and the combination with higher synergistic effect have been identified.

Riassunto

Nel campo della terapia antitumorale, il cisplatino è uno dei chemioterapici più attivi ed è tuttora utilizzato per il trattamento di numerosi tipi di cancro, soprattutto in fase avanzata. Dopo la sua introduzione nella pratica clinica, la ricerca si è focalizzata sull'individuazione di nuovi complessi metallici con maggiore attività antitumorale e minori effetti collaterali. Inoltre, è stata ampiamente introdotta in pratica clinica la somministrazione di più farmaci il cui effetto totale è sinergico ossia maggiore della somma degli effetti dei singoli farmaci. Il presente lavoro di tesi è incentrato sulla preparazione di complessi di Cu(II) e Pt(II) e sullo studio delle loro proprietà antitumorali, da soli o in combinazione con il cisplatino.

Sono stati sintetizzati dei complessi di Cu(II) con stechiometria 1:1 e 1:2 con 1,10-fenantrolina (phen), 1,10-fenantrolin-5,6-dione e 1,10-fenantrolin-5,6-diolo. Inoltre, è stata preparata una serie di complessi misti di Cu(II) con phen e leganti derivati dal tiofene con formula generale $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T})](\text{ClO}_4)_2$ (T= acido 2-metiltio-tiofene-3-carbossilico, acido 3-metiltio-tiofene-2-carbossilico, tiofene-2-carbossiammide; tiofene-2-carbossilato di metile). E' stata sintetizzata una famiglia di complessi di Pt(II) con formula generale $[\text{Pt}(\text{P})(\text{D})_2](\text{ClO}_4)_2$, in cui P è un derivato della phen e D un derivato dell'imidazolidin-2-tione.

Al fine di determinare quali specie sono presenti in soluzione in condizioni simili a quelle fisiologiche (37 °C e NaCl 0.1 M), sono state determinate le costanti di formazione dei complessi attraverso titolazioni potenziometriche. I momenti di dipolo dei complessi di platino sono stati determinati attraverso calcoli quantomeccanici.

L'attività citotossica *in vitro* di leganti e complessi metallici è stata valutata nei confronti di linee tumorali umane ed è stata correlata alla struttura.

Infine, è stato proposto un nuovo metodo per lo studio della sinergia nelle combinazioni a due o più farmaci, basato sull'utilizzo di un disegno sperimentale per la progettazione dell'esperimento e sull'uso delle reti neurali artificiali per l'elaborazione dei dati. Sfruttando questo nuovo metodo è stata studiata l'attività citotossica di miscele di cisplatino con tre complessi di Cu(II) ($[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$, $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{imidazolidin-2-tione})](\text{ClO}_4)_2$) e sono state individuate le combinazioni con il maggiore effetto sinergico.

Publicazioni

Parte del contenuto di questa tesi è stato pubblicato nei seguenti articoli:

- T. Pivetta, F. Trudu, E. Valletta, F. Isaia, C. Castellano, F. Demartin, R. Tuveri, S. Vascellari, and A. Pani. Novel Copper(II) complexes as new promising antitumour agents. Crystal structure of $[\text{Cu}(1,10\text{-phenanthroline-5,6\text{-dione})}_2(\text{OH})_2(\text{OCIO}_3)](\text{ClO}_4)$. *Journal of Inorganic Biochemistry* (2014) 141, 103–113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.08.011>

(Risultati e Discussione paragrafi 2, 3 e 4)

- T. Pivetta, F. Isaia, F. Trudu, A. Pani, M. Manca, D. Perra, F. Amato, and J. Havel. Development and validation of a general approach to predict and quantify the synergism of anti-cancer drugs using experimental design and artificial neural networks. *Talanta* (2013) 115, 84-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.031>

(Risultati e Discussione paragrafo 6)

Sommario

<i>Abstract</i>	7
<i>Riassunto</i>	8
<i>Pubblicazioni</i>	9
<i>Sommario</i>	10
<i>Abbreviazioni</i>	13
Introduzione	15
1 - I tumori	
1.1 Incidenza e mortalità	17
1.2 Caratteristiche delle cellule tumorali	18
1.3 Eterogeneità delle cellule tumorali	20
1.4 Angiogenesi	20
1.5 Processi metastatici	20
2 - La chemioterapia antitumorale	
2.1 I farmaci chemioterapici	21
2.2 Studio della citotossicità di un farmaco	22
3 - Complessi di platino usati in terapia antitumorale	
3.1 Il cisplatino	23
3.2 Effetti collaterali nella terapia con cisplatino	24
3.3 Farmacoresistenza nella terapia con cisplatino	26
3.4 Altri chemioterapici a base di platino(II)	27
4 - Il ruolo del rame in terapia antitumorale	
4.1 Funzioni biologiche e tossicità	29
4.2 Trasporto e omeostasi	30
4.3 Meccanismi sfruttati dal cisplatino	30
4.4 Complessi di rame in terapia antitumorale	31
5 - La terapia combinatoria	
5.1 Terapie combinatorie basate sull'uso del cisplatino	33
5.2 Terapia combinatoria con rame	34
<i>Scopo del lavoro</i>	36
<i>Glossario</i>	39
<i>Bibliografia</i>	41

Parte Sperimentale	47
1 - Sintesi dei leganti	49
2 - Sintesi e caratterizzazione dei complessi di Cu(II)	51
3 - Sintesi e caratterizzazione dei complessi di Pt(II)	56
4 - Misure potenziometriche	59
5 - Calcoli teorici	60
<i>Strumentazione</i>	61
<i>Bibliografia</i>	62
Risultati e Discussione	63
1 - Sintesi e caratterizzazione dei leganti derivati dalla 1,10-fenantrolina	
1.1 Phendione	65
1.2 Phendiolo	65
1.3 Phendiossima	66
1.4 Phendiammina	68
1.5 Phenditione	70
2 - Studio in soluzione degli equilibri tra Cu(II) e phen e phendione	
2.1 Determinazione delle costanti di protonazione di phen e phendione a 25 e 37 °C	72
2.2 Determinazione delle costanti di idrolisi di Cu(II) a 25 e 37°C	73
2.3 Determinazione delle costanti di formazione dei complessi di Cu(II)	74
3 - Sintesi dei complessi di Cu(II)	
3.1 Sintesi dei complessi con phendione e phendiolo	79
3.2 Descrizione della struttura molecolare di [Cu(phendione) ₂ (H ₂ O)(ClO ₄)](ClO ₄)	81
3.3 Sintesi dei complessi con leganti tiofenici	82
4 - Attività citotossica dei complessi di Cu(II)	82
4.1 Complessi con leganti fenantrolinici	83
4.2 Complessi con leganti tiofenici	84
5 - Sintesi e attività citotossica dei complessi di Pt(II)	
5.1 Sintesi dei complessi di Pt(II)	87
5.2 Studio del momento di dipolo dei complessi di Pt(II)	88
5.3 Attività citotossica dei complessi di Pt(II)	89
5.4 Confronto con i complessi di Cu(II)	92
6 - Studio delle combinazioni di cisplatino e complessi di Cu(II)	
6.1 Definizione di effetto additivo e di sinergia	93
6.2 Scelta delle combinazioni da studiare	95
6.3 Costruzione della rete neurale artificiale	95
6.4 Sistema cisplatino-[Cu(phen)(H ₂ O) ₂ (ClO ₄) ₂]	96

6.5 Sistema cisplatino-[Cu(phen) ₂ (H ₂ O)](ClO ₄) ₂	99
6.6 Sistema cisplatino-[Cu(phen) ₂ (Dit)](ClO ₄) ₂	102
Bibliografia	104
Conclusioni	109
0	
	111
Conclusioni	
2 - Prospettive	113
Ringraziamenti	114
Appendice I. Taratura del pHmetro con il metodo di Gran	113
Appendice II. Determinazione delle costanti di formazione di un complesso metallico per via potenziometrica	116
Appendice III. Disegno Sperimentale	118
Appendice IV. Reti neurali artificiali	120
Bibliografia	124

Abbreviazioni

CC ₅₀	Concentrazione di composto necessaria a inibire del 50 % la proliferazione cellulare
DMSO	Dimetilsolfossido
DMF	Dimetilformammide
DNA	Acido Desossiribonucleico
DS	Disegno Sperimentale
E ⁰	Potenziale standard di elettrodo
Et	Etile
F	Costante di Faraday
<i>m/z</i>	Rapporto massa su carica
Me	Metile
R	Costante universale dei gas
RNA	Reti Neurali Artificiali
ROS	Specie Reattive dell'Ossigeno

Introduzione

1 - I tumori

2 - La chemioterapia antitumorale

*3 - Complessi di platino usati in terapia
antitumorale*

4 - Il ruolo del rame in terapia antitumorale

5 - La terapia combinatoria

Scopo del lavoro

Glossario

Bibliografia

1 - I tumori

Con il termine tumore o neoplasia, si intendono un insieme di malattie caratterizzate da un alto tasso di divisione cellulare. Una cellula diventa cancerosa in seguito a una o più mutazioni nel suo DNA che portano ad un'incrementata proliferazione cellulare e all'inibizione dell'apoptosi. Inoltre, le cellule tumorali possono essere in grado di invadere i tessuti sani attraverso un processo detto metastatizzazione. In questo caso le cellule tumorali sono morfologicamente e funzionalmente diverse da quelle sane e si parla di tumore maligno o cancro.

1.1. Incidenza e mortalità

Il cancro è la seconda causa di morte nei paesi più sviluppati, preceduto solo dalle malattie cardiovascolari. Come si evince dai dati riportati in **Tabella 1**, l'incidenza e la mortalità sono più alte negli uomini. Escludendo i tumori specifici per genere (prostata, seno, cervice uterina), negli uomini il più alto numero di casi è costituito da tumore ai polmoni mentre nelle donne è quello al colon-retto.

	Uomini	Donne
Rischio di sviluppare un tumore prima dei 75 anni¹	21.0 %	16.4 %
Rischio di morire di tumore prima dei 75 anni¹	12.7 %	8.4 %
5 tipi di tumore più frequenti	Polmoni, Prostata, Colon-retto, Stomaco, Fegato	Seno, Colon-retto, Polmoni, Cervice uterina, Stomaco

TABELLA 1 RISCHIO DI TUMORE NEL MONDO NEL 2012 (FERLAY ET AL. 2013).

E' interessante osservare che il rischio di sviluppare un tumore nei paesi più sviluppati è molto più alto di quello nei paesi meno sviluppati (**Tabella 2**): negli uomini aumenta quasi del 50 % mentre nelle donne la differenza è meno marcata. Questa differenza è considerevole poiché il dato è calcolato come numero di nuovi nati che svilupperanno un tumore prima dei 75 anni. Si può vedere anche come l'incidenza del tumore allo stomaco sia inferiore nei paesi sviluppati e nelle donne.

¹ Il rischio di sviluppare (morire) a causa di tumore è calcolato come numero di nuovi nati per numero di casi (di morte) di tumore nella popolazione (in assenza di altre cause di morte).

Alcuni tumori, come quello alla prostata, hanno un'incidenza maggiore nelle zone più sviluppate.

	Paesi più sviluppati		Paesi meno sviluppati	
	Uomini	Donne	Uomini	Donne
Rischio di sviluppare un tumore prima dei 75 anni¹	30.9 %	23.3 %	16.6 %	13.4 %
Rischio di morire di tumore prima dei 75 anni¹	14.3 %	9.0 %	12.0 %	8.1 %
5 tipi di tumore più frequenti	Prostata Polmoni Colon-retto Vescica Stomaco	Seno Colon-retto Polmoni Cervice uterina Ovaie	Polmoni Fegato Stomaco Prostata Colon-retto	Seno Cervice uterina Polmoni Colon-retto Stomaco

TABELLA 2 RISCHIO DI TUMORE IN PAESI PIÙ E MENO SVILUPPATI NEL 2012 (FERLAY ET AL. 2013).

L'incidenza non appare correlata alla mortalità per lo stesso tipo di cancro. Infatti, tumori con alta incidenza come quello alla prostata nei paesi sviluppati ha un tasso di mortalità minore di quello allo stomaco, che ha un'incidenza minore (Figura 1).

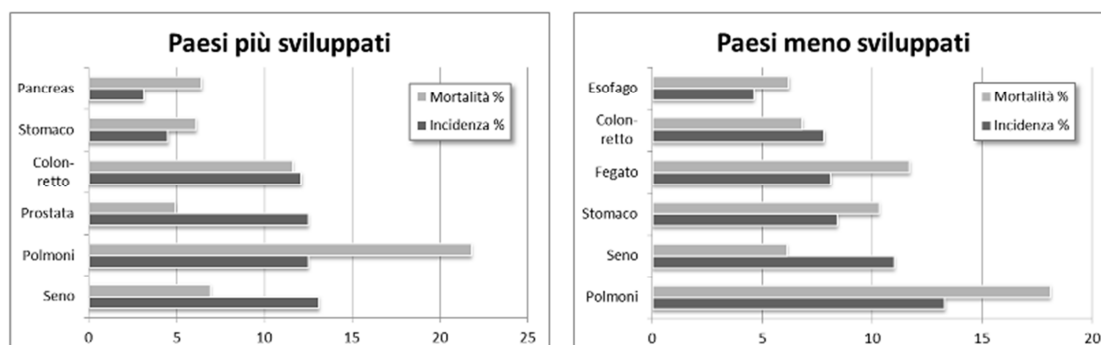


FIGURA 1 INCIDENZA E MORTALITÀ DEI TUMORI NEI PAESI PIÙ E MENO SVILUPPATI NEL 2012 (FERLAY ET AL. 2013).

Bisogna rimarcare che i dati si basano sui casi di tumore diagnosticati e quindi variano da paese a paese a seconda dell'accesso della popolazione al sistema sanitario, della presenza di campagne di diagnosi precoce e dalla disponibilità di cure mediche avanzate.

1.2. Caratteristiche delle cellule tumorali

Una cellula tumorale possiede due caratteristiche che la differenziano in modo significativo da una cellula sana: perdita della regolazione della proliferazione cellulare e soppressione dell'apoptosi.

In una cellula sana, la divisione cellulare avviene solo in risposta a segnali mitogeni esterni. Nella maggior parte dei tumori ci sono delle modificazioni in ogni meccanismo di regolazione della proliferazione cellulare (Evan and Vousden 2001). In alcuni tumori la divisione cellulare è indotta in assenza di segnali mitogeni esterni. Questo può avvenire per produzione autocrina dei mitogeni o mutazione di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. Un'analogia soppressione dei meccanismi di controllo cellulare si può avere per mutazioni nel check-point al termine della fase di crescita preparatoria alla mitosi G1, che portano la cellula a ricominciare il ciclo cellulare passando alla fase di replicazione del DNA S e quindi a dividersi. Allo stesso modo, la sovraespressione di alcuni geni come il Myc che codifica per un fattore di trascrizione che regola l'espressione di altri geni. La mutazione del Myc porta ad avere un'espressione anormale di questi geni, di cui molti sono coinvolti nei meccanismi di proliferazione cellulare.

Inoltre, le cellule sane possiedono dei meccanismi interni che regolano il numero di volte che la cellula può dividersi. Una volta raggiunto questo limite, le cellule entrano in uno stato detto di senescenza cellulare e non si replicano più (Alberts et al. 2002). L'innescarsi della senescenza sembra causato da modificazioni nella struttura dei telomeri, la cui sintesi è regolata dall'enzima telomerasi. Nella specie umana le telomerasi sono attive nelle cellule germinali e nelle cellule staminali ma non nelle cellule somatiche, che rappresentano la maggior parte delle cellule del corpo e dalla cui mutazione generalmente si originano i tumori. L'assenza di attività telomerasica porta all'accorciamento dei telomeri dopo ogni divisione cellulare. Dopo un certo numero di cicli questo processo porta al danneggiamento del DNA alla fine del cromosoma e si innesca l'apoptosi nella cellula. La maggior parte dei tumori è però in grado di sintetizzare la telomerasi ed è quindi in grado di impedire l'accorciamento dei telomeri e l'ingresso della cellula nella fase di senescenza.

Condizioni di stress cellulare quali danni al DNA, ipossia, carenza di nutrienti, inducono di norma l'attivazione dei meccanismi di apoptosi. Le cellule tumorali sviluppano mutazioni in grado di inibire l'attivazione di questi meccanismi. Ad esempio, la proteina p53 è un fattore di trascrizione coinvolto nella trasduzione dei segnali di stress in risposte cellulari che portano all'apoptosi. In circa la metà dei tumori, la p53 esiste in forme modificate che non sono in grado di indurre l'apoptosi (Woods and Vousden 2001).

1.3. Eterogeneità delle cellule tumorali

Un aspetto importante del cancro è la sua eterogeneità. Infatti, essendo causato da mutazioni casuali nel DNA cellulare, esistono moltissimi tipi diversi di cancro, attualmente più di 100. La maggior parte dei tumori prende il nome dall'organo o tipo di cellula in cui si è sviluppato. Spesso cellule dello stesso organo possono dare vita a tumori diversi, caratterizzati da specifici profili molecolari, morfologie ed espressione di marker. Inoltre, anche all'interno della stessa massa tumorale le cellule si dividono in diverse sottopopolazioni. Questo fenomeno può essere spiegato secondo due modelli: nel primo modello si ipotizza che la cellula tumorale madre subisca diverse mutazioni che originano ciascuna una diversa popolazione tumorale; nel secondo modello invece le cellule tumorali subiscono mutazioni successive, creando diversi tipi di tumore (Visvader 2011). Entrambi i modelli possono coesistere all'interno dello stesso tumore.

1.4. Angiogenesi

La crescita della massa tumorale fino ai 2 mm di diametro è sostenuta da diffusione passiva di ossigeno e nutrienti. L'ambiente tumorale presenta una quantità di ossigeno minore rispetto ai tessuti normali: questa condizione viene definita ipossia. Oltre questa dimensione il tumore ha bisogno di formare nuovi vasi sanguigni. Questo processo è chiamato angiogenesi ed è un processo che avviene anche nei tessuti sani stimolati da proteine o fattori di crescita come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF). È stato dimostrato che la presenza di rame è necessaria per l'attivazione dell'angiogenesi e spesso i tumori presentano livelli di rame più alti del normale (Santini et al. 2014). Le cellule tumorali sono in grado di secernere le molecole attivatrici dell'angiogenesi, formando nuovi vasi che si fondono con quelli preesistenti e iniziano la circolazione sanguigna all'interno della massa tumorale. Questo porta ad un'aumentata capacità proliferativa del tumore, dovuta ad un'aumentata disponibilità di nutrienti, ossigeno e fattori di crescita. Tuttavia, i vasi sanguigni di formazione tumorale sono altamente disorganizzati e inefficienti rispetto ai vasi sanguigni normali e rimangono regioni ipossiche all'interno del tumore (Milane et al. 2011).

1.5. Processi metastatici

Una volta avviato il processo di angiogenesi, il tumore può raggiungere altri organi. Il processo in cui si forma una seconda neoplasia distante dal tumore primario viene detto metastatizzazione e la formazione neoplastica è detta metastasi. Solo alcune cellule

tumorali hanno caratteristiche metastatiche e si distaccano dalla massa tumorale primaria (Fidler 1978). La seconda neoplasia è formata da cloni della cellula metastatica che le ha originate e può quindi essere differente dal tumore primario (Waghorne et al. 1988).

La metastatizzazione è composta da più fasi:

- Invasione dei tessuti sani vicini;
- Ingresso nei vasi sanguigni o linfatici;
- Circolazione passiva;
- Arresto nell'organo bersaglio ed uscita dal circolo sanguigno o dal sistema linfatico;
- Proliferazione nel nuovo sito.

Di tutte le cellule metastatiche solo lo 0.01 % sopravvive all'eliminazione da parte del sistema immunitario dell'organismo (Talmadge and Fidler 2010). I siti di metastatizzazione più comuni sono le ossa, il fegato e i polmoni.

2 - La chemioterapia antitumorale

Le terapie attualmente utilizzate contro i tumori sono la radioterapia, l'immunoterapia, l'asportazione chirurgica (ove possibile) e la chemioterapia. La chemioterapia antitumorale consiste nella somministrazione di sostanze in grado di uccidere le cellule tumorali o di inibirne la proliferazione. La chemioterapia viene usata da sola o in combinazione con gli altri trattamenti per aumentarne l'efficacia (vedi **La terapia combinatoria**).

2.1.1 farmaci chemioterapici

I composti utilizzati in chemioterapia possono essere suddivisi in diverse classi:

- **Agenti alchilanti del DNA**

Sono composti in grado di trasferire un gruppo alchilico al DNA, provocando appaiamenti di basi errati e rotture nei filamenti.

- **Complessi di platino**

Inibiscono la proliferazione cellulare danneggiando in modo irreversibile il DNA attraverso la formazione di addotti.

- **Antimetaboliti**

Sono molecole chimicamente simili ad alcuni metaboliti cellulari a cui si sostituiscono, bloccando il relativo processo cellulare e interferendo con la sintesi del DNA e/o la proliferazione cellulare. Nel caso degli antimetaboliti simili alle basi del DNA come il Fluorouracile (5-FU) (analogo del uracile) o la gemcitabina (analogo della pirimidina), essi si sostituiscono alle basi del DNA.

- **Antibiotici**

A questa classe appartengono diversi composti tra cui le antracicline (doxorubicina, daunobicina). Questi composti agiscono attraverso diversi meccanismi di azione come l'intercalazione tra coppie di basi, l'alchilazione del DNA o la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

- **Derivati naturali**

Ne fanno parte alcaloidi della vinca, tassoidi, epipodofillotossine, curcumina, ed altre molecole estratte da vegetali o loro versioni semisintetiche. I loro meccanismi di azione sono svariati. Ad esempio gli alcaloidi della vinca (vincristina, vinblastina) e i tassoidi bloccano la riproduzione cellulare impedendo la funzione dei microtuboli. Le epipodofillotossine (etoposide, teniposide) invece sono inibitori delle topoisomerasi I e II.

2.2. Studio della citotossicità di un farmaco

Per determinare sperimentalmente la citotossicità di un farmaco si misura il rapporto tra il numero di cellule vitali trattate con il farmaco rispetto al numero di cellule vitali del controllo. Questo rapporto viene definito come vitalità ma solitamente si esprimono i dati con il suo inverso ossia la mortalità. Ad esempio, un farmaco che ad una data concentrazione ha una mortalità del 97 %, è in grado di uccidere 97 cellule ogni 100.

Il numero di cellule vitali viene solitamente misurato tramite metodi colorimetrici in cui si usa un reattivo che cambia colore reagendo con un prodotto del metabolismo cellulare. Tra i reattivi standard più utilizzati ci sono l'MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) o il trypan blue. Viene quindi misurata l'assorbanza dei campioni sia di controllo che trattati con il farmaco.

Per confrontare l'attività citotossica di farmaci diversi viene determinata la curva dose-risposta del farmaco. La curva dose-risposta si costruisce misurando la mortalità del farmaco a diverse concentrazioni. Dalla curva dose-risposta è possibile ricavare la concentrazione necessaria a uccidere il 50 % delle cellule, che viene chiamata CC_{50} ; minore è il valore, maggiore è l'attività citotossica del farmaco. Il valore di CC_{50} permette di confrontare tra loro farmaci diversi: il farmaco più attivo è quello che possiede una CC_{50} minore. Non è però possibile confrontare tra loro valori di CC_{50} ottenuti su linee cellulari diverse.

I farmaci che mostrano risultati promettenti nei test su linee cellulari (*in vitro*) vengono sottoposti a test *in vivo* in cui vengono somministrati ad animali, principalmente topi e ratti, allo scopo di individuare la dose massima tollerata, il metodo di somministrazione più adatto, l'efficacia terapeutica ed eventuali effetti collaterali. Nell'Unione Europea qualsiasi studio che comprenda una sperimentazione animale deve comunque essere approvato in precedenza dall'autorità competente (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea 2010).

3 - Complessi di platino usati in terapia antitumorale

L'utilizzo di complessi metallici in terapia antitumorale è iniziato dopo la scoperta delle proprietà antiproliferative del cis-diamminodichloroplatino(II) (cisplatino) da parte di Rosenberg nel 1965 (Monneret 2011). Nei suoi studi sull'effetto del campo elettrico sulla crescita dei batteri, Rosenberg si rese conto che la divisione cellulare era impedita a causa di un composto di platino che si formava durante il processo a partire dagli elettrodi in platino (Rosenberg et al. 1965). Studi successivi portarono all'identificazione di questa specie con il cisplatino (Rosenberg et al. 1967). Da allora sono stati fatti grandi sforzi per trovare altri complessi di platino che possiedano maggiore efficacia.

3.1. Il cisplatino

Le caratteristiche che hanno reso il cisplatino così importante in terapia antitumorale sono la sua attività antiproliferativa contro un'ampia gamma di tumori e la sua notevole efficacia (Siddik 2003). Il cisplatino viene iniettato per via endovenosa dove si lega a diverse proteine quali albumina, emoglobina e transferrina (Rudnev et al. 2005). Il

cisplatino entra nelle cellule per diffusione passiva e attraverso il trasportatore di membrana del rame (Ctr1). All'interno della cellula, la concentrazione di ioni cloruro è molto inferiore a quella plasmatica (circa 4-20 mM contro 100 mM) e il cisplatino subisce una reazione di idrolisi (Wheate et al. 2010). Il complesso $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]^+$ (**Figura 2 a**) formatosi reagisce con il DNA dando origine ad un addotto monofunzionale (**b**). Successivamente si può avere la formazione diretta dell'addotto bifunzionale (**e**) con il DNA per perdita del secondo ione cloruro oppure la sostituzione dello ione cloruro con una molecola d'acqua (**c**) e la successiva formazione dell'addotto bifunzionale (Alderden et al. 2006).

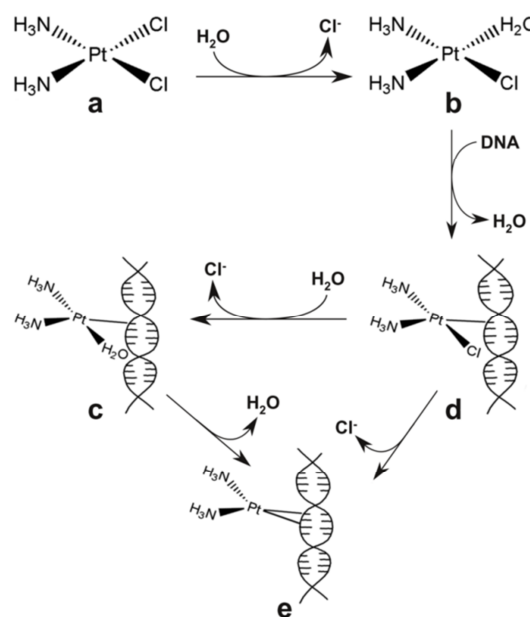


FIGURA 2 INTERAZIONE DEL CISPLATINO CON IL DNA.

Gli addotti bifunzionali possono essere di diversi tipi: 1,2-intrafilamento con guanine adiacenti o con un'adenina e una guanina adiacenti; 1,3-intrafilamento con guanine non adiacenti; addotti interfilamento. La formazione di questi addotti porta ad una distorsione nella doppia elica del DNA. Questa viene individuata dalle proteine deputate al riconoscimento dei danni al DNA che iniziano il processo apoptotico.

3.2. Effetti collaterali nella terapia con cisplatino

I due maggiori limiti nell'uso del cisplatino in terapia antitumorale sono l'insorgere di effetti collaterali (**Figura 3**) e di resistenza al farmaco (vedi **Farmacoresistenza nella terapia con cisplatino**). Gli effetti collaterali di lieve entità sono nausea, vomiti e astenia, e si manifestano nelle ore immediatamente successive alla somministrazione. Vengono

controllati con la somministrazione di antiemetici dopo il trattamento. Tra gli effetti collaterali più gravi vi è la perdita della funzionalità renale. Poiché la nefrotossicità può essere limitata tramite idratazione pre- e post-trattamento, l'effetto collaterale più grave del trattamento con cisplatino resta la neurotossicità. I sintomi includono intorpidimento, formicolio e difficoltà motorie di vario genere e gravità, che persistono fino a 4 anni dal termine del trattamento (Boulikas et al. 2007).

EFFETTI COLLATERALI DEL CISPLATINO

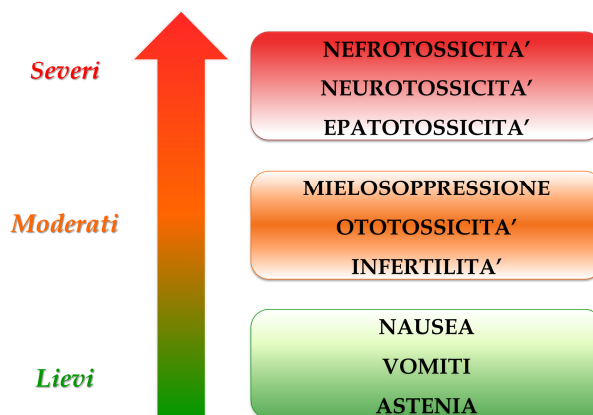


FIGURA 3 EFFETTI COLLATERALI PIÙ COMUNI DEL TRATTAMENTO CON CISPLATINO.

Gli effetti collaterali del cisplatino possono essere talmente gravi da limitarne la dose somministrabile a quantità insufficienti per la completa eliminazione delle cellule tumorali, come ad esempio nei tumori alle ovaie (Wheate et al. 2010). In questi casi la nefrotossicità è solitamente la tossicità dose-limitante (Arany and Safirstein 2003).

Infine, la somministrazione per via ematica del cisplatino rappresenta un altro limite del trattamento. Una soluzione salina è iniettata per tre ore tra le 12 e le 24 ore precedenti al trattamento. L'infusione di cisplatino dura tra le 0.5 e le 2 ore ed è seguita dalla somministrazione di soluzione salina per altre 24 ore (Arany and Safirstein 2003). La soluzione salina è indispensabile per aumentare l'idratazione del paziente e alleviare la tossicità renale. Questo però prolunga ulteriormente la durata complessiva del trattamento. Lo sviluppo di farmaci somministrabili per via orale contribuisce in modo significativo al miglioramento della qualità di vita del paziente. Per questo, diversi complessi di platino sono stati studiati per essere somministrati oralmente, come ad esempio il satraplatino (Wosikowski et al. 2007). Purtroppo nessuno dei composti studiati è stato approvato per uso clinico, avendo dimostrato scarsa attività antitumorale nei trial clinici.

3.3. Farmacoresistenza nella terapia con cisplatino

Le cellule tumorali possono mostrare una resistenza di tipo innato o acquisito. Se il tumore non risponde al primo trattamento con il farmaco si parla di resistenza innata. Ad esempio, alcuni tumori hanno una resistenza innata al cisplatino come alcune forme di carcinoma al colon-retto, alla prostata e ai polmoni (Galluzzi et al. 2014). Se invece nel tumore esiste un sottogruppo di cellule che ha sviluppato una mutazione in grado di bloccare, in parte o completamente, l'azione del farmaco, esse saranno in grado di sopravvivere al primo ciclo chemioterapico. Il tumore sarà quindi formato solo dalle cellule sopravvissute o da loro forme mutate ed acquisirà quindi resistenza al farmaco. Cicli successivi di trattamento avranno quindi minore efficacia e saranno necessarie dosi maggiori di farmaco. Oltre la resistenza al singolo farmaco, alcuni tipi di tumore sviluppano resistenza verso farmaci della stessa famiglia chimica (resistenza incrociata) o tra farmaci anche strutturalmente diversi (resistenza multifarmaco o multidrug resistance MDR). L'insorgere di resistenza acquisita dopo il primo trattamento è il limite maggiore dell'impiego clinico del cisplatino. La farmacoresistenza è dovuta ad una molteplicità di meccanismi; questo rende molto difficile trovare un modo per superarla. Nel caso del cisplatino sono stati individuati cinque meccanismi principali con cui la cellula tumorale diviene resistente all'effetto del farmaco:

- **Diminuzione dell'ingresso del cisplatino nella cellula**

L'espressione di Ctr1 viene diminuita e questo porta ad una diminuzione della quantità di cisplatino che entra nella cellula (Kuo et al. 2012).

- **Aumento dell'efflusso di cisplatino nella cellula**

Si ha un aumento dell'espressione di proteine che hanno funzione di pompe di efflusso come la Multidrug resistance protein (MRP-2) e la proteina trans-membrana ATP7B che regola l'efflusso del rame (Komatsu et al. 2000, Leslie et al. 2005). Questo porta ad un minore accumulo di cisplatino nella cellula.

- **Maggiore disattivazione da parte di molecole con gruppi tiolici**

Si ha un'aumentata quantità di molecole con gruppi tiolici in grado di disattivare il cisplatino per formazione di complessi. Il principale è il glutatione (GSH) ma anche la tioredoxina-1 e la tioredoxina-1 reduttasi sembrano implicate nella resistenza al cisplatino (Behrens et al. 1987, Sasada et al. 1999).

- **Incremento della capacità di riparazione del DNA**

I meccanismi di riparazione del DNA come il mismatch repair (MMR) e l'escissione di nucleotidi o nucleotide excision repair (NER) (in particolare il Excision Repair Cross Complementing 1 (ERCC-1)) sono potenziati. Questo porta ad un'aumentata rimozione degli addotti cisplatino-DNA senza induzione di apoptosi nella cellula tumorale (Siddik 2003).

- **Maggiore tolleranza ai danni al DNA e inibizione dell'apoptosi**

Una maggiore tolleranza ai danni al DNA può essere data da una sovra-espressione di polimerasi β che, contrariamente alle altre polimerasi umane, prosegue nel processo di replicazione del DNA senza riconoscere gli addotti con il cisplatino. L'inibizione del processo di apoptosi nelle cellule resistenti può essere dovuta ad alti livelli di inibitori dell'apoptosi o a bassi livelli di promotori dell'apoptosi (Kartalou and Essigmann 2001).

A seconda del tipo di tumore, questi meccanismi possono essere presenti singolarmente o in contemporanea.

3.4. Altri chemioterapici a base di platino(II)

Attualmente sono stati approvati a livello mondiale per il trattamento del cancro solo altri due complessi di platino(II) oltre il cisplatino: il carboplatino e l'oxaliplatino.

Il carboplatino, *cis*-diammino(1,1-ciclobutandicarbossilato)platino(II) (**Figura 4 A**), presenta un gruppo uscente più stabile rispetto allo ione cloruro. Il carboplatino ha quindi una minore reattività e minori effetti collaterali. Il suo meccanismo d'azione è analogo a quello del cisplatino con formazione degli stessi addotti con il DNA ma in diversa proporzione e con una cinetica più lenta. Nel carboplatino l'addotto che si forma in quantità maggiore (40 %) è quello intrafilamento tra due guanine non adiacenti (Blommaert et al. 1995). La tossicità dose limitante è dovuta a mielosoppressione (Calvert et al. 1982). Il carboplatino ha sostituito il cisplatino nel trattamento di alcuni tipi di tumore come il carcinoma polmonare a grandi cellule in stato avanzato, metastatico o ricorrente e nel carcinoma alle ovaie ricorrente o in stato avanzato. Sebbene abbiano la stessa attività citotossica, l'uso del carboplatino presenta alcuni vantaggi rispetto al cisplatino: il trattamento è più breve e meno costoso; la minore tossicità del carboplatino permette l'utilizzo di dosi maggiori di farmaco e consente di prolungare la durata del trattamento (Lebwohl and Canetta 1998). I tumori resistenti al cisplatino manifestano resistenza incrociata al carboplatino.

L'oxaliplatino, 1,2-diamminocicloesano-ossalato-platino(II) (**Figura 4 B**), presenta attività citotossica derivante dalla formazione di addotti con il DNA. Contrariamente al carboplatino, in questo caso gli addotti sono differenti da quelli formati dal cisplatino. L'oxaliplatino non presenta resistenza incrociata con il cisplatino e questo è dovuto al fatto che gli addotti che forma con il DNA non vengono riconosciuti e corretti dalle proteine del MMR (Fink et al. 1996). Inoltre, esso non interagisce con Ctr1 ed è quindi efficace in tumori in cui la resistenza al cisplatino è dovuta alla diminuzione dell'influsso nella cellula (Holzer et al. 2006). L'oxaliplatino è usato per il trattamento di tumori resistenti al cisplatino e in particolare nel cancro al colon-retto in cui è somministrato con 5-FU e leucovorin in una combinazione chiamata FOLFOX (Maindrault-Goebel et al. 1999). Nel caso dell'oxaliplatino la tossicità dose limitante è l'insorgere di episodi di neuropatia periferica che non possono essere previsti.

Nedaplatino, lobaplatino e heptaplatino (vedi **Figura 4 C-E**) sono stati approvati per uso clinico solo in Giappone, Cina e Corea del Sud, rispettivamente (Wheate et al. 2010).

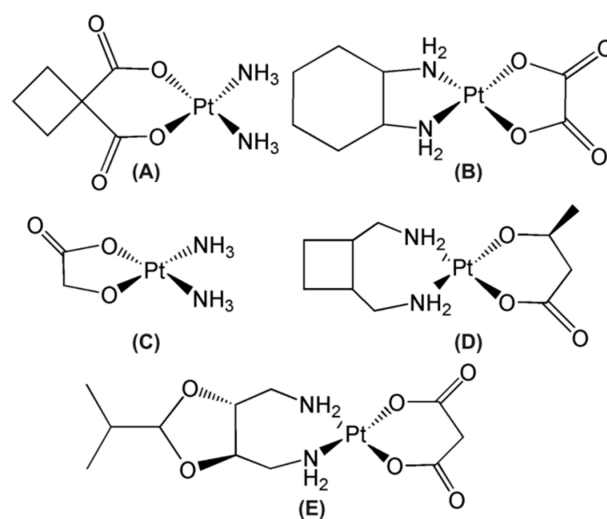


FIGURA 4 STRUTTURE DI CARBOPLATINO (A), OXALIPLATINO (B), NEDAPLATINO (C), LOBAPLATINO (D) E HEPTAPLATINO (E).

Questi composti non sono stati approvati a livello mondiale poiché non presentano grossi vantaggi terapeutici rispetto al cisplatino. Infatti, il principale limite all'approvazione dei numerosi complessi di platino studiati è rappresentato dal fatto che essi non risolvono i problemi della terapia con cisplatino ossia la tossicità sistemica e l'attività in tumori con resistenza innata o acquisita. Lo studio di complessi di platino sia aventi geometria trans che con stato di ossidazione IV non ha portato al superamento di

questi limiti. La ricerca si è quindi rivolta verso lo studio di complessi con altri metalli di transizione come rame, rutenio e oro.

4 - Il ruolo del rame in terapia antitumorale

Il rame è un metallo essenziale per l'organismo ma è tossico ad alte concentrazioni. Per questo motivo, i livelli di rame nell'organismo sono regolati da un sistema omeostatico. Nonostante la chimica del rame non sia simile a quella del platino è stata trovata una relazione tra i due metalli a livello biologico. Infatti, il cisplatino è in grado di sfruttare diversi meccanismi cellulari deputati al trasporto e omeostasi del rame. Inoltre, alcuni complessi di rame mostrano attività citotossica e sono stati proposti per la chemioterapia antitumorale.

4.1. Funzioni biologiche e tossicità

Alcuni elementi sono essenziali per l'organismo solo in piccole quantità e vengono chiamati elementi in tracce. Essi sono arsenico, cobalto, cromo, fluoro, ferro, iodio, manganese, molibdeno, nichel, rame, selenio, silicio, stagno, vanadio e zinco. Per il rame, la dose giornaliera raccomandata è stimata tra 1.5 e 3.0 mg di Cu (Santini et al. 2014). La sua funzione nell'organismo è quella di cofattore in proteine a funzione enzimatica. Esso è contenuto in enzimi che espletano attività molto diverse tra loro come la produzione dell'energia (citocromo-c ossidasi), la prevenzione di danni ossidativi (superossido dismutasi), la produzione di melanina (tirosinasi), rimodellamento della matrice extracellulare (lisil ossidasi), processi di coagulazione del sangue (fattori V and VIII) e metabolismo del ferro (ceruloplasmina ed efestina) (Tapiero et al. 2003). La sua versatilità come cofattore enzimatico dipende dalla facilità di passaggio in condizioni fisiologiche tra i suoi due stati di ossidazione possibili Cu(I) e Cu(II) (Santini et al. 2014).

La sua tossicità ad alte concentrazioni dipende dalla formazione di ROS da parte del rame libero o alla sostituzione di altri cofattori metallici nelle proteine. Ad esempio, un eccesso di Cu(II) porta alla sostituzione dello Zn(II) presente del recettore per l'estrogeno, alterando la trasduzione del segnale ormonale.

4.2. Trasporto e omeostasi

Negli esseri umani il rame viene assorbito a livello dell'intestino crasso. Il fegato invece è il principale sito di stoccaggio del rame, ne controlla i livelli corporei e ne regola l'escrezione tramite la bile. Nel sangue il rame si trova principalmente legato alla ceruloplasmina come Cu(I) e Cu(II) (Salustri et al. 2010). In questa forma però il rame non può essere ceduto alle cellule (Marzano et al. 2009). Il trasporto del rame avviene quindi tramite legame con l'albumina e in minor misura con molecole a basso peso molecolare come l'istidina. Una volta arrivato alla cellula viene assorbito tramite il trasportatore Ctr1 come Cu(I). Se la cellula è esposta ad alti livelli di rame, Ctr1 viene degradato per limitarne l'assorbimento (Crichton 2008). All'interno della cellula il Cu(I) si lega al glutatione che lo trasferisce alle metallotioneine. Il rame viene poi trasferito alle corrispondenti apoproteine tramite gli chaperones del rame (Harrison et al. 1999). I principali sono:

- Lo chaperone del rame codificato dal gene CCS che trasporta il rame all'enzima superossido dismutasi, il quale svolge un'importante funzione antiossidante a livello cellulare.
- Lo chaperone Cox17 che trasferisce il rame alla citocromo-c ossidasi, un enzima della membrana mitocondriale fondamentale nella respirazione cellulare.
- Lo chaperone ATOX1 che distribuisce il rame alle pompe di efflusso del rame ATP7A e ATP7B, le quali partecipano al suo inserimento nelle proteine in cui è presente come cofattore.

4.3. Meccanismi sfruttati dal cisplatino

Diversi studi hanno provato che il cisplatino viene riconosciuto e trasportato attivamente sia da Ctr1 che da ATP7B (e in minor misura anche da ATP7A (Chen et al. 2008, Holzer et al. 2006, Ishida et al. 2002, Kuo et al. 2007, Wang et al. 2011)). Inoltre, sono state trovate interazioni con ATOX1 e Cox17 (Arnesano et al. 2011, Xi et al. 2013, Zhao et al. 2014). Questo può essere dovuto al fatto che il rame interagisce con queste proteine come Cu(I), il quale può assumere numero di coordinazione 4, che è quello preferito dello ione Pt(II) (Galliani et al. 2014). Inoltre, sia Cu(I) che Pt(II) preferiscono la coordinazione con leganti di tipo soft (Tisato et al. 2010).

4.4. Complessi di rame in terapia antitumorale

Poiché il rame è un metallo essenziale, il suo utilizzo in terapia antitumorale potrebbe portare a farmaci con minore tossicità sistemica rispetto a quelli di metalli non essenziali come il platino. I complessi di Cu(II) con tiosemicarbazoni (TSC) e bis-tiosemicarbazoni sono stati tra i primi ad essere stati studiati. La loro attività citotossica è dovuta all'inibizione dell'enzima ribonucleoside-trifosfato reduttasi, che catalizza la reazione di formazione dei deossiribonucleotidi a partire dai ribonucleotidi ed è quindi fondamentale nella sintesi del DNA. I complessi di Cu(II) con TSC e bis-TSC hanno mostrato inoltre una selettività per le cellule tumorali nei tumori in cui la crescita è favorita da ormoni (Murugkar et al. 1999). La loro applicabilità è limitata dalla scarsa solubilità in acqua (Booth et al. 1974). Complessi di Cu(II) con leganti imidazolicici hanno mostrato attività di superossido dismutasi.

Lo studio di complessi di Cu(II) con leganti macrociclici azotati, quali 1,10-fenantrolina (phen) e 2,2'-bipiridina (bipy), è iniziato con la scoperta di Sigman nel 1979 delle proprietà antitumorali del complesso $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (Sigman et al. 1979). Questo complesso agisce come nucleasi chimica, legandosi al desossiribosio e spezzando la catena del DNA. Il complesso bis-fenantrolina rame(II) mostra attività citotossica in un gran numero di linee cellulari tumorali (Cai et al. 2007, Pivetta et al. 2012). È stato proposto l'utilizzo di leganti con due unità fenantroliniche legate (in posizione 2 o 3) da un serinolo (chiamato Clip) a ponte (Pitié, Donnadieu, et al. 1998). I complessi di rame che contengono questi leganti 2- e 3-Clip-phen mostrano un'attività nucleasica da 2 a 60 volte maggiore del complesso bis-fenantrolina rame(II) (Pitié, Sudres, et al. 1998). Complessi di Cu(II) con bipy o phen e leganti O,O- o N,O-donatori sono stati brevettati con il nome di Casiopeinas® (Trejo-Solís et al. 2012). Questi complessi hanno mostrato attività citotossica sia *in vivo* che *in vitro* ma il loro meccanismo d'azione non è ancora chiaro (Bravo-Gómez et al. 2013, Carvallo-Chaigneau et al. 2008).

Nel gruppo di ricerca in cui è stato realizzato il presente lavoro di tesi sono stati studiati complessi di Cu(II) e phen con leganti ausiliari, come l'imidazolidin-2-tione e suoi derivati, in grado di modularne l'attività citotossica. È stata infatti trovata una correlazione tra la polarità del complesso e la sua attività citotossica: i complessi con alto momento di dipolo sono risultati più attivi nel trattamento di linee cellulari leucemiche mentre i complessi meno polari hanno mostrato maggiore attività nelle linee tumorali solide (Pivetta et al. 2012). Inoltre, sono state studiate le loro costanti di formazione

(Pivetta et al. 2011). I complessi studiati presentano, sulle linee cellulari di leucemia linfoblastica acuta di tipo T (CCRF-CEM) e B (CCRF-SB), carcinoma al polmone (SK-MES-1) e alla prostata (DU-145), una buona attività citotossica, con CC_{50} nell'ordine del micromolare (Pivetta et al. 2012).

5 - La terapia combinatoria

In terapia combinatoria (TC) si somministrano contemporaneamente due o più farmaci allo scopo di ottenere un aumentato effetto terapeutico dalla loro combinazione. Quando si combinano due farmaci è possibile che l'effetto terapeutico sia maggiore, uguale o minore della somma degli effetti dei farmaci presi singolarmente. Se l'effetto è uguale si parla di effetto additivo mentre se è maggiore si parla di effetto sinergico tra i farmaci. Se si ottiene un effetto minore, i farmaci interferiscono negativamente nell'azione reciproca e si parla di effetto antagonista. Il tipo di effetto che si ottiene non dipende solo dalla natura dei farmaci che vengono somministrati ma anche dalle loro dosi. Una combinazione degli stessi farmaci può quindi presentare effetto additivo, sinergico o antagonista a seconda delle quantità assolute e/o relative dei farmaci che la compongono. Dunque, l'individuazione delle combinazioni con effetto sinergico è di fondamentale importanza per la messa a punto di una terapia efficace.

I vantaggi dell'utilizzo di una terapia combinatoria rispetto ad un farmaco singolo sono:

- **diminuzione degli effetti collaterali**

se i farmaci hanno effetto sinergico possono essere somministrate dosi minori, limitando l'insorgenza di effetti collaterali.

- **sfruttamento di diversi meccanismi d'azione**

è possibile utilizzare farmaci appartenenti a classi diverse (vedi **La chemioterapia antitumorale**) che agiscono sfruttando differenti meccanismi d'azione.

- **limitazione dell'insorgere di resistenza**

la combinazione di farmaci può portare all'eliminazione di tutte le cellule tumorali, evitando la selezione di una popolazione resistente al farmaco, o comunque rallentare l'insorgere della resistenza.

Lo svantaggio principale consiste nella possibilità che gli effetti collaterali di uno o più farmaci risultino potenziati.

5.1. Terapie combinatorie basate sull'uso del cisplatino

Sono state proposte numerose terapie combinatorie basate sull'uso del cisplatino. Questo è dovuto in parte alla necessità di diminuire le dosi del cisplatino per limitarne gli effetti collaterali. D'altra parte, il cisplatino è attivo su un'ampia varietà di tumori ed è stato quindi combinato con i farmaci specifici per ciascun tipo, sia quelli in uso prima dell'introduzione del cisplatino che quelli sviluppati successivamente. Inoltre, sono state proposte combinazioni degli altri chemioterapici a base di platino, in particolare con l'oxaliplatino per la sua attività anche in tumori resistenti al cisplatino.

- **Gemcitabina-Cisplatino**

E' una combinazione usata per il trattamento di molti tumori come quello alla vescica, al pancreas, al tratto biliare, alla cervice uterina, alle ovaie, al polmone non a piccole cellule e il mesotelioma ovarico maligno.

- **BEP e TPF**

Sono due combinazioni del cisplatino con antibiotici. La BEP consiste nell'uso di bleomicina, etoposide e cisplatino ed è usata per il trattamento del cancro alle ovaie e ai testicoli. La TPF invece è una combinazione di docetaxel, cisplatino e 5-FU ed è usata nel trattamento del cancro allo stomaco e del carcinoma a cellule squamose della testa e del collo.

- **VIP e VeIP**

Sono combinazioni di ifosfamide (agente alchilante) e cisplatino con etoposide (VIP) o vinblastina solfato (VeIP). La prima viene usata solo nel trattamento del cancro ai testicoli mentre la seconda anche in quello alle ovaie.

- **Carboplatino-Taxol**

Questa combinazione è usata nel trattamento del tumore alle ovaie e al polmone non a piccole cellule.

- **Combinazioni con oxaliplatino**

Il regime FOLFOX, costituito da acido folinico, 5-FU e oxaliplatino viene usato nel trattamento del cancro al colon-retto o del cancro al pancreas che non risponde al

trattamento con gemcitabina. Aggiungendo irinotecano (inibitore della topoisomerasi I) si ha la combinazione FOLFIRINOX, usata nel trattamento del cancro al pancreas in stadio metastatico. XELOX e CAPOX, combinazioni di oxaliplatino con capecitabina (profarmaco del 5-FU), sono usati nel trattamento del tumore al colon-retto in stadio avanzato.

5.2. Terapia combinatoria con rame

Nella progressione di alcuni tipi di tumori si osserva un aumento dei livelli di rame nel sangue e nei tessuti e un aumento dello stress ossidativo cellulare. Il rame è quindi un possibile target per la terapia antitumorale. Attualmente però vengono applicati due approcci opposti.

Da una parte il rame è noto come promotore dell'angiogenesi ed è stata dimostrata la sua interazione con diversi fattori proangiogenetici (Marzano et al. 2009). Poiché l'angiogenesi è strettamente necessaria per lo sviluppo del tumore (vedi **Angiogenesi**) è stato proposto l'utilizzo di agenti chelanti per ridurre la quantità di rame nell'organismo. Alcuni di essi si sono dimostrati in grado di inibire l'angiogenesi *in vivo* (Crowe et al. 2013, Marzano et al. 2009). In un trial clinico in Fase I è stata somministrata trietilentetrammina, un agente chelante del rame, come pretrattamento per una terapia a base di carboplatino. Questa terapia combinatoria ha portato a risultati positivi in un ristretto numero di partecipanti: 1 solo paziente ha mostrato progressione del tumore su 5 pazienti trattati (Fu et al. 2012). Inoltre, il tetratiomolibdato (TM), agente chelante utilizzato nel trattamento del morbo di Wilson, è stato utilizzato in un trial clinico in Fase II nel trattamento del tumore ai reni in stadio avanzato. Dai risultati del trial sembra che l'effetto del TM sia di tipo citostatico ossia di inibizione della proliferazione cellulare e non di riduzione della massa tumorale per induzione di apoptosi (Goodman et al. 2004). Questo limiterebbe il suo uso a quello di agente coadiuvante in combinazione con un agente con attività citotossica. In un altro trial di Fase II, il TM è stato somministrato a 19 pazienti con tumore alla prostata ma non c'è stata una riduzione della progressione della malattia (Henry et al. 2006). L'efficacia antitumorale del TM come agente singolo non è stata ancora dimostrata (Khan and Merajver 2009).

In alcuni casi l'attività anti-angiogenesi deriva dalla formazione di un complesso tra il chelante e il rame presente all'interno delle cellule tumorali che è in grado di inibire il proteasoma e indurre l'apoptosi (Marzano et al. 2009). Questo non è però vero per il TM

o l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), che pur complessando efficacemente il rame, non possiedono questa attività inibitoria. Sembra quindi che sia necessaria la formazione di un legame meno forte per permettere l'interazione del metallo con i substrati cellulari (Tisato et al. 2010).

D'altra parte la somministrazione di sali di rame, in particolare CuSO_4 , in concomitanza con il trattamento con cisplatino si è mostrata in grado di limitare l'insorgere di effetti collaterali (Sorenson and Wangila 2007). Poiché il rame nell'organismo si trova solo legato a proteine o piccole molecole (vedi **Trasporto e omeostasi**), gli effetti positivi sono imputabili ai complessi di rame che si formano *in vivo*.

Scopo del lavoro

Questo lavoro di tesi è incentrato sullo studio di complessi metallici a base di Cu(II) e Pt(II) che mostrino proprietà antitumorali. L'obiettivo generale è la preparazione di nuovi complessi, la loro caratterizzazione e la correlazione della struttura con le proprietà citotossiche.

In particolare, il lavoro svolto si articola in quattro punti principali:

1. Sintesi di nuovi complessi rame

Nonostante siano stati preparati diversi composti di rame con 1,10-fenantrolina e leganti misti, poca attenzione è stata dedicata allo studio di complessi con derivati fenantrolinici variamente sostituiti. Il primo obiettivo di questo lavoro è quindi la preparazione dei leganti riportati in Figura 5 e dei complessi di Cu(II) da essi derivati.

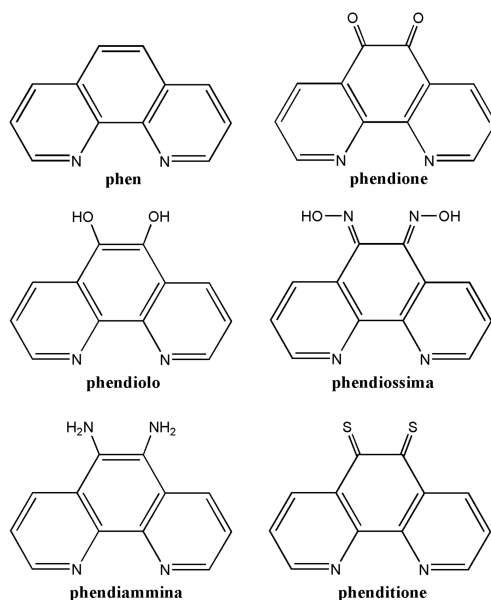


FIGURA 5 LEGANTI FENANTROLINICI UTILIZZATI IN QUESTO STUDIO.

Inoltre, è stata studiata l'effetto di un legante ausiliario sulla citotossicità del complesso $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$. L'introduzione di un legante imidazolidintionico ha mostrato in precedenza di aumentare la citotossicità e la selettività su diverse linee cellulari (vedi **Complessi di rame in terapia antitumorale**).

In questo studio, il legante imidazolidin-2-tione è stato sostituito con dei derivati del tiofene, riportati in **Figura 6**, ed è stata studiata l'attività citotossica dei relativi complessi di formula generale $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{X})](\text{ClO}_4)_2$ ($\text{X} = \text{T}_1, \text{T}_2, \text{T}_3$ e T_4).

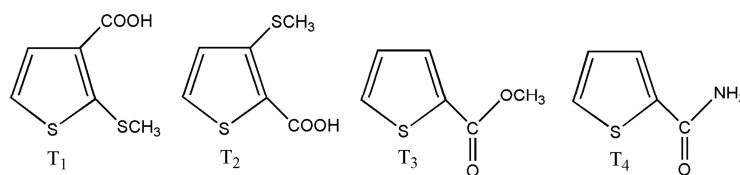


FIGURA 6 LEGANTI DERIVATI DAL TIOFENE UTILIZZATI IN QUESTO STUDIO.

2. Studio in soluzione

Lo studio degli equilibri in soluzione tra leganti e metallo permette di individuare quali specie sono presenti in soluzione al variare del pH. Lo studio della speciazione di un farmaco è importante per capire quali sono le forme che sono presenti in condizioni fisiologiche in modo da ottenere maggiori informazioni sul loro meccanismo d'azione. Per questo motivo sono state studiate le costanti di protonazione dei leganti fenantrolinici e le costanti di formazione dei relativi complessi di Cu(II).

3. Confronto con i complessi di platino

Data la relazione tra rame e platino è di interesse studiare i complessi corrispondenti di entrambi i metalli e verificare eventuali analogie nelle relazioni struttura-proprietà. Il terzo obiettivo è quindi la sintesi dei complessi di platino contenenti alcuni dei leganti fenantrolinici di Figura 5 e dei complessi misti con leganti imidazolidin-2-tione presentati in **Figura 7**.

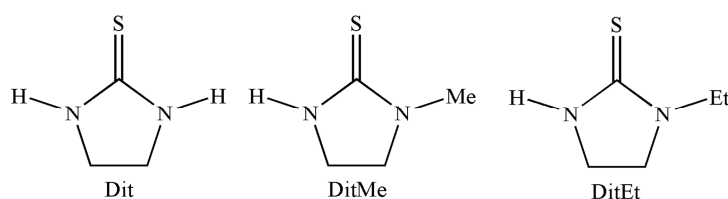


FIGURA 7 LEGANTI IMIDAZOLIDIN-2-TIONE UTILIZZATI IN QUESTO STUDIO.

4. Studio della sinergia tra complessi di rame e cisplatino

Considerata la stretta relazione tra rame e platino evidenziata nei capitoli precedenti, è stato studiato l'effetto delle combinazioni di cisplatino con i tre complessi di rame riportati in **Figura 8**. I complessi selezionati erano già stati studiati preliminarmente nel gruppo di ricerca e hanno mostrato una promettente attività citotossica. I primi due

complessi presentano rispettivamente uno e due leganti fenantrolinici mentre il terzo si differenzia per la presenza di un legante imidazolidin-2-tione ausiliario.

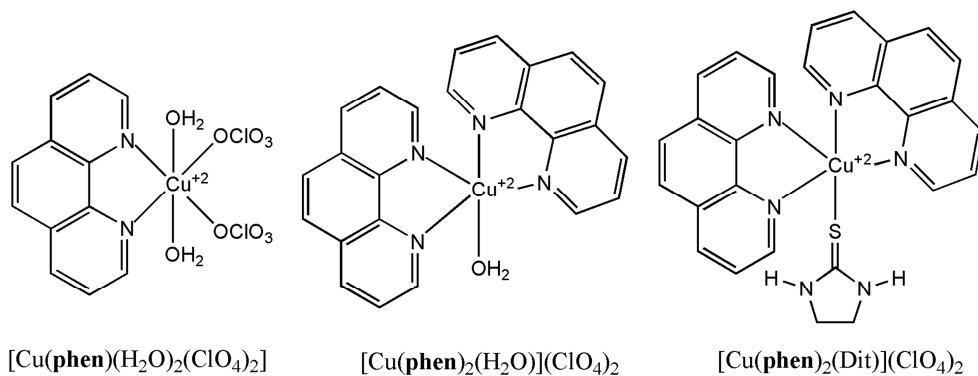


FIGURA 8 COMPLESSI DI $\text{Cu}(\text{II})$ STUDIATI IN COMBINAZIONE CON IL CISPLATINO.

Glossario

apoproteina

parte proteica di una proteina coniugata ad un gruppo prostetico; **16**

apoptosi

processo di morte cellulare programmata; **1**

astenia

debolezza muscolare; **10**

autocrina

Sistema di segnalazione cellulare in cui una sostanza prodotta da una cellula va a modificare il comportamento della cellula stessa.; **4**

chaperones del rame

Piccole proteine adibite al trasporto del rame; **16**

check-point cellulari

punti di controllo del ciclo cellulare i cui requisiti devono essere soddisfatti perchè la cellula passi alla fase successiva del ciclo; **4**

citocromo-c ossidasi; 17

enzima della membrana mitocondriale fondamentale nella respirazione cellulare; **15**

cofattore

ione metallico o molecola facente parte di una proteina e indispensabile al suo funzionamento; **17**

DNA

Acido deossiribonucleico; **9**

efestina

enzima che converte il ferro(II) in ferro(III); **15**

glutazione

tripeptide costituito da glicina, cisteina e carbammato. Agisce come antiossidante, trasformandosi nella sua forma ridotta (GSSG) con formazione di un ponte disolfuro tra i residui cisteinici di due molecole di glutazione; **12; 16**

interfilamento

tra diversi filamenti di DNA; **9**

intrafilamento

nello stesso filamento di DNA; **9**

ipossia

carenza di ossigeno; **4**

lisil ossidasi

enzima che catalizza la formazione di precursori del collagene e della elastina da residui di lisina; **15**

metallotioneine

Famiglia di proteine a basso peso molecolare caratterizzate da una grande quantità di residui cisteinici e da un'alta affinità per i metalli; **16**

microtuboli

strutture intracellulari costituenti del citoscheletro, deputate all'organizzazione e trasporto intracellulare e coinvolti nella divisione cellulare; **8**

mielosoppressione

soppressione dell'attività del midollo osseo che può portare ad anemia (carenza globuli rossi), leucopenia (carenza globuli bianchi) e trombocitopenia (carenza piastrine); **13**

mitogeni

sostanze in grado di innescare la mitosi cellulare; **3**

profili molecolari

livelli di espressione genica; **5**

ricorrente

tumore che si ripresenta in seguito ad un trattamento; **13**

superossido dismutasi; 16

enzima che catalizza la riduzione del radicale superossido in ossigeno e acqua ossigenata; **15**

tassoidi

Composti diterpenici estratti da piante del genere *Taxus*, di cui il più semplice è il taxolo o tassolo.; **8**

telomeri

Sequenze altamente ripetute di DNA presenti alla fine dei cromosomi.; **4**

tirosinasi

enzima che catalizza sia la reazione di idrossilazione di fenoli (come tirosina e dopamina) in presenza di ossigeno che la conversione degli eventuali orto-difenoli prodotti nei corrispondenti orto-chinoni; **15**

topoisomerasi

Enzimi che intervengono in caso di tensione torsionale nell'elica, rompendo e riparando la catena polifosfatica impedendo sia lo svolgimento che il sovra avvolgimento della doppia elica del DNA.; **8**

Bibliografia

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Al. E: Extracellular Control of Cell Division, Cell Growth, and Apoptosis. In *Molecular Biology of the Cell* (4° edizione.) Garland Science: 2002.
- Alderden RA, Hall MD, Hambley TW: The Discovery and Development of Cisplatin. *J. Chem. Educ.* 83: 728–734, 2006.
- Arany I, Safirstein RL: Cisplatin nephrotoxicity. *Semin. Nephrol.* 23: 460–464, 2003.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Felli IC, Losacco M, Natile G: Probing the interaction of cisplatin with the human copper chaperone Atox1 by solution and in-cell NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 133: 18361–18369, 2011.
- Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, Bohrens BC, Grotzinger KR, Whang-peng J, Louie KG, Knutsen T, Mckoy WM, Young RC, Ozols RF: Characterization of a cis - diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res.* 47: 414–418, 1987.
- Blommaert FA, van Dijk-Knijnenburg HCM, Dijt FJ, den Engelse L, Baan RA, Berends F, Fichtinger-Schepman AMJ: Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry* 34: 8474–8480, 1995.
- Booth BA, Agrawal KC, Moore EC, Sartorelli AC: α -(N)-Heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazone inhibitors of ribonucleoside diphosphate reductase. *Cancer Res.* 34: 1308–1314, 1974.
- Boulikas T, Pantos A, Bellis E, Christofis P: Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Ther.* 5: 537–583, 2007.
- Bravo-Gómez ME, Hernández de la Paz AL, Gracia-mora I: Antineoplastic Evaluation of Two Mixed Chelate Copper Complexes. *J. Mex. Chem. Soc.* 57: 205–211, 2013.
- Cai X, Pan N, Zou G: Copper-1,10-phenanthroline-induced apoptosis in liver carcinoma Bel-7402 cells associates with copper overload, reactive oxygen species production, glutathione depletion and oxidative DNA damage. *Biometals* 20: 1–11, 2007.
- Calvert AH, Harland SJ, Newell DR, Siddik ZH, Jones AC, McElwain TJ, Raju S, Wiltshaw E, Smith IE, Baker JM, Peckham MJ, Harrap KR: Early clinical studies with cis-diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum II. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 9: 140–147, 1982.
- Carvallo-Chaigneau F, Trejo-Solís C, Gómez-Ruiz C, Rodríguez-Aguilera E, Macías-Rosales L, Cortés-Barberena E, Cedillo-Peláez C, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L, Madrid-Marina V, Constantino-Casas F: Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals* 21: 17–28, 2008.
- Chen HHW, Song I, Hossain A, Choi M, Yamane Y, Liang ZD, Lu J, Wu LY, Siddik ZH, Klomp LWJ, Savaraj N, Kuo MT: Elevated Glutathione Levels Confer Cellular Sensitization to Cisplatin Toxicity by Up-Regulation of Copper Transporter hCtr174: 697–704, 2008.
- Crichton RR: *Biological Inorganic Chemistry an introduction* (First Edit.) Elsevier: 148: 2008.

- Crowe A, Jackaman C, Beddoes KM, Ricciardo B, Nelson DJ: Rapid copper acquisition by developing murine mesothelioma: decreasing bioavailable copper slows tumor growth, normalizes vessels and promotes T cell infiltration. *PLoS One* 8: e73684, 2013.
- Evan GI, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348, 2001.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D, Forman D, Bray F: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer* 2013.
- Fidler IJ: Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. *Cancer Res.* 38: 2651-2660, 1978.
- Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B: The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res.* 56: 4881-4886, 1996.
- Fu S, Naing A, Fu C, Kuo M, Kurzrock R: Overcoming platinum resistance through the use of a copper-lowering agent. *Mol. Cancer Ther.* 11: 1221-1225, 2012.
- Galliani A, Losacco M, Lasorsa A, Natile G, Arnesano F: Cisplatin handover between copper transporters: the effect of reducing agents. *J. Biol. Inorg. Chem.* 19: 705-714, 2014.
- Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, Castedo M, Kroemer G: Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* 5: e1257, 2014.
- Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea: Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici 33-79: 2010.
- Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD: Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocr. Relat. Cancer* 11: 255-263, 2004.
- Harrison MD, Jones CE, Dameron CT: Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4: 145-153, 1999.
- Henry NL, Dunn R, Merjaver S, Pan Q, Pienta KJ, Brewer G, Smith DC: Phase II trial of copper depletion with tetrathiomolybdate as an antiangiogenesis strategy in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Oncology* 71: 168-175, 2006.
- Holzer AK, Manorek GH, Howell SB: Contribution of the Major Copper Influx Transporter CTR1 to the Cellular Accumulation of Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin. *Mol. Pharmacol.* 70: 1390-1394, 2006.
- Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I: Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 14298-14302, 2002.
- Kartalou M, Essigmann JM: Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 478: 23-43, 2001.
- Khan G, Merajver S: Copper chelation in cancer therapy using tetrathiomolybdate: an evolving paradigm. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18: 541-548, 2009.

- Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen Z: Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res.* 1312–1316, 2000.
- Kuo MT, Chen HHW, Song I-S, Savaraj N, Ishikawa T: The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 26: 71–83, 2007.
- Kuo MT, Fu S, Savaraj N, Chen HHW: Role of the human high-affinity copper transporter in copper homeostasis regulation and cisplatin sensitivity in cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 72: 4616–4621, 2012.
- Lebwohl D, Canetta R: Clinical Oncology Update Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy : an Historical Perspective and an Update. *Eur. J. Cancer* 34: 1522–1534, 1998.
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC: Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204: 216–237, 2005.
- Maindroult-Goebel F, Louvet C, André T, Carola E, Lotz JP, Molitor JL, Garcia ML, Gilles-Amar V, Izrael V, Krulik M, de Gramont A: Oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (FOLFOX6). *Eur. J. Cancer* 35: 1338–1342, 1999.
- Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C: Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer. Agents Med. Chem.* 9: 185–211, 2009.
- Milane L, Ganesh S, Shah S, Duan Z-F, Amiji M: Multi-modal strategies for overcoming tumor drug resistance: hypoxia, the Warburg effect, stem cells, and multifunctional nanotechnology. *J. Control. release* 155: 237–247, 2011.
- Monneret C: Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. *Ann. Pharm. françaises* 69: 286–95, 2011.
- Murugkar A, Unnikrishnan B, Padhye S, Bhonde R, Teat S, Triantafillou E, Sinn E: Hormone anchored metal complexes. 1. Synthesis, structure, spectroscopy and in vitro antitumor activity of testosterone acetate thiosemicarbazone and its metal complexes. *Met. Based. Drugs* 6: 177–182, 1999.
- Pitié M, Donnadiou B, Meunier B: Preparation of the new bis(phenanthroline)ligand “Clip-Phen” and evaluation of the nuclease activity of the corresponding copper complex. *Inorg. Chem.* 37: 3486–3489, 1998.
- Pitié M, Sudres B, Meunier B: Dramatic increase of the DNA cleavage activity of Cu(Clip-phen) by fixing the bridging linker on the C3 position of the phenanthroline units. *Chem. Commun.* 2597–2598, 1998.
- Pivetta T, Cannas MD, Demartin F, Castellano C, Vascellari S, Verani G, Isaia F: Synthesis, structural characterization, formation constants and in vitro cytotoxicity of phenanthroline and imidazolidine-2-thione copper(II) complexes. *J. Inorg. Biochem.* 105: 329–338, 2011.
- Pivetta T, Isaia F, Verani G, Cannas C, Serra L, Castellano C, Demartin F, Pilla F, Manca M, Pani A: Mixed-1,10-phenanthroline-Cu(II) complexes: synthesis, cytotoxic activity versus hematological and solid tumor cells and complex formation equilibria with glutathione. *J. Inorg. Biochem.* 114: 28–37, 2012.

- Rosenberg B, Camp L Van, Grimley EB, Thomson AJ: The Inhibition of Growth or Cell Division in *Escherichia coli* by Different Ionic Species of Platinum(IV) Complexes. *J. Biol. Chem.* 242: 1347–1352, 1967.
- Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T: Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205: 698–699, 1965.
- Rudnev A V, Aleksenko SS, Semenova O, Hartinger CG, Timerbaev AR, Keppler BK: Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel-Dreyer method. *J. Sep. Sci.* 28: 121–127, 2005.
- Salustri C, Barbati G, Ghidoni R, Quintiliani L, Ciappina S, Binetti G, Squitti R: Is cognitive function linked to serum free copper levels? A cohort study in a normal population. *Clin. Neurophysiol.* 121: 502–7, 2010.
- Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C: Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem. Rev.* 114: 815–862, 2014.
- Sasada T, Nakamura H, Ueda S, Sato N, Kitaoka Y, Gon Y, Takabayashi A, Spyrou G, Holmgren A, Yodoi J: Possible involvement of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Free Radic. Biol. Med.* 27: 504–514, 1999.
- Siddik ZH: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22: 7265–7279, 2003.
- Sigman DS, Graham DR, Aurora VD, Stern AM: Oxygen-dependent Cleavage of DNA by the 1,10-Phenanthroline Cuprous Complex. *J. Biol. Chem.* 254: 12269–12272, 1979.
- Sorenson JRJ, Wangila GW: Co-treatment with copper compounds dramatically decreases toxicities observed with cisplatin cancer therapy and the anticancer efficacy of some copper chelates supports the conclusion that copper chelate therapy may be markedly more effective and less tox. *Current Med. Chem.* 14: 1499–1503, 2007.
- Talmadge JE, Fidler IJ: AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70: 5649–5669, 2010.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD: Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed. Pharmacother.* 57: 386–398, 2003.
- Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C: Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med. Res. Rev.* 30: 708–749, 2010.
- Trejo-Solís C, Jimenez-Farfan D, Rodriguez-Enriquez S, Fernandez-Valverde F, Cruz-Salgado A, Ruiz-Azuara L, Sotelo J: Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and JNK activation. *BMC Cancer* 12: 156–171, 2012.
- Visvader JE: Cells of origin in cancer. *Nature* 469: 314–322, 2011.
- Waghorne C, Thomas M, Lagarde A, Kerbel RS, Breitman ML: Genetic Evidence for Progressive Selection and Overgrowth of Primary Tumors by Metastatic Cell Subpopulations. *Cancer Res.* 48: 6109–6114, 1988.

- Wang X, Du X, Li H, Chan DS-B, Sun H: The effect of the extracellular domain of human copper transporter (hCTR1) on cisplatin activation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50: 2706–2711, 2011.
- Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R: The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 39: 8113–8127, 2010.
- Woods DB, Vousden KH: Regulation of p53 function. *Exp. Cell Res.* 264: 56–66, 2001.
- Wosikowski K, Lamphere L, Unteregger G, Jung V, Kaplan F, Xu JP, Rattel B, Caligiuri M: Preclinical antitumor activity of the oral platinum analog satraplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60: 589–600, 2007.
- Xi Z, Guo W, Tian C, Wang F, Liu Y: Copper binding promotes the interaction of cisplatin with human copper chaperone Atox1 †. *Chem. Commun.* 49: 11197–11199, 2013.
- Zhao L, Cheng Q, Wang Z, Xi Z, Xu D, Liu Y: Cisplatin binds to human copper chaperone Cox17: the mechanistic implication of drug delivery to mitochondria. *Chem. Commun.* 50: 2667–2669, 2014.

Parte Sperimentale

- 1 - *Sintesi dei leganti*
- 2 - *Sintesi e caratterizzazione dei complessi di Cu(II)*
- 3 - *Sintesi e caratterizzazione dei complessi di Pt(II)*
- 4 - *Misure potenziometriche*
- 5 - *Calcoli teorici*

Strumentazione

Bibliografia

1 - Sintesi dei leganti

I leganti derivati dal tiofene (**T₁-T₄**) e dal imidazolidin-2-tione (**Dit**, **DitMe** e **DitEt**) sono stati preparati rispettivamente dalla dott.ssa Cabiddu e dal prof. Isaia e usati come ricevuti. Il legante 1,10-fenantrolina (**phen**) è disponibile commercialmente ed è stato usato come ricevuto.

1,10-fenantrolin-5,6-dione (**phendione**)

In un bagno di ghiaccio, una miscela di HNO₃ (5 mL) e di H₂SO₄ (10 mL) concentrati è stata aggiunta goccia a goccia a 1.0 g (5.0 mmol) di **phen** e 0.9 g (7.6 mmol) di KBr. La miscela è stata scaldata a ricadere fino alla scomparsa dei vapori rosso scuri di NO_x (circa 3 ore). La soluzione giallo chiaro è stata versata in 200 mL di ghiaccio ed è stata portata a pH neutro per aggiunta di una soluzione satura di KOH. A seconda della concentrazione della soluzione è possibile osservare la presenza di un precipitato bianco di sali inorganici. I solidi sono stati filtrati e lavati più volte con CH₂Cl₂. Il prodotto è stato estratto dalla soluzione acquosa con altro CH₂Cl₂. La fase organica è stata combinata con le porzioni di CH₂Cl₂ usate per il lavaggio dei sali e la soluzione è stata anidrificata con Na₂SO₄ anidro. La soluzione è stata evaporata sotto vuoto ed è stato ottenuto un solido giallo. Resa 82 %. Principali bande IR (cm⁻¹): 2959, 2927, 2874 stretching C-H aromatici (broad, medium strong); 1688 stretching C=O (sharp, strong); 1567, 1461, 1415 stretching C=C aromatici (sharp, medium strong); 1117 stretching C-N (sharp, medium); 813, 739, 623 bending C=C-H aromatici (sharp, medium). ESI-MS (CH₃CN): 211.1 *m/z* M-H⁺. Analisi elementare (calcolata): 68.65 (68.57) %C; 2.92 (2.88) %H; 13.36 (13.33) %N.

1,10-fenantrolin-5,6-diolo (**phendiolo**)

0.1 g (0.48 mmol) di **phendione** e 0.58 g (0.48 mmol) di ditiossamide sono stati disciolti in 15 mL di etanolo e scaldati a riflusso per 16 ore. Il solido giallo formatosi è stato recuperato per filtrazione, lavato con etanolo, CH₂Cl₂ e etere di petrolio, e lasciato seccare all'aria. Resa 82 %. Principali bande IR (cm⁻¹): 2966, 2927, 2718, 2622 stretching C-H aromatici (broad, strong); 1575, 1497, 1426 stretching C=C aromatici (sharp, medium strong); 1119 stretching C-N (medium broad, medium strong); 806, 739, 629 bending C=C-H aromatici (sharp, medium). Analisi elementare (calcolata): 67.54 (67.92) %C; 3.84 (3.80) %H; 13.18 (13.20) %N.

1,10-fenantrolin-5,6-diossima (**phendiossima**)

0.5 g (2.4 mmol) di **phendione** e 1.65 g (24 mmol) di NH₂OH sono stati posti in un pallone e vi sono stati aggiunti 3 mL di piridina e 50 mL di etanolo assoluto. La soluzione è stata

posta sotto agitazione e portata a riflusso per 24 ore. La soluzione gialla è stata concentrata al rotavapor, sono stati aggiunti 20 mL di acqua distillata ed è stata portata a pH 4 per aggiunta di HCl concentrato. Il precipitato formatosi è stato filtrato, lavato più volte con acqua, e lasciato seccare all'aria. Resa 84 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3522 stretching O-H gruppo ossimico (sharp, medium); 3361, 3002, 2852 stretching C-H aromatici (broad, strong); 1573, 1560, 1468, 1408 stretching C=C aromatici (sharp, medium strong); 965, 954 stretching N-O gruppo ossimico (sharp, medium); 806, 736, 630 bending C=C-H aromatici (sharp, medium). ESI-MS (CH_3CN): 263.1 m/z M- Na^+ .

1,10-fenantrolin-5,6-diammina (phendiammina)

Una sospensione di 0.47 g (2.1 mmol) di $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 1 mL di HCl concentrato è stata aggiunta goccia a goccia, sotto ghiaccio e sotto agitazione, a 0.10 g (0.42 mmol) di **phendiossima** sospesa in 2 mL di etanolo. La soluzione è stata lasciata per 10 min sotto agitazione ed è stata poi portata alla temperatura di riflusso per 3 ore. Il prodotto è stato filtrato su gooch. Si ottiene una miscela di un composto scuro e di uno giallo rosato. Il prodotto è stato caratterizzato tramite ESI-MS (vedi capitolo **Risultati e Discussione** paragrafo 1.4).

1,10-fenantrolin-5,6-ditione (phenditione)

- A) A 0.10 g (0.47 mmol) di **phendione** sono stati aggiunti 0.07 g (0.16 mmol) di P_4S_{10} e 0.12 g (1.2 mmol) di Al_2O_3 , ridotti finemente in polvere con un mortaio. Ai solidi sono stati aggiunti 15 mL di acetonitrile e la soluzione è stata portata a riflusso per 3 ore. La soluzione è stata portata a secco e il solido è stato estratto con cloroformio e recuperato per evaporazione del solvente.
- B) A 0.10 g (0.47 mmol) di **phendione** e di 0.30 g (0.74 mmol) di reagente di Lawesson sono stati aggiunti 4 mL di toluene anidro sotto flusso di argon. La soluzione è stata portata a riflusso sotto agitazione per 3.5 ore. Per aggiunta di acetato di etile, dalla soluzione portata a secco è stato recuperato un solido giallo che è stato lavato più volte con acetato di etile e diclorometano.

Il prodotto è stato caratterizzato tramite ESI-MS (vedi capitolo **Risultati e Discussione** paragrafo 1.5).

2 - Sintesi e caratterizzazione dei complessi di Cu(II)

2.1. Complessi con phen

I complessi $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)_2]$, $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$ sono stati preparati secondo le rispettive procedure riportata in letteratura (Pivetta et al. 2011, 2012).

2.2. Complessi con phendione

Sintesi di $[\text{Cu}(\text{phendione})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$

0.011 g $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ (0.25 mmol) sono stati sospesi in 10 mL di isopropanolo e scaldati sotto agitazione. HClO_4 concentrato è stato aggiunto fino all'ottenimento di una soluzione azzurra trasparente. La soluzione è stata fatta raffreddare ed è stata aggiunta goccia a goccia sotto agitazione una soluzione di 0.05 g di **phendione** (0.24 mmol) in 10 ml di isopropanolo. La soluzione azzurra formatasi è stata lasciata evaporare a temperatura ambiente. Il prodotto azzurro è stato recuperato dopo evaporazione del solvente. Resa 79.0 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3400 stretching O-H (broad, weak); 2955, 2927, 2853 stretching C-H aromatici (broad, weak); 1585, 1521, 1418 stretching C=C (sharp, medium strong); 1146, 1111, 1086 stretching Cl-O gruppo perclorato coordinante (broad, strong); 852, 717 bending C=C-H aromatici (sharp, strong); 627 bending C=C-H aromatici e deformazione OClO (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 29.22 (28.33) %C; 2.01 (1.98) %H; 5.48 (7.99) %N.

Sintesi di $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$

0.044 g $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ (0.40 mmol) sono stati sospesi in 10 mL di isopropanolo e scaldati sotto agitazione. HClO_4 concentrato è stato aggiunto fino all'ottenimento di una soluzione azzurra trasparente. La soluzione è stata fatta raffreddare ed è stata aggiunta goccia a goccia sotto agitazione una soluzione di 0.084 g di **phendione** (0.40 mmol) in 10 ml di isopropanolo. Il precipitato verde formatosi è stato recuperato per filtrazione, lavato con isopropanolo e lasciato asciugare all'aria. Resa 80.6 %. Il solido è stato ridisciolti in etanolo e la soluzione è stata lasciata evaporare a temperatura ambiente. Dopo 4 giorni sono stati ottenuti dei cristalli verdi adatti per la risoluzione strutturale tramite spettroscopia a raggi X. Principali bande IR (cm^{-1}): 3450 stretching O-H (broad, weak); 2923, 2856 stretching C-H aromatici (broad, weak); 1585, 1521, 1425 stretching C=C (sharp, medium); 1146, 1093

stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 856, 725 bending C=C-H aromatici (sharp, strong); 625 bending C=C-H aromatici e deformazione OCIO (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 41.44 (41.13) %C; 2.04 (2.01) %H; 7.95 (7.99) %N.

Risoluzione della struttura di $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$

Le misure di diffrazione di raggi X su cristallo singolo sono state effettuate utilizzando un diffrattometro Bruker APEX II CCD usando la radiazione monocromatica MoK_α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). I dati sono stati corretti per gli effetti di polarizzazione di Lorentz e per l'assorbimento con il programma SADABS, (Siemens Area-Detector ABSorption, Bruker AXS Inc. Madison, WI, USA 2000). La struttura è stata risolta attraverso metodi diretti ed è stata completata tramite cicli interattivi di affinamento full-matrix least squares usando il software SHELXL-97. Le molecole d'acqua sono state affinate senza gli atomi di idrogeno. Gli atomi di idrogeno sul legante **phendione** sono stati localizzati dalla mappa di Fourier (ΔF) e affinati senza restrizioni.

I principali dati cristallografici e i dettagli relativi alla raccolta dati e all'affinamento strutturale sono riportati in **Tabella 3**.

$[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$	
Formula empirica	$\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{CuN}_4\text{O}_{13}$
Massa molare	700.83
Dimensioni del cristallo, mm	$0.30 \times 0.15 \times 0.12$
Sistema cristallino	Ortorombico
Gruppo spaziale	<i>Pbca</i> (61)
<i>a</i> , Å	14.174(3)
<i>b</i> , Å	16.440(3)
<i>c</i> , Å	22.350(5)
α , °	90
β , °	90
γ , °	90
<i>V</i> , Å ³	5208(2)
<i>Z</i>	8
<i>T</i> , K	293(2)
μ , mm ⁻¹	1.125
θ range, °	3.82-31.65
Numero di riflessioni	8383 (uniche)

R_{int}	0.0282
$R1$	0.0584
$wR2$	0.2055

TABELLA 3 DATI CRISTALLOGRAFICI PER $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$.

I principali angoli e distanze di legame del complesso $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ sono riportati in **Tabella 4**.

Atomo 1	Atomo 2	Lunghezza (Å)	
Cu	N1	2.040(2)	
Cu	N2	2.003(2)	
Cu	N3	2.187(3)	
Cu	N4	2.019(2)	
Cu	OW	2.026(3)	
Cu	O2	2.667(4)	
Atomo 1	Atomo 2	Atomo 3	Angolo (deg)
N1	Cu	N2	81.6(1)
N1	Cu	N3	101.28(9)
N1	Cu	N4	97.7(1)
N1	Cu	OW	160.2(1)
N1	Cu	O2	77.0(1)
N2	Cu	N3	106.11(9)
N2	Cu	N4	175.4(1)
N2	Cu	OW	89.9(1)
N2	Cu	O2	85.9(1)
N3	Cu	N4	78.5(1)
N3	Cu	OW	98.2(1)
N3	Cu	O2	167.6(1)
N4	Cu	OW	89.3(1)
N4	Cu	O2	89.5(1)
OW	Cu	O2	84.6(1)

TABELLA 4 DISTANZE E ANGOLI DI LEGAME SIGNIFICATIVI PER $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$; TRA PARENTESI È RIPORTATA LA DEVIAZIONE STANDARD SULL'ULTIMA CIFRA SIGNIFICATIVA.

I dati cristallografici completi sono depositati nel Cambridge Crystallographic Data Centre con il numero CCDC-977445.

Sintesi di $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$

0.021 g di $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ (0.030 mmol) sono stati disciolti in isopropanolo. Una soluzione di 0.003 g di Dit (0.03 mmol) in isopropanolo è stata riscaldata

fino alla solubilizzazione del composto e aggiunta goccia a goccia alla soluzione contenente il complesso di rame sotto agitazione. Il precipitato verde ottenuto è stato filtrato su carta e lavato con isopropanolo. Resa 57.5 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3086 stretching N=C-H (broad, weak); 2927, 2898, 2849 stretching C-H aromatici (broad, weak); 1702 stretching C=O (sharp, medium strong); 1578, 1525, 1426 stretching C=C (sharp, medium); 1114, 1089 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 817, 732 bending C=C-H aromatici (sharp, strong); 629 bending C=C-H aromatici e deformazione OCIO (sharp, strong).

2.3. Complessi con phendiolo

Sintesi di $[\text{Cu}(\text{phendiolo})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$

0.013 g $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ (0.12 mmol) sono stati sospesi in 10 mL di isopropanolo e scaldati sotto agitazione. HClO_4 concentrato è stato aggiunto fino all'ottenimento di una soluzione azzurra trasparente. La soluzione è stata fatta raffreddare e sono stati aggiunti goccia a goccia sotto agitazione una sospensione di 0.1 g di phendiolo (0.47 mmol) in isopropanolo. La soluzione è stata scaldata a riflusso per 0.5 ore e successivamente fatta raffreddare a temperatura ambiente. Il prodotto ottenuto è stato filtrato su guch, lavato con isopropanolo e etere di petrolio e fatto asciugare all'aria. Resa 46.6 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3400 stretching O-H (broad, strong); 3079, 2923, 2852 stretching C-H aromatici (broad, weak); 1086, 1070 stretching Cl-O gruppo perclorato coordinante (broad, strong); 834, 809, 718 bending C=C-H aromatici (sharp, strong); 626 bending C=C-H aromatici e deformazione OCIO (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 28.78 (28.22) %C; 2.22 (2.37) %H; 5.42 (5.49) %N.

Sintesi di $[\text{Cu}(\text{phendiolo})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$

0.026 g $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ (0.25 mmol) sono stati sospesi in 15 mL di isopropanolo e scaldati sotto agitazione. HClO_4 concentrato è stato aggiunto fino all'ottenimento di una soluzione azzurra trasparente. La soluzione è stata fatta raffreddare e sono stati aggiunti goccia a goccia sotto agitazione una sospensione di 0.1 g di phendiolo (0.47 mmol) in isopropanolo. La soluzione verde scuro è stata lasciata per 15 minuti sotto agitazione durante i quali si ha la precipitazione di un prodotto verde scuro. Il precipitato è stato filtrato, lavato con etanolo e etere di petrolio, e lasciato asciugare all'aria. Resa 75 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 2958, 2930, 2874 stretching C-H aromatici (broad, medium); 1606, 1514, 1432 stretching C=C (medium broad, medium); 1117, 1090 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 820, 728 bending C=C-H aromatici (sharp, strong); 628 bending C=C-H

aromatici e deformazione OCIO (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 41.25 (40.90) %C; 2.66 (2.57) %H; 7.99 (7.95) %N.

Sintesi di $[\text{Cu}(\text{phendiolo})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$

0.021 g di $[\text{Cu}(\text{phendiolo})_2\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ (0.032 mmol) sono stati sospesi in isopropanolo e scaldati sotto agitazione. Una soluzione di 0.003 g di Dit (0.03 mmol) in isopropanolo è stata riscaldata fino alla solubilizzazione del composto e aggiunta goccia a goccia alla soluzione contenente il complesso di rame. La soluzione è stata portata a riflusso per 2 ore. Il precipitato verde scuro ottenuto è stato filtrato su carta e lavato con isopropanolo. Resa 36.5 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3450 stretching O-H (broad, medium); 3086 stretching N=C-H (broad, weak); 2923, 2849 stretching C-H aromatici (broad, weak); 1609, 1514, 1429 stretching C=C (sharp, medium); 1114, 1089 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 824, 728 bending C=C-H aromatici (sharp, strong); 629 bending C=C-H aromatici e deformazione OCIO (sharp, strong).

2.4. Complessi con leganti tiofenici

Sintesi di $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T})](\text{ClO}_4)$ ($\text{T} = \text{T}_1\text{-T}_3$)

Il legante **T** è stato disciolto in una soluzione di $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ in CH_3CN , in rapporto molare T:Cu(II) 1:1. Un equivalente di KOH è stato aggiunto e si è osservata un passaggio del colore della soluzione dal blu al verde. La soluzione è stata lasciata evaporare a temperatura ambiente fino alla formazione di cristalli verdi dei prodotti. I prodotti sono stati recuperati, lavati con acqua distillata e lasciati seccare a temperatura ambiente.

$[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T}_1)](\text{ClO}_4)$ Resa 58.1%. Principali bande IR (cm^{-1}): 3060 stretching C-H aromatici (broad, weak); 1145, 1106, 1086 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 847, 724, 623 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). ESI-MS (CH_3CN): m/z $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T}_1)]^+$.

$[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T}_2)](\text{ClO}_4)$ Resa 92.5 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 2962, 2925, 2866 stretching C-H aromatici (broad, weak); 1729 C=O stretching (sharp, medium); 1094 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 853, 724, 623 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). ESI-MS (CH_3CN): m/z $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T}_2)]^+$.

$[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T}_3)](\text{ClO}_4)$ Resa 53.3 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 2958, 2932, 2860 stretching C-H aromatici (broad, weak); 1730 C=O stretching (sharp, medium); 1146, 1117, 1090 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 850, 722, 623 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). ESI-MS (CH_3CN): m/z $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T}_3)]^+$.

Sintesi di $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T}_4)](\text{ClO}_4)_2$

A una soluzione di $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ (25 mg, 0.04 mmol) in CH_3CN , sono state aggiunte 10 gocce di T4 sotto agitazione; la soluzione diventa verde chiaro. La soluzione è stata lasciata evaporare a temperatura ambiente fino alla formazione di cristalli verdi. Il prodotto è stato recuperato, lavato con acqua e lasciato seccare a temperatura ambiente. Resa 47.3 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 2958, 2929, 2860 stretching C-H aromatici (broad, weak); 1733 C=O stretching (sharp, medium); 1147, 1094 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 849, 723, 624 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). ESI-MS (CH_3CN): m/z $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{T}_4)(\text{ClO}_4)]^+$.

3 - Sintesi e caratterizzazione dei complessi di Pt(II)

3.1. Complessi con imidazolidin-2-tione

Sintesi dei complessi con formula $[\text{Pt}(\text{D})_2\text{Cl}_2]$ (D = Dit, DitMe, DitEt)

0.100 g di K_2PtCl_4 (0.242 mmol) e due equivalenti di D (0.0494 g **Dit**, 0.0562 g **DitMe** o 0.0630 g **DitEt**, 0.484 mmol) sono stati sospesi in 10 mL di acqua. La soluzione è stata posta sotto agitazione fino a completa dissoluzione del solido rosso di K_2PtCl_4 . Il solido ottenuto è stato filtrato, lavato con acqua e seccato a temperatura ambiente.

$[\text{Pt}(\text{Dit})_2\text{Cl}_2]$ Resa 70 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3376, 3270, 3224 stretching N-H (broad, strong); 2895, 2880 stretching C-H (broad, weak); 1528 stretching C-N (broad, strong); 1199 stretching C=S (broad, weak).

$[\text{Pt}(\text{DitMe})_2\text{Cl}_2]$ Resa 74 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3281 stretching N-H (broad, strong); 2958, 2927, 2888 stretching C-H (broad, weak); 1549, 1507 stretching C-N (broad, strong); 1191 stretching C=S (sharp, strong).

$[\text{Pt}(\text{DitEt})_2\text{Cl}_2]$ Resa 75 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3270 stretching N-H (broad, strong); 2976, 2934, 2895 stretching C-H (broad, weak); 1532, 1507, 1479 stretching C-N (broad, strong); 1191 stretching C=S (sharp, strong).

3.2. Complessi con phen

Sintesi dei complessi con formula $[\text{Pt}(\text{phen})(\text{D})_2](\text{ClO}_4)_2$ (D = Dit, DitMe, DitEt)

0.100 g di K_2PtCl_4 (0.242 mmol) e due equivalenti di **D** (0.0494 g **Dit**, 0.0562 g **DitMe** o 0.0630 g **DitEt**, 0.484 mmol) sono stati sospesi in acqua sotto agitazione fino alla formazione di un precipitato (5 min). Una soluzione di **phen** in DMF (0.0479 g di phen, 0.242 mmol, 10 mL) è stata aggiunta e la miscela è stata posta a riflusso per 1 ora. La soluzione scura formatasi è stata raffreddata e filtrata. Un eccesso di NaClO_4 solido è stato aggiunto con formazione di un precipitato marrone che è stato separato per filtrazione, lavato con etanolo e fatto asciugare a temperature ambiente.

$[\text{Pt}(\text{phen})(\text{Dit})_2](\text{ClO}_4)_2$ Resa 35 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3426 stretching O-H acqua (broad, medium); 2959, 2930, 2874 stretching C-H (broad, weak); 1521, 1429 stretching C=C (broad, medium), 1146, 1114, 1089 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 852, 714, 629 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 27.98 (27.77) %C; 2.51 (2.59) %H; 10.93 (10.80) %N; 8.13 (8.24) %S.

$[\text{Pt}(\text{phen})(\text{DitMe})_2](\text{ClO}_4)_2$ Resa 63 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3394 stretching O-H acqua (broad, medium); 2965, 2934, 2895 stretching C-H (broad, weak); 1560, 1518 stretching C=C (broad, strong), 1142, 1119, 1093 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 852, 714, 629 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 29.98 (29.78) %C; 3.01 (3.00) %H; 10.37 (10.42) %N; 7.30 (7.59) %S.

$[\text{Pt}(\text{phen})(\text{DitEt})_2](\text{ClO}_4)_2$ Resa 56 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3369 stretching O-H acqua (broad, medium); 2976, 2934, 2898, 2881 stretching C-H (broad, weak); 1546, 1514 stretching C=C (broad, strong), 1093 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 852, 714, 629 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 31.80 (31.66) %C; 3.31 (3.38) %H; 10.17 (10.07) %N; 7.57 (7.68) %S.

3.3. Complessi con phendione

Sintesi dei complessi con formula $[\text{Pt}(\text{phendione})(\text{D})_2](\text{ClO}_4)_2$ (D = Dit, DitMe, DitEt)

I complessi sono stati ottenuti con la stessa procedura di sintesi dei complessi della serie $[\text{Pt}(\text{phen})(\text{D})_2](\text{ClO}_4)_2$.

$[\text{Pt}(\text{phendione})(\text{Dit})_2](\text{ClO}_4)_2$ Resa 47 %. Principali bande IR (cm^{-1}): 3365, 3164 stretching N-H (broad, medium); 2969, 2891 stretching C-H (broad, weak); 1702 stretching C=O (sharp, medium weak); 1111, 1089 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad,

strong); 817, 718, 625 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 26.79 (26.74) %C; 2.27 (2.24) %H; 10.36 (10.39) %N; 7.86 (7.93) %S.

[Pt(phendione)(DitMe)₂](ClO₄)₂ Resa 48 %. Principali bande IR (cm⁻¹): 3394 stretching O-H acqua (broad, medium); 3150, 3093 stretching N-H (broad, medium); 2985, 2934 stretching C-H (broad, weak); 1702 stretching C=O (sharp, medium weak); 1142, 1093 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 820, 721, 625 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 28.78 (28.72) %C; 2.62 (2.65) %H; 10.10 (10.05) %N; 7.59 (7.67) %S.

[Pt(phendione)(DitEt)₂](ClO₄)₂ Resa 60 %. Principali bande IR (cm⁻¹): 3408 stretching O-H acqua (broad, medium); 3167, 3093 stretching N-H (broad, medium); 2980, 2941, 2891 stretching C-H (sharp, weak); 1702 stretching C=O (sharp, medium weak); 1143, 1111, 1089 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 824, 728, 625 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 30.58 (30.56) %C; 3.10 (3.03) %H; 9.78 (9.72) %N; 7.37 (7.42) %S.

3.4. Complessi con phendiolo

Sintesi di [Pt(phendiolo)Cl₂]

0.100 g di K₂PtCl₄ (0.242 mmol) sono stati disciolti in 15 mL di acqua distillata a 60 °C. 0.044 g di **phendiolo** (0.242 mmol) sono stati disciolti in 5 mL di DMF e aggiunti goccia a goccia alla soluzione di K₂PtCl₄; la soluzione è stata scaldata a riflusso per un'ora ed è stato ottenuto un precipitato marrone. Il prodotto è stato filtrato, lavato con etanolo e etere di petrolio, e seccato a temperatura ambiente. Resa 70 %. Principali bande IR (cm⁻¹): 3400, 3206 stretching O-H (legame idrogeno) (broad, strong); 3086 stretching C-H (sharp, strong); 1582, 1432 stretching C=C (sharp, medium) ; 806, 710, 622 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 26.72 (26.70) %C; 1.71 (1.69) %H; 5.88 (5.86) %N.

Sintesi dei complessi con formula [Pt(phendiolo)(D)₂](ClO₄)₂ (D = Dit, DitMe, DitEt)

I complessi sono stati ottenuti con la stessa procedura di sintesi dei complessi della serie [Pt(**phen**)(D)₂](ClO₄)₂.

[Pt(phendiolo)(Dit)₂](ClO₄)₂ Resa 30 %. Principali bande IR (cm⁻¹): 3380, 3189 stretching N-H (broad, medium); 2884 stretching C-H (broad, weak); 1111, 1086 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 626 bending C=C-H aromatici (sharp, medium). Analisi elementare (calcolata): 26.72 (26.67) %C; 2.47 (2.49) %H; 10.36 (10.37) %N; 7.84 (7.91) %S.

[Pt(phendiolo)(DitMe)₂](ClO₄)₂ Resa 28 %. Principali bande IR (cm⁻¹): 3394, 3217 stretching O-H acqua (broad, medium); 2982, 2934 stretching C-H (broad, weak); 1118, 1088 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 625 bending C=C-H aromatici (sharp, strong). Analisi elementare (calcolata): 28.62 (28.65) %C; 2.87 (2.88) %H; 10.02 (10.02) %N; 7.54 (7.65) %S.

[Pt(phendiolo)(DitEt)₂](ClO₄)₂ Resa 23%. Principali bande IR (cm⁻¹): 3535, 3352 stretching O-H (legame idrogeno) (broad, medium); 2980, 2941, 2888 stretching C-H (sharp, weak); 1093 stretching Cl-O gruppo perclorato non coordinante (broad, strong); 622 bending C=C-H aromatici (sharp, medium). Analisi elementare (calcolata): 30.44 (30.49) %C; 3.24 (3.26) %H; 9.73 (9.70) %N; 7.34 (7.40) %S.

4 - Misure potenziometriche

Le misure potenziometriche sono state effettuate in una cella termostata con un potenziometro equipaggiato con un elettrodo a vetro e sotto flusso di N₂ per assicurare un'atmosfera inerte. L'elettrodo a vetro è stato tarato giornalmente come riportato in Appendice IV. Per la preparazione di tutte le soluzioni è stata utilizzata acqua distillata fatta bollire per eliminare l'eventuale anidride carbonica disciolta. E' stata verificata la reversibilità delle titolazioni per retro-titolazione con HCl a titolo noto. I dati sperimentali sono stati analizzati con il programma Hyperquad (Gans et al. 1996).

4.1. Determinazione delle costanti di protonazione di phen e phendione

Sono state preparate di fresco delle soluzioni contenenti una concentrazione di legante pari a 1·10⁻² M; la **phen** è stata disciolta in 20 µL di DMSO prima di portare a volume con acqua distillata. La soluzione per la cella di misura è stata preparata aggiungendo le opportune quantità di HCl a titolo noto, NaCl 1 M e acqua distillata in modo da ottenere una concentrazione di legante 1·10⁻³ M, 3 o 5 equivalenti di H⁺ rispettivamente per **phen** e **phendione** e 0.1 M di NaCl. La soluzione è stata quindi titolata con NaOH titolato di fresco, registrando la variazione di potenziale corrispondente ad ogni aggiunta.

4.2. Standardizzazione della soluzione di Cu(II)

La soluzione di Cu(II) utilizzata per le titolazioni potenziometriche è stata preparata con CuCl₂·2H₂O e un equivalente di HCl a titolo noto. La concentrazione di Cu(II) è stata determinata per titolazione con EDTA standard, con indicatore muresside.

4.3. Determinazione delle costanti di idrolisi di Cu(II)

Le costanti di idrolisi del rame a 25 e 37 °C sono state determinate per titolazione di soluzioni di Cu(II) a diverse concentrazioni ($1.0 \cdot 10^{-3}$, $5.0 \cdot 10^{-4}$ e $3.3 \cdot 10^{-4}$ M) con NaOH a titolo noto, in forza ionica di NaCl 0.1 M. I valori di potenziale sono stati registrati dando al sistema il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio (tra 1 e 30 minuti). In tutte le titolazioni effettuate, è stata osservata la formazione di una fase colloidale a valori di pH maggiori di 5 e 6, rispettivamente per le titolazioni a 25 e 37 °C; oltre pH 10 le soluzioni apparivano leggermente torbide. I dati potenziometrici per le titolazioni condotte alla stessa temperatura sono stati analizzati contemporaneamente con il programma Hyperquad.

4.4. Determinazione delle costanti di formazione dei complessi di Cu(II) con phen e phendione

Le soluzioni per la cella di misura sono state preparate con una concentrazione finale di legante pari a $1 \cdot 10^{-3}$ M, Cu(II) in rapporto metallo:legante di 1:1, 1:2, 1:3 e NaCl 0.1 M. Le soluzioni sono state titolate con NaOH a titolo noto. A valori di pH maggiori di 10 si osserva la formazione di una fase colloidale. I dati potenziometrici per le titolazioni condotte alla stessa temperatura sono stati analizzati contemporaneamente con il programma Hyperquad.

5 - Calcoli teorici

5.1. Calcoli quantomeccanici

I calcoli quantomeccanici sono stati effettuati usando il software Spartan06 (Wavefunction Inc, Irvine, USA) su un processore Intel Core i-7. L'ottimizzazione delle geometrie dei complessi e il calcolo dei momenti di dipolo sono stati effettuati con metodi semi-empirici PM3.

5.2. Reti neurali artificiali

I calcoli relativi alle reti neurali artificiali sono stati effettuati usando il software EasyNN-plus (Neural Planner Software Ltd, Cheadle Hulme, UK).

Strumentazione

Le titolazioni potenziometriche sono state effettuate con un pH-metro Mettler-Toledo Seven compact equipaggiato con un microelettrodo a vetro combinato Mettler-Toledo Inlab Micro Pro con sonda termometrica integrata.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrofotometro Bruker Equinox 55 su pasticca di KBr.

Gli spettri di massa sono stati misurati con uno spettrometro di massa 310-MS Varian con triplo quadrupolo QqQ con ionizzazione elettrospray a pressione atmosferica (ESI-API).

Bibliografia

Gans P, Sabatini A, Vacca A: Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the hyperquad suite of programs. *Talanta* 1739-1753, 1996.

Pivetta T, Cannas MD, Demartin F, Castellano C, Vascellari S, Verani G, Isaia F: Synthesis, structural characterization, formation constants and in vitro cytotoxicity of phenanthroline and imidazolidine-2-thione copper(II) complexes. *J. Inorg. Biochem.* 105: 329-338, 2011.

Pivetta T, Isaia F, Verani G, Cannas C, Serra L, Castellano C, Demartin F, Pilla F, Manca M, Pani A: Mixed-1,10-phenanthroline-Cu(II) complexes: synthesis, cytotoxic activity versus hematological and solid tumor cells and complex formation equilibria with glutathione. *J. Inorg. Biochem.* 114: 28-37, 2012.

Risultati e Discussione

*1 -Sintesi e caratterizzazione dei leganti derivati dalla
1,10-fenantrolina*

*2 -Studio in soluzione degli equilibri tra Cu(II) e phen e
phendione*

3 -Sintesi dei complessi di Cu(II)

4 -Attività citotossica dei complessi di Cu(II)

5 -Sintesi e attività citotossica dei complessi di Pt(II)

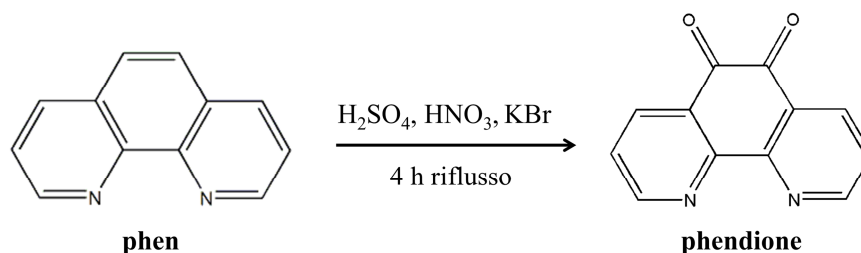
*6 -Studio delle combinazioni di cisplatino e complessi di
Cu(II)*

Bibliografia

1 - Sintesi e caratterizzazione dei leganti derivati dalla 1,10-fenantrolina

1.1. Phendione

Il legante **phendione** è stato sintetizzato secondo lo **Schema di reazione 1**, in accordo con quanto riportato in letteratura (Paw and Eisenberg 1997).



SCHEMA DI REAZIONE 1 SINTESI DEL PHENDIONE.

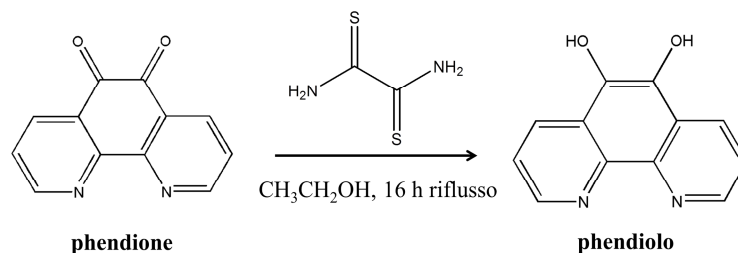
La reazione di formazione del **phendione** consiste in un'ossidazione in ambiente acido della **phen** in presenza di Br_2 , generato *in situ* a partire dallo ione bromuro. I gruppi chetonici del **phendione** vengono introdotti per reazione della **phen** con lo ione nitronio NO_2^+ nelle posizioni 5 e 6, a causa del loro minore coinvolgimento nella delocalizzazione elettronica del sistema aromatico.

La procedura di sintesi è stata modificata per l'estrazione e il lavaggio del prodotto. Il solvente diclorometano è stato usato al posto del cloroformio perché presenta una minore tossicità.

La sintesi del **phendione** è stata inoltre condotta utilizzando KBrO_3 e H_2SO_4 come miscela ossidante, in accordo con quanto riportato da Zheng e altri (Zheng et al. 2010), ma questa procedura ha portato all'ottenimento di rese inferiori (60 %) rispetto a quelle ottenute con il metodo riportato nello **Schema di reazione 1**.

1.2. Phendiolo

Il legante **phendiolo** è stato sintetizzato per riduzione del **phendione** con ditiosammide, secondo quanto riportato in letteratura (Paw and Eisenberg 1997) e in accordo con lo **Schema di reazione 2**.



SCHEMA DI REAZIONE 2 SINTESI DEL PHENDIOLO.

Il legante **phendiolo** è scarsamente solubile nei più comuni solventi organici (CH_3CN , DMSO, DMF, etanolo e isopropanolo). Dalla struttura riportata in letteratura per l'addotto con HCl (Lin et al. 2009), si evidenzia un'estesa formazione di legami idrogeno intermolecolari e interazioni π - π a cui può essere attribuita la scarsa solubilità del composto. Il **phendiolo** è solubile in acqua solo a pH basico in cui subisce una reazione di ossidazione irreversibile che porta alla degradazione del prodotto.

1.3. Phendiossima

In letteratura, le ossime vengono ottenute per reazione del gruppo chetonico con idrossilammina cloridrata. Facendo reagire il **phendione** con idrossilammina cloridrata in assenza di altri reattivi, la reazione conduce esclusivamente alla formazione di 1,2,5-ossadiazolo-1,10-fenantroline (Lambeck and Kropf 1966). La formazione di questo prodotto è favorita anche da un riscaldamento prolungato. Inoltre, è stato riportato che il **phendione** in ambiente basico subisce reazione di decarbossilazione che porta alla formazione di 4,5-diazofluoren-9-one (Inglett and Smith 1950).

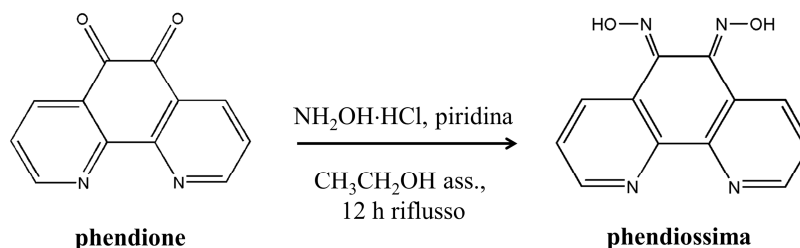
La sintesi della **phendiossima** è stata quindi condotta in diverse condizioni sperimentali, come riportato in **TABELLA 5**, utilizzando un carbonato di un metallo alcalino o alcalino-terroso per neutralizzare l'HCl rilasciato durante la reazione dall'idrossilammina cloridrata.

<i>Reagente</i>	<i>Solvente</i>	<i>Tempo e temperatura di reazione</i>	<i>Rif. bib.</i>
BaCO_3	Etanolo	12 h, riflusso	(Bodige and MacDonnell 1997)
Na_2CO_3	Etanolo	5 h, riflusso	(Kleineweischede and Mattay 2006)
Cs_2CO_3	Etanolo	12 h, riflusso	-

TABELLA 5 CONDIZIONI DI REAZIONE UTILIZZATE PER LA SINTESI DELLA PHENDIOSSIMA.

In queste condizioni di reazione e seguendo le metodiche riportate non è stato possibile isolare il prodotto desiderato.

La **phendiossima** è stata quindi ottenuta secondo lo **Schema di reazione 3**, in analogia con quanto riportato in letteratura per un composto avente due anelli tiofenici fusi con l'anello centrale orto-benzochinonico (Xie et al. 2013).



SCHEMA DI REAZIONE 3 SINTESI DELLA PHENDIOSSIMA.

In questo caso viene utilizzata come base la piridina e si usa etanolo assoluto come solvente. Il composto desiderato è stato quindi ottenuto con una buona resa (84 %).

Lo spettro ESI-MS del composto, riportato in **Figura 9**, mostra un unico picco con $m/z = 263$ che corrisponde al pattern isotopico e alla massa all'addotto della **phendiossima** con lo ione Na^+ .

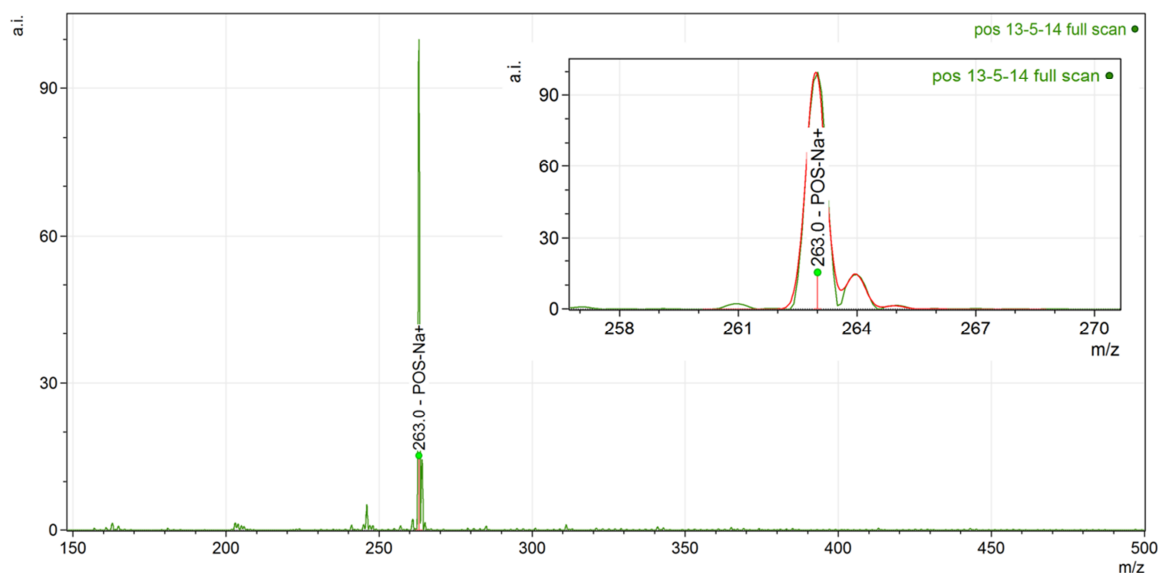


FIGURA 9 SPETTRO ESI-MS DELLA PHENDIOSSIMA; NEL RIQUADRO L'INGRANDIMENTO DEL PICCO CONFRONTATO CON IL PATTERN ISOTOPICO SIMULATO.

Lo spettro IR presenta i segnali relativi alla presenza del gruppo ossimico (stretching O-H e N-O) e alcuni segnali dello scheletro fenantrolinico (**Tabella 6**). Non è stato possibile invece

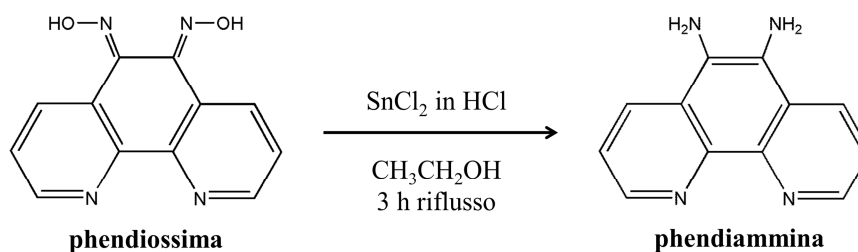
attribuire in modo univoco il segnale dello stretching C=N del gruppo ossimico, che dovrebbe cadere intorno a 1665 cm^{-1} .

<i>Posizione (cm⁻¹)</i>	<i>Descrizione</i>	<i>Attribuzione</i>
3522	sharp, medium	stretching O-H gruppo ossimico
3361, 3002, 2852	broad, strong	stretching C-H anello
1573, 1560, 1468, 1408	sharp, strong	stretching C=C anello
965, 954	sharp, medium	stretching N-O gruppo ossimico
806, 736, 630	sharp, strong	C=C-H bending

TABELLA 6 PRINCIPALI BANDE VIBRAZIONALI DELLA PHENDIOSSIMA E ATTRIBUZIONE PROPOSTA.

1.4. Phendiammina

La sintesi del legante **phendiammina** è stata effettuata per riduzione della **phendiossima** con cloruro di stagno(II), adattando una procedura riportata in letteratura (Xie et al. 2013), secondo quanto riportato nello **Schema di reazione 4**.



SCHEMA DI REAZIONE 4 SINTESI DELLA PHENDIAMMINA.

Questa metodica porta all'ottenimento di due prodotti solidi. Per entrambi i prodotti sono stati registrati gli spettri ESI-MS. Uno dei prodotti presenta il picco molecolare del legante **phendiammina** a 211 m/z , come si può osservare in **Figura 10**.

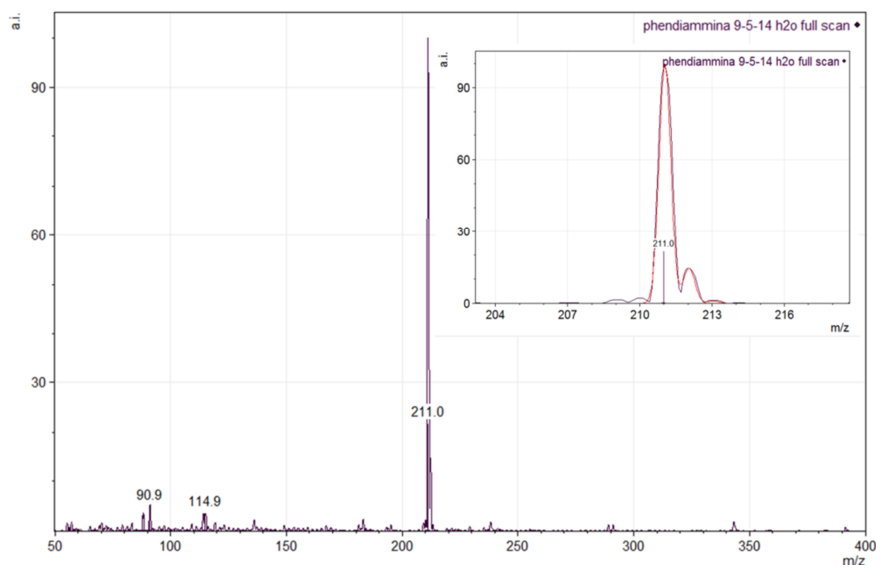


FIGURA 10 SPETTRO ESI-MS DELLA PHENDIAMMINA; NEL RIQUADRO L'INGRANDIMENTO DEL PICCO CONFRONTATO CON IL PATTERN ISOTOPICO SIMULATO.

Il secondo prodotto è un solido rosa che presenta nello spettro ESI-MS un solo picco a 235 m/z , come si può osservare in **Figura 11**.

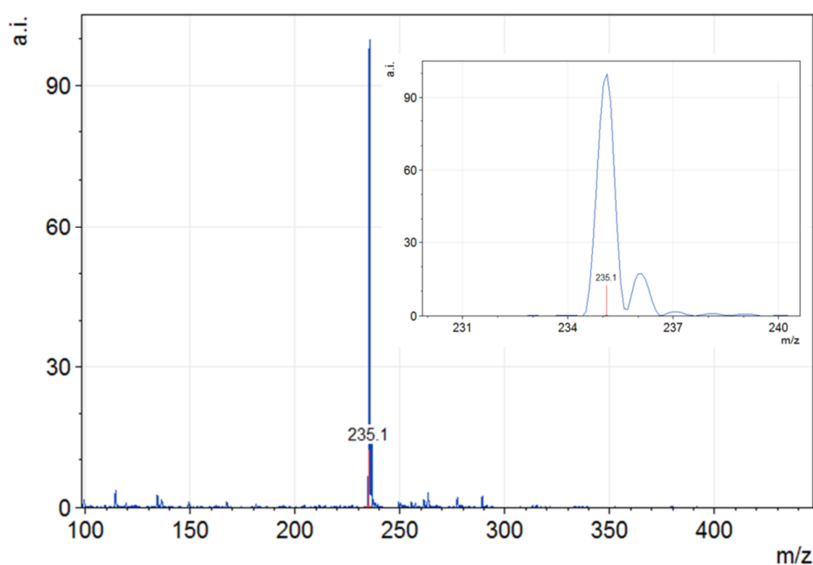


FIGURA 11 SPETTRO ESI-MS DEL SOTTOPIRODOTTO OTTENUTO DALLA SINTESI DELLA PHENDIAMMINA. NEL RIQUADRO L'INGRANDIMENTO DEL PICCO A 235 m/z .

Non è stato possibile stabilire con esattezza la struttura di questo composto, che è il prodotto principale della reazione, né incrementare la resa di **phendiammina** prodotta cambiando le condizioni di reazione.

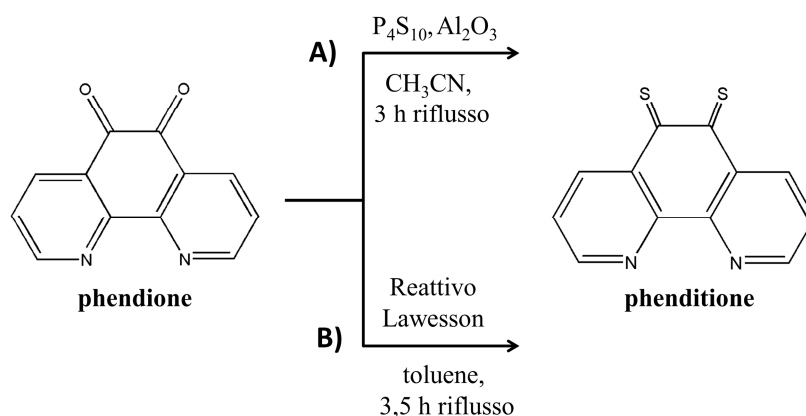
La riduzione della **phendioossima** è stata effettuata anche usando sodio idrogeno solfito come riducente secondo quanto riportato in un'altra procedura sperimentale (Comba et al. 2006), ma la reazione non ha portato all'isolamento di alcun prodotto.

1.5. Phenditione

La sintesi del composto **phenditione** non è riportata in letteratura. E' stato riportato che l'isolamento del 1,10-fenantrolin-5,6-ditiolo, in cui i due gruppi tiochettonici sono ridotti a tioli, è risultato impossibile (Keniley et al. 2010).

Per la preparazione del **phenditione** è stato effettuato un primo tentativo di sintesi utilizzando come agente solforante il decasolfuro di fosforo, P_4S_{10} , ampiamente utilizzato in letteratura come agente tionante (Ozturk et al. 2010). Il suo utilizzo insieme all'ossido di alluminio è stato proposto per la tionazione dei chetoni a tiochetoni (Polshettiwar and Kaushik 2004). Le condizioni di reazione sono riportate nello **Schema di reazione 5 A**.

E' stata impiegata anche una seconda via di sintesi, riportata nello **SCHEMA DI REAZIONE 5 B**, utilizzando come agente tionante il reattivo di Lawesson (2,4-bis(4-metossifenil)-1,3,2,4-ditiodifosfetano-2,4-ditione). Numerosi esempi in letteratura riportano la tionazione di chetoni ciclici per reazione con il reagente di Lawesson (Carta et al. 2012, Fournier et al. 2013, Ostrovskiy et al. 2011).



SCHEMA DI REAZIONE 5 CONDIZIONI DI REAZIONE A E B UTILIZZATE PER LA SINTESI DEL LEGANTE PHENDITIONE.

Negli spettri ESI-MS registrati per i prodotti di entrambe le sintesi (riportati in **Figura 12** e **Figura 13**) non è possibile evidenziare la presenza di un picco a 242 m/z che corrisponderebbe al legante desiderato.

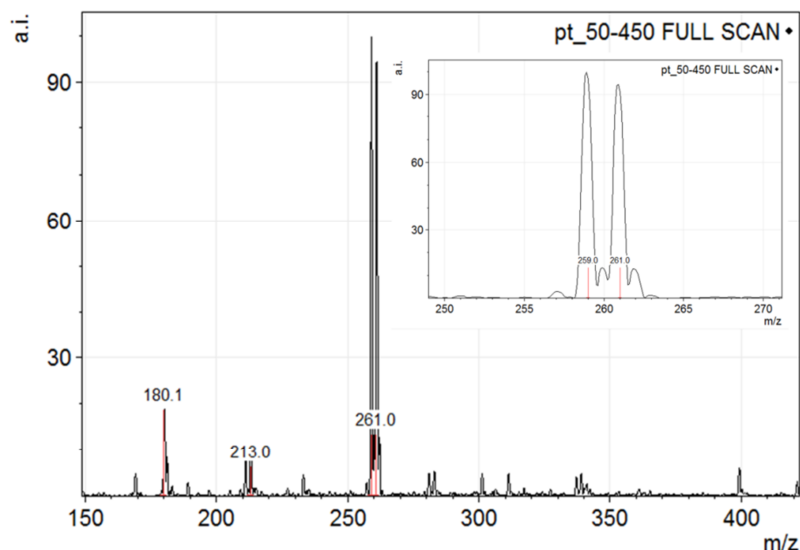


FIGURA 12 SPETTRO ESI-MS DEL PRODOTTO OTTENUTO DALLA SINTESI DEL PHENDIONE IN CONDIZIONI A. NEL RIQUADRO L'INGRANDIMENTO DEL PICCO A 259-261 m/z .

In entrambe le reazioni si ha la formazione di un prodotto con m/z 259-261: nelle condizioni di reazione **A** è il prodotto principale mentre nelle condizioni **B** è presente solo in piccole quantità.

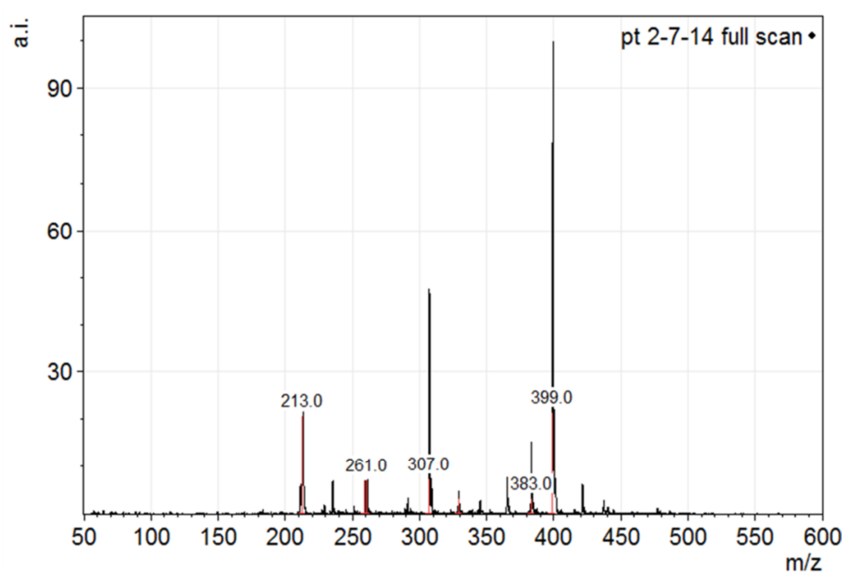


FIGURA 13 SPETTRO ESI-MS DEL PRODOTTO OTTENUTO DALLA SINTESI DEL PHENDIONE IN CONDIZIONI B.

Nella reazione con il reattivo di Lawesson, la presenza di picchi ad alti valori di m/z può essere indicativa della formazione di prodotti di addizione tra il **phendione** e l'agente tionante.

2 - Studio in soluzione degli equilibri tra Cu(II) e phen e phendione

Le misure sono state effettuate a 25 °C, per poterle confrontare con quanto riportato in letteratura, e a 37 °C, per simulare il comportamento del farmaco alla temperatura corporea. Come tampone di forza ionica è stato usato il cloruro di sodio 0.1 M. Tutte le soluzioni sono state retro-titolate con HCl a titolo noto per verificare la reversibilità degli equilibri.

2.1. Determinazione delle costanti di protonazione di phen e phendione a 25 e 37 °C

I dati sperimentali ottenuti con la titolazione potenziometrica (variazione di potenziale in funzione del volume di titolante) sono stati elaborati con il programma Hyperquad (Gans et al. 1996). E' possibile ipotizzare che a pH acido sia i due atomi di azoto che quelli di ossigeno presenti sul **phendione** siano protonati. Nella titolazione potenziometrica tra pH 2 e 11 è stato evidenziato un solo equilibrio sia nel caso della **phen** che del **phendione**. Questo equilibrio è stato attribuito alla protonazione di un atomo di azoto (vedi **Figura 14**); la protonazione del secondo atomo di azoto e degli ossigeni del **phendione** avvengono probabilmente ad un pH più acido, al di fuori del range di misura dell'elettrodo a vetro.

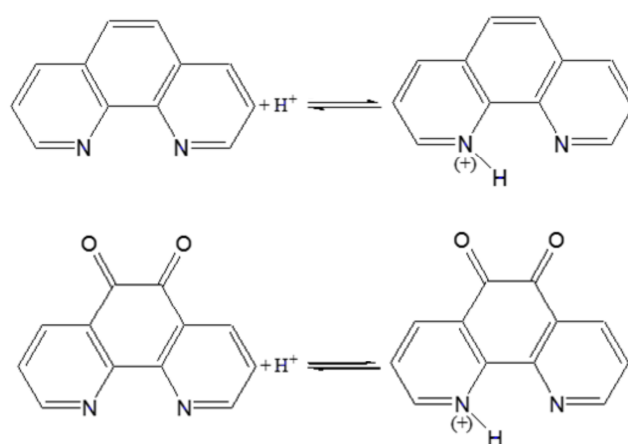


FIGURA 14 EQUILIBRIO DI PROTONAZIONE PER PHEN (SOPRA) E PHENDIONE (SOTTO).

In **Tabella 7** sono riportati i valori calcolati per i due leganti alle due diverse temperature. I valori delle costanti di protonazione di **phen** e **phendione** sono simili per entrambi i valori di temperatura studiati; l'introduzione dei due gruppi chetonici nell'anello centrale non sembra influenzare significativamente l'acidità dell'azoto. Si può osservare anche che all'aumentare della temperatura il valore della costante di protonazione diminuisce.

	<i>Log K</i>	
	25 °C	37 °C
phen	5.08 (1)	4.93 (1)
phendione	5.14 (1)	4.83 (1)

TABELLA 7 COSTANTI DI PROTONAZIONE PER PHEN E PHENDIONE A 25 E 37 °C.

2.2. Determinazione delle costanti di idrolisi di Cu(II) a 25 e 37 °C

Le costanti di idrolisi dello ione Cu(II) sono riportate in letteratura per una varietà di temperature e condizioni di forza ionica. Dal fitting dei dati potenziometrici raccolti si evidenzia la formazione di tre specie: $\text{Cu}(\text{OH})_2$, $[\text{Cu}(\text{OH})_3]^-$ e $[\text{Cu}_2(\text{OH})]^{3+}$. I valori delle costanti sono riportati in **Tabella 8**.

	<i>Log K</i>	
	25 °C	37 °C
$\text{Cu}(\text{OH})_2$	- 8.42 (1)	- 7.08 (1)
$[\text{Cu}(\text{OH})_3]^-$	- 19.07 (3)	-17.27 (3)
$[\text{Cu}_2(\text{OH})]^{3+}$	4.92 (3)	5.39 (4)

TABELLA 8 COSTANTI DI IDROLISI PER LO IONE Cu(II) IN NaCl 0.1 M.

Il tentativo di inserimento delle specie $[\text{Cu}(\text{OH})]^+$, $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}_3(\text{OH})_4]^{2+}$ nel fitting dei dati sperimentali ha portato a risultati non soddisfacenti.

I diagrammi di distribuzione a 25 (riportato in **Figura 15**) e 37 °C non presentano differenze significative nella specie presenti. A pH acido è presente solo la specie binucleare $[\text{Cu}_2(\text{OH})]^{3+}$; questa specie si trasforma in $\text{Cu}(\text{OH})_2$ per valori di pH maggiori di 6 e 7 (rispettivamente a 25 e 37 °C). Per entrambe le temperature la specie $[\text{Cu}(\text{OH})_3]^-$ inizia a formarsi in soluzione a partire da pH 8.

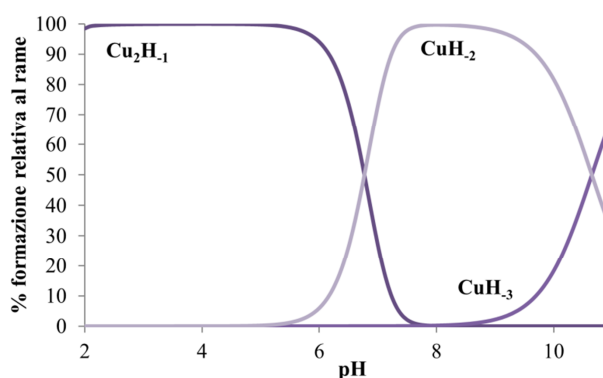


FIGURA 15 DIAGRAMMA DI DISTRIBUZIONE PER Cu(II).

2.3. Determinazione delle costanti di formazione dei complessi di Cu(II)

Sono state determinate le costanti di formazione dei complessi di Cu(II) con i leganti **phen** e **phendione**. Dall'elaborazione dei dati potenziometrici si evidenzia per entrambi i leganti la formazione di complessi in rapporto metallo:legante 1:1, 1:2 e 1:3, variamente protonati. Non si osserva la formazione di complessi polinucleari.

Sistema Cu(II)-phen

Le costanti di formazione dei complessi di Cu(II) con **phen** sono riportate in **Tabella 9**.

	25 °C		37 °C	
	<i>Log K</i>	<i>Log β</i>	<i>Log K</i>	<i>Log β</i>
[CuL ₃ H] ³⁺	-	36.7 (1)	-	36.5 (1)
[CuL ₃] ²⁺	4.4	32.3 (1)	3.8	32.7 (1)
[CuL ₂] ²⁺	-	25.5 (1)	-	27.58 (4)
[CuL ₂ H ₁] ⁺	7.78	17.72 (5)	8.17	19.41 (4)
CuL ₂ H ₂	10.18	7.54 (4)	10.8	8.6 (1)
[CuL] ²⁺	-	16.98 (2)	-	17.24 (2)
[CuLH ₁] ⁺	6.78	10.20 (2)	6.91	10.33 (5)
[CuLH ₃] ⁻	-	-	9.8	-9.3 (1)

TABELLA 9 COSTANTI DI FORMAZIONE PER I COMPLESSI DI CU(II) E PHEN.

Il diagramma di distribuzione del sistema Cu(II)-**phen** a 25 °C (**Figura 16**) per un rapporto metallo:legante 1:1 mostra esclusivamente la presenza della specie CuL, che perde un protone a pH basico. La perdita di tale protone è a carico di una molecola di acqua coordinata al metallo. Il diagramma di distribuzione a 37 °C è simile a quello riportato per la temperatura di 25°C.

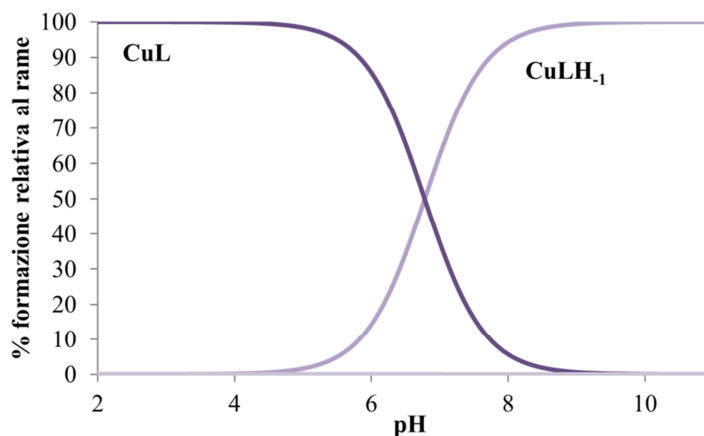


FIGURA 16 DIAGRAMMA DI DISTRIBUZIONE PER IL SISTEMA Cu(II)-PHEN IN RAPPORTO 1:1 A 25 °C.

Nel diagramma relativo al rapporto 1:2 a 25 °C (Figura 17), si osserva la formazione di complessi con rapporto stechiometrico 1:1, 1:2 e 1:3, variamente protonati. A 37 °C è invece presente solo il complesso 1:2, che all'aumentare del pH perde in successione uno o due protoni.

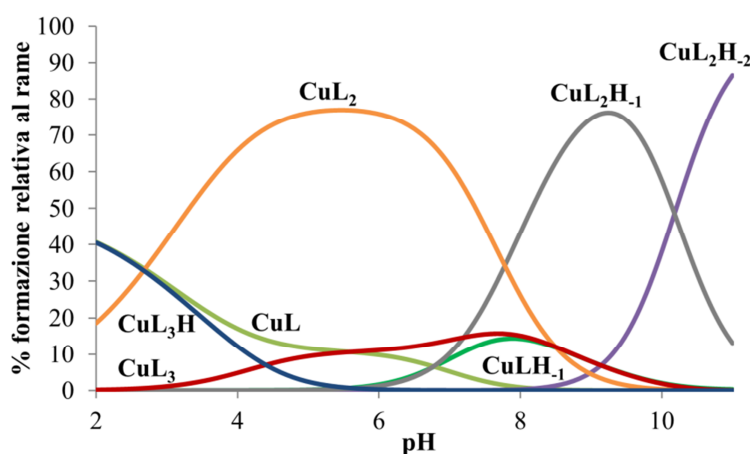


FIGURA 17 DIAGRAMMA DI DISTRIBUZIONE PER IL SISTEMA Cu(II)-PHEN IN RAPPORTO 1:2 A 25 °C.

Nel diagramma relativo al rapporto 1:3 a 25 °C, a pH acido si forma il complesso 1:3 protonato, che perde il protone intorno a pH 5. A pH basico è presente invece il complesso 1:2 con uno o due ioni idrossido. A 37 °C si osserva anche la presenza in soluzione di una piccola quantità di complesso 1:2 in tutto l'intervallo di pH studiato (Figura 18).

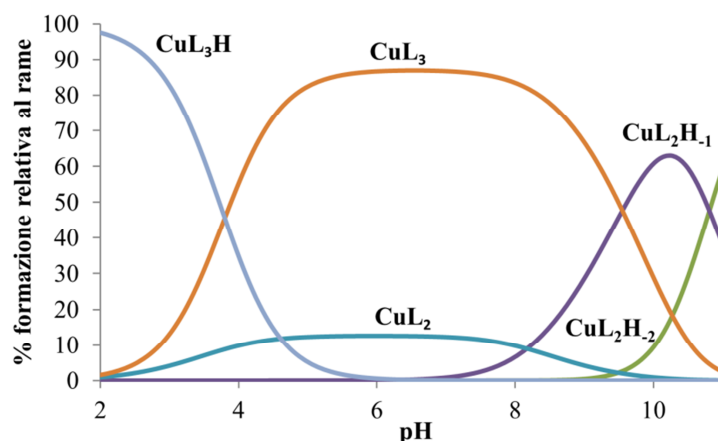


FIGURA 18 DIAGRAMMA DI DISTRIBUZIONE PER IL SISTEMA Cu(II)-PHEN IN RAPPORTO 1:3 A 37 °C.

Sistema Cu(II)-phendione

Le costanti di formazione dei complessi di Cu(II) con **phendione** sono riportate in **Tabella 10**.

	25 °C		37 °C	
	<i>Log K</i>	<i>Log β</i>	<i>Log K</i>	<i>Log β</i>
[CuL ₃ H] ³⁺	-	34.3 (1)	-	35.0 (1)
[CuL ₃] ²⁺	4.7	29.6 (1)	4.2	30.84 (5)
[CuL ₂ H] ³⁺	-	28.0 (1)	-	30.2 (1)
[CuL ₂] ²⁺	4.0	24.0 (1)	5.9	24.34 (3)
[CuL ₂ H ₁] ⁺	10.1	13.9 (1)	-	-
[CuL ₂ H ₃] ⁻	-	-	9.1	- 2.85 (4)
[CuL] ²⁺	-	15.51 (2)	-	15.71 (3)
[CuLH ₁] ⁺	6.97	8.54 (2)	6.9	8.8 (1)
CuLH ₂	-	-	7.6	1.19 (2)
[CuLH ₃] ⁻	10.97	- 13.40 (1)	10.10	- 8.91 (4)

TABELLA 10 COSTANTI DI FORMAZIONE PER I COMPLESSI DI Cu(II) E PHENDIONE.

Il diagramma di distribuzione del sistema Cu(II)-**phendione** a 25 °C per un rapporto metallo:legante 1:1 mostra esclusivamente la presenza del complesso 1:1, che perde uno e

tre protoni a pH basico. Nel diagramma a 37 °C è presente anche la specie CuLH_2 (Figura 19).

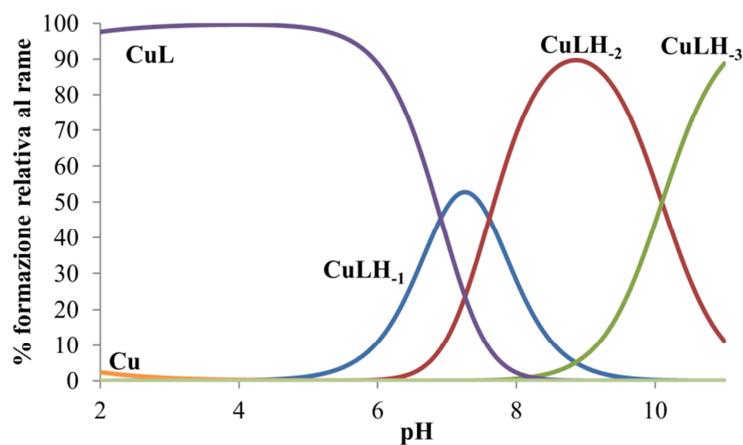


FIGURA 19 DIAGRAMMA DI DISTRIBUZIONE PER IL SISTEMA Cu(II) -PHENDIONE IN RAPPORTO 1:1 A 37 °C.

Nel diagramma relativo al rapporto 1:2 sia a 25 °C che a 37°C (Figura 20), si osserva la formazione di complessi in rapporto molare 1:1, 1:2 e 1:3, variamente protonati. Le principali specie presenti sono quelle del complesso 1:2 nei vari gradi di protonazione.

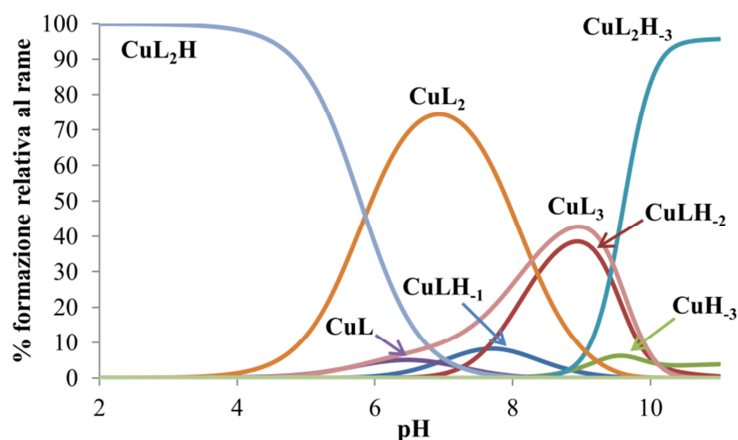


FIGURA 20 DIAGRAMMA DI DISTRIBUZIONE PER IL SISTEMA Cu(II) -PHENDIONE IN RAPPORTO 1:2 A 37 °C.

Nei diagrammi relativi al rapporto 1:3 si osserva in entrambi i casi che le specie prevalenti sono quelle 1:3; il complesso protonato a pH acido; la specie $[\text{CuL}_3]^{2+}$ dopo pH 5. In minor quantità è presente il complesso 1:2, anch'esso protonato a pH acido. A pH basico a 25 °C sono presenti le specie $[\text{CuLH}_1]^+$, $[\text{CuLH}_3]^-$ e $[\text{CuL}_2\text{H}_1]^+$, mentre a 37 °C si osserva solo la presenza di $[\text{CuLH}_3]^-$ (Figura 21).

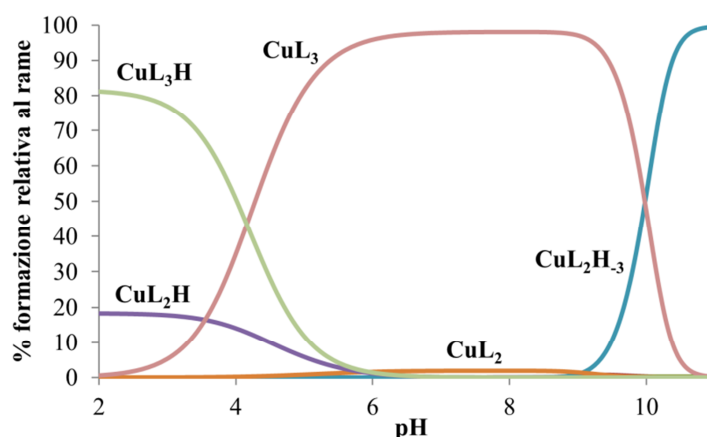


FIGURA 21 DIAGRAMMA DI DISTRIBUZIONE PER IL SISTEMA Cu(II)-PHENDIONE IN RAPPORTO 1:3 A 37 °C.

pMe

Confrontando le costanti relative alle stesse specie complesse, quelle associate alla **phen** presentano un valore maggiore di quelle relative al **phendione**, indicando una maggiore stabilità dei complessi in esame. Tuttavia, questo non tiene conto di tutti i complessi che si instaurano in soluzione ed è quindi insufficiente per stabilire quale legante formi complessi più stabili con il Cu(II). Per ottenere questa informazione è possibile calcolare il logaritmo della concentrazione di ione metallico libero all'equilibrio, ossia il pMe, in una soluzione con un valore specifico di pH, concentrazione totale di metallo e di legante. Minore è la concentrazione di metallo libero, maggiore sarà il pMe e quindi più forte risulterà quel determinato legante nei confronti dello ione metallico. I valori di pMe, calcolati a pH 7.4 e alle concentrazioni $L_{\text{tot}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ e $\text{Cu(II)}_{\text{tot}} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, sono riportati in **Tabella 11**.

	pMe	
	25 °C	37 °C
Cu(II)-phen	22.8	23.7
Cu(II)-phendione	20.3	21.4

TABELLA 11 VALORI DI pME PER Cu(II) CON I LEGANTI PHEN E PHENDIONE.

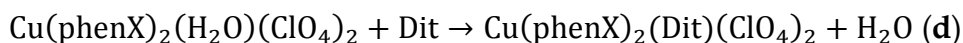
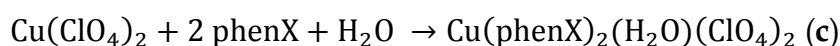
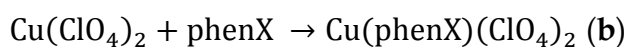
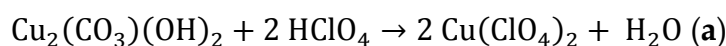
Dai valori ottenuti si può vedere che i complessi di **phen** con Cu(II) sono più stabili di quelli con **phendione** ad entrambi i valori di temperatura studiati.

3 - Sintesi dei complessi di Cu(II)

Le proprietà citotossiche dei complessi metallici sono fortemente influenzate dalla geometria di coordinazione del centro metallico e dal tipo di leganti. Sono stati quindi studiati dei complessi di rame che contengono dei derivati del 1,10-fenantrolina. In studi precedenti è stato evidenziato che l'introduzione di un legante ausiliare aumenta la citotossicità del complesso e variando i sostituenti presenti su di esso è possibile modulare la citotossicità nei confronti di diverse linee cellulari. E' stato quindi sostituito il legante ausiliare con un legante di tipo tiofenico. I derivati del tiofene si sono mostrati in grado di interagire con diversi sistemi biologici e possiedono proprietà analgesiche, antiinfiammatorie, antimicrobiche e antitumorali (Kulandasamy et al. 2009).

3.1. Sintesi dei complessi con phendione e phendiolo

I complessi di Cu(II) con **phendione** e **phendiolo** sono stati sintetizzati secondo lo schema di reazione riportato in **Schema di reazione 6**.



SCHEMA DI REAZIONE 6 SINTESI DEI COMPLESSI DI RAME(II) (phenX = phendione o phendiolo; **a** = isopropanolo, riscaldamento; **b** = isopropanolo; **c** = isopropanolo; **d** = isopropanolo, riscaldamento).

Il perclorato di rame è stato preparato *in situ* per reazione del carbonato basico di rame con acido perclorico concentrato (**Schema di reazione 6 a**). Successivamente il perclorato di rame è stato fatto reagire con un equivalente di legante fenantrolinico per ottenere il complesso uno a uno. (**Schema di reazione 6 b**) o con due equivalenti per il complesso uno a due (**Schema di reazione 6 c**). Quest'ultimo è stato fatto reagire con il legante imidazolidin-2-tione ed è stato ottenuto il complesso misto (**Schema di reazione 6 d**).

Gli spettri ESI-MS dei complessi $[\text{Cu}(\text{phendione})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$ e $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ non sono risultati risolutivi in quanto in entrambi gli spettri il legante **phendione** subisce decarbossilazione. Inoltre, il Cu(II) è ridotto a Cu(I) in fase di ionizzazione, come osservato anche in letteratura (Hao and March 2001). Nello spettro del complesso $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$, riportato in **Figura 22**, sono

infatti presenti i picchi corrispondenti ai complessi 1:1 e 1:2 del Cu(I) con il legante **phen**: 243 m/z vi è il picco corrispondente alla specie $[\text{Cu}(\text{phen})]^+$, a 342 m/z quello relativo a $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{ClO}_4)]^+$ mentre a 423 m/z vi è il picco relativo alla specie $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$.

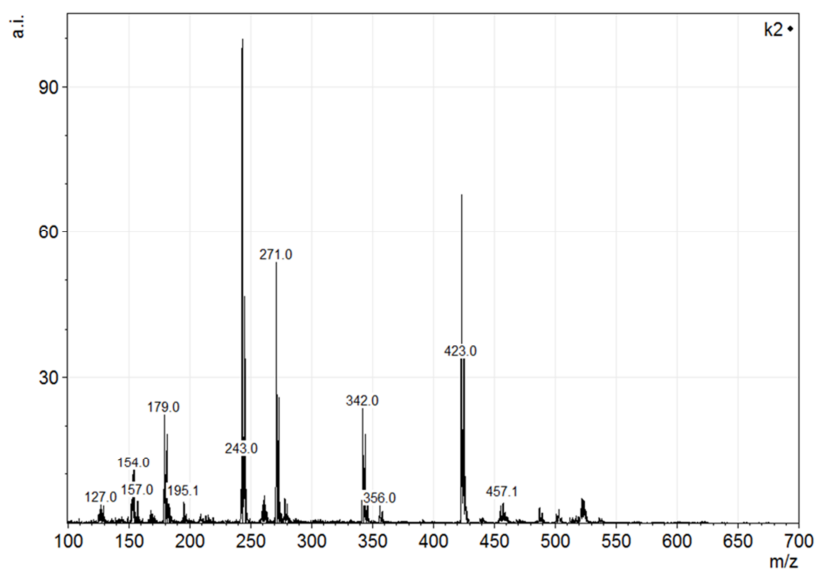


FIGURA 22 SPETTRO ESI-MS DEL COMPLESSO $[\text{Cu}(\text{phenandione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$.

Lo spettro ESI-MS del complesso $[\text{Cu}(\text{phenandione})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$, riportato in **Figura 23**, presenta gli stessi segnali dello spettro del corrispondente complesso 1:2 ma con intensità differenti: il picco relativo alla specie $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ a 423 m/z è presente con una minore intensità mentre quello a 342 m/z relativo a $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{ClO}_4)]^+$ ha un'intensità maggiore.

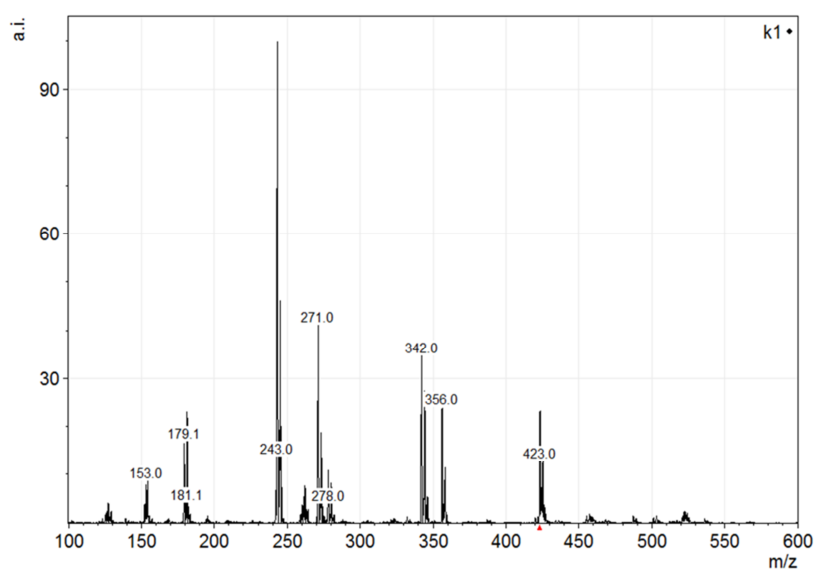


FIGURA 23 SPETTRO ESI-MS DEL COMPLESSO $[\text{Cu}(\text{phenandione})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$.

Le strutture dei complessi di Cu(II) con uno e con due leganti **phen** sono riportate in letteratura (Murphy et al. 1997, Pivetta et al. 2012). La struttura cristallina del complesso $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ è stata risolta ed è discussa nel paragrafo 3.2.

Sulla base di queste informazioni e degli spettri IR sono state ipotizzate le formule molecolari dei complessi di cui non sono stati ottenuti cristalli adatti alla risoluzione della struttura cristallina: $[\text{Cu}(\text{phendione})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$, $[\text{Cu}(\text{phendiolo})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$ e $[\text{Cu}(\text{phendiolo})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$.

3.2. Descrizione della struttura molecolare di $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$

Il complesso $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$, la cui cella elementare è riportata in **Figura 24**, presenta lo ione Cu(II) in una coordinazione ottaedrica distorta. coordina il Cu(II) con gli atomi di azoto donatori che occupano entrambi posizioni equatoriali, mentre l'altro coordina il Cu(II) con un atomo di azoto in posizione equatoriale e l'altro in posizione assiale. I siti di coordinazione equatoriali sono completati da una molecola d'acqua, che interagisce attraverso un legame a idrogeno con uno ione perclorato che completa invece i siti di coordinazione assiali.

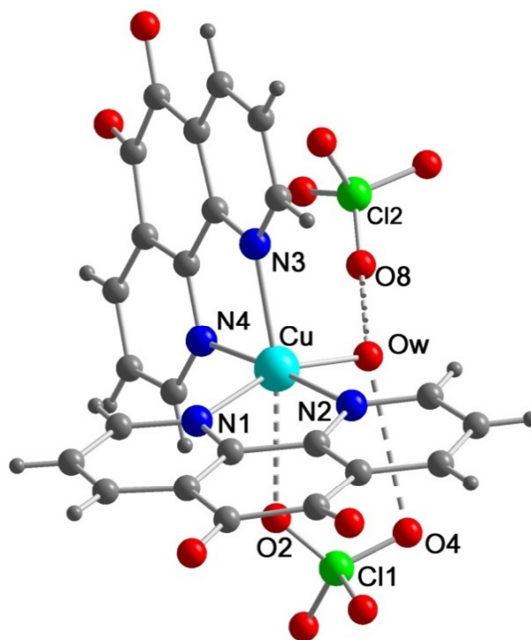


FIGURA 24 CELLA ELEMENTARE PER $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$.

La molecola d'acqua di coordinazione interagisce attraverso un'interazione di legame a idrogeno anche con un secondo ione perclorato non coordinante che si comporta da semplice controione. Lo ione Cu(II) risulta spostato di 0.20 Å dal piano equatoriale definito dagli atomi N1, N2, N4 e Ow, verso la posizione apicale N3.

La struttura di questo complesso è differente da quella del corrispondente complesso con il legante **phen**, $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$, in cui entrambi gli ioni di perclorato stanno fuori dalla sfera di coordinazione interna e il Cu(II) ha una geometria trigonale bipyramidale.

3.3. Sintesi dei complessi con leganti tiofenici

I leganti tiofenici **T**₁-**T**₄, riportati in **Figura 25**, sono stati fatti reagire con il complesso $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$, ottenendo dei complessi di Cu(II) con due leganti **phen** e uno tiofenico.

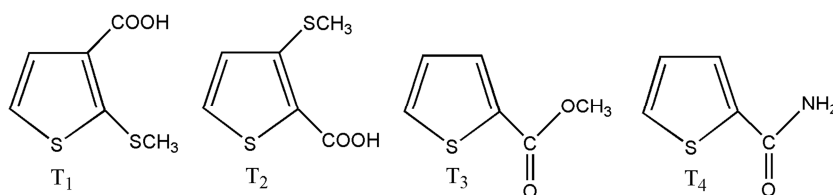


FIGURA 25 LEGANTI TIOFENICI T STUDIATI.

Dallo spettro IR non è possibile individuare chiaramente le bande tipiche dell'anello tiofenico. Infatti, lo stretching asimmetrico C-S-C e il bending C-S cadono rispettivamente a 600 e 720 cm^{-1} sono coperti dai segnali di bending C=C-H della phen. E' possibile identificare una banda intorno a 1729 cm^{-1} dovuta allo stretching C=O del gruppo carbonilico presente in tutti i leganti T. In tutti gli spettri dei complessi sono inoltre presenti i segnali di stretching Cl-O del gruppo perclorato e quelli di bending C=C-H del sistema aromatico fenantrolinico. Gli spettri IR mostrano globalmente uno spostamento della banda del carbonile del legante verso frequenze minori rispetto a quelle dei leganti liberi. Sulla base di queste considerazioni è possibile ipotizzare che i leganti **T**₁ e **T**₂ coordinino tramite il gruppo carbossilico mentre i leganti **T**₃ e **T**₄ coordinino tramite l'ossigeno carbonilico e non con l'atomo di zolfo tiofenico. Gli spettri ESI-MS confermano la formazione del complesso.

4 - Attività citotossica dei complessi di Cu(II)

L'attività citotossica dei complessi di Cu(II) e dei leganti liberi è stata testata sulle linee cellulari umane di carcinoma prostatico (DU-145), epatocellulare (HEP-G2), polmonare a cellule squamose (SK-MES-1), tumore alla cervice uterina (HeLa), tumore laringo-faringeo (KB) e leucemia linfoblastica acuta di tipo T (CCRF-CEM) e B (CCRF-SB). I risultati sono

espressi come CC_{50} del composto nei confronti della linea cellulare (vedi capitolo **Introduzione**, paragrafo 2.2.).

4.1. Complessi con leganti fenantrolinici

L'attività citotossica dei complessi di Cu(II) con **phendione** e **phendiolo** e dei leganti liberi è riportata in **Tabella 12**.

	CC_{50} (μM)				
	DU-145	HEP-G2	SK-MES-1	CCRF-CEM	CCRF-SB
phen	2.3	1.7	2.6	2.7	1.2
[Cu(phen)(H ₂ O) ₂ (ClO ₄) ₂]	2.6	2.9	5.0	3.01	1.4
[Cu(phen) ₂ (H ₂ O)](ClO ₄) ₂	1.6	1.05	0.93	1.5	0.5
phendione	2.2	1.6	1.9	2.9	0.95
[Cu(phendione)(H ₂ O) ₂ (ClO ₄) ₂]	4.1	1.7	3.1	3.8	1.2
[Cu(phendione) ₂ (H ₂ O)(ClO ₄)](ClO ₄)	1.16	0.67	1.2	0.8	0.42
phendiolo	0.79	2.9	0.47	0.15	0.145
[Cu(phendiolo)(H ₂ O) ₂ (ClO ₄) ₂]	4.0	3.6	2.25	0.18	0.2
[Cu(phendiolo) ₂ (H ₂ O)](ClO ₄) ₂	0.93	1.2	0.54	0.09	0.07

TABELLA 12 CITOTOSSICITÀ DEI COMPLESSI DI RAME(II) CON PHEN, PHENDIONE E PHENDIOLO.

Per confrontare la citotossicità dei leganti e dei complessi sulle singole linee i dati della **Tabella 12** sono stati riportati in grafico in **Figura 26**.

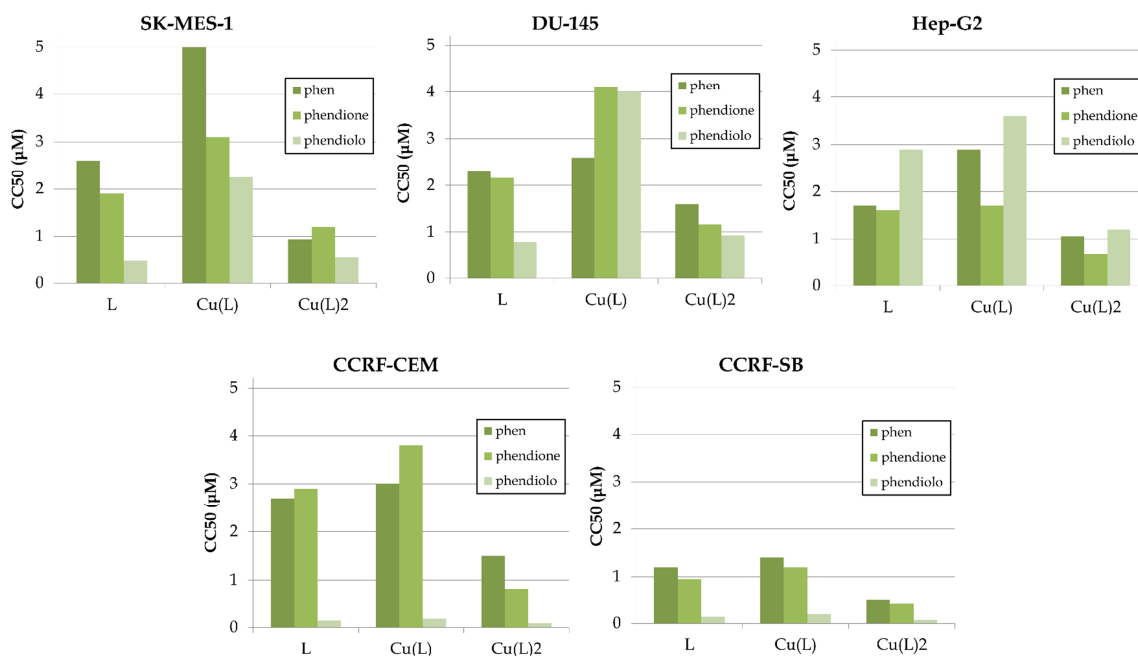


FIGURA 26 CITOTOSSICITÀ DEI COMPLESSI DI RAME(II) CON PHEN, PHENDIONE E PHENDIOLO.

Dall'analisi dei dati si possono trarre alcune considerazioni generali:

- i complessi contenenti un solo legante fenantrolinico hanno citotossicità simile o inferiore al legante libero mentre i complessi con due leganti presentano generalmente una CC_{50} minore di quella del legante.
- i composti contenenti **phendiolo** sono i più attivi nelle linee tumorali SK-MES-1, DU-145, CCRF-CEM e CCRF-SB.
- nella linea tumorale Hep-G2 i composti più attivi sono quelli contenenti **phendione**.

4.2. Complessi con leganti tiofenici

E' stata studiata la citotossicità dei complessi misti di Cu(II) con leganti tiofenici nei confronti di due linee cellulari leucemiche e di alcune linee tumorali solide.

	CC ₅₀ (μM)					
	CCRF-CEM	CCRF-SB	DU-145	HeLa	HEP-G2	SK-MES-1
<i>T₁-T₄</i>	> 100	> 100	> 10	> 10	> 10	> 10
[Cu(phen) ₂ (H ₂ O)](ClO ₄) ₂	1.25	0.50	2.28	1.97	1.05	> 5
[Cu(phen) ₂ (Dit)](ClO ₄) ₂	0.8	0.7	1.71	2.69	1.15	> 5
[Cu(phen) ₂ (T₁)](ClO ₄)	1.51	0.80	3.38	4.51	1.95	2.10
[Cu(phen) ₂ (T₂)](ClO ₄)	1.53	0.54	2.24	2.15	1.58	1.74
[Cu(phen) ₂ (T₃)](ClO ₄)	1.37	0.58	2.41	2.49	1.71	1.70
[Cu(phen) ₂ (T₄)](ClO ₄)	0.83	0.65	1.67	1.84	1.12	1.02
<i>Cisplatino</i>	0.88	1.38	2.0	2.2 ¹	12.0	20.0

TABELLA 13 CITOTOSSICITÀ DEI COMPLESSI DI CU(II) CON LEGANTI TIOFENICI E DI COMPOSTI DI RIFERIMENTO VERSO DIVERSE LINEE CELLULARI TUMORALI UMANE (1da (Minagawa et al. 1999)).

Dai dati di citotossicità riportati in **Tabella 13** si evidenzia che:

- i leganti non hanno alcuna attività citotossica nei confronti delle diverse linee tumorali studiate.
- Su tutte le linee cellulari i complessi con leganti tiofenici hanno una CC₅₀ minore o dello stesso ordine di grandezza del cisplatino.
- i composti tiofenici sono meno efficaci sulla linea tumorale DU-145 del carcinoma alla prostata e su HeLa, tumore alla cervice uterina.
- il composto [Cu(**phen**)₂**T₄**](ClO₄) presenta l'attività citotossica maggiore su tutte le linee cellulari ed è il più promettente tra i complessi con leganti tiofenici.

Per quanto riguarda la sostituzione del legante imidazolidintionico con un derivato tiofenico, si può vedere che l'attività citotossica del complesso contenente il **Dit** è simile a quella del complesso contenente **T₄** ed è superiore a quella degli altri complessi con derivati tiofenici.

Infine, è stata misurata l'attività citotossica nei confronti della linea cellulare del tumore laringo-faringeo (KB wt) e di linee cellulari da essa derivate resistenti alla vincristina (KB v20c) e multifarmaco resistenti (KB mdr).

	CC ₅₀ (μM)		
	KB wt	KB mdr	KB v20c
<i>T₁-T₄</i>	> 100	> 100	> 100
[Cu(phen) ₂ (H ₂ O)](ClO ₄) ₂	1.83	0.79	< 0.4
[Cu(phen) ₂ (Dit)](ClO ₄) ₂	0.87	0.80	0.68
[Cu(phen) ₂ (T₁)](ClO ₄)	1.50	0.72	1.29
[Cu(phen) ₂ (T₂)](ClO ₄)	1.59	1.18	1.65
[Cu(phen) ₂ (T₃)](ClO ₄)	1.44	0.81	1.20
[Cu(phen) ₂ (T₄)](ClO ₄)	0.63	0.64	0.64
<i>Cisplatino</i>	>>8	>>8	7.89
<i>Vincristina</i>	0.016	1.44	0.11
<i>Doxorubicina</i>	0.86	19.9	2.73

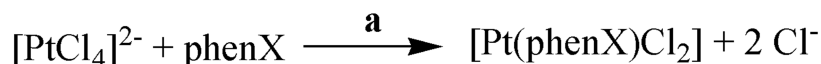
TABELLA 14 ATTIVITÀ CITOTOSSICA DEI I COMPLESSI DI CU(II) CON LEGANTI TIOFENICI E COMPOSTI DI RIFERIMENTO VERSO LINEE CELLULARI NORMALI E RESISTENTI DI TUMORE LARINGO-FARINGEO.

Come si vede dai dati riportati in **Tabella 14**, il cisplatino è poco attivo sulle linee cellulare KB e sulle linee resistenti da essa derivate. I complessi misti di Cu(II) con leganti tiofenici invece presentano una buona attività citotossica, maggiore di quella del complesso precursore [Cu(**phen**)₂(H₂O)](ClO₄)₂. Confrontandoli invece con il complesso contenente il legante **Dit**, si può vedere che solo il complesso contenente **T₄** ha una CC₅₀ più bassa e quindi maggiore attività. Su entrambe le linee cellulari resistenti (KB mdr e KB v20c) i complessi tiofenici sono più citotossici che sulla linea non resistente (KB wt) mentre la CC₅₀ di vincristina e doxorubicina aumenta almeno di un ordine di grandezza.

5 - Sintesi e attività citotossica dei complessi di Pt(II)

5.1. Sintesi dei complessi di Pt(II)

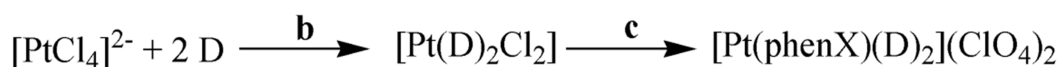
I complessi di Pt(II) con i leganti **phen**, **phendione** e **phendiolo** sono stati sintetizzati secondo lo schema di reazione riportato in **Schema di reazione 7**.



SCHEMA DI REAZIONE 7 SINTESI DEI COMPLESSI DI PLATINO(II) CON LEGANTI FENANTROLINICI
(phenX = **phen**, **phendione**, **phendiolo**; **a** = DMF/H₂O, riflusso).

La struttura cristallina dei complessi [Pt(**phen**)Cl₂] e [Pt(**phendione**)Cl₂] è riportata in letteratura (Grzesiak and Matzger 2007, Roy et al. 2008) mentre per il complesso [Pt(**phendiolo**)Cl₂] è stata ipotizzata la stessa formula molecolare, sulla base dei dati IR ottenuti (vedi capitolo **Parte Sperimentale**).

Questi complessi non reagiscono in presenza dei leganti imidazolidin-2-tione. Per la sintesi dei complessi misti è stato quindi preparato *in situ* il complesso di Pt(II) con i leganti imidazolidin-2-tione (indicati genericamente con la lettera **D**) ed è stato fatto poi reagire con il legante fenantrolinico, secondo lo schema di reazione riportato in **Schema di reazione 8**.



Schema di reazione 8 SINTESI DEI COMPLESSI MISTI DI PLATINO(II) CON LEGANTI FENANTROLINICI E
IMIDAZOLIDINTIONICI
(phenX = **phen**, **phendione**, **phendiolo**; **D** = **Dit**, **DitMe**, **DitEt**; **b** = H₂O; **c** = phenX in DMF, riflusso).

I leganti imidazolidintionici utilizzati sono riportati in **Figura 27**. I relativi complessi di Pt(II), la cui formula ipotizzata è [Pt(**D**)₂Cl₂], si formano rapidamente ed è possibile isolarli allo stato solido. L'utilizzo di leganti imidazolidintionici sostituiti con gruppi metilici o etilici su entrambi gli atomi di azoto non porta invece alla formazione di alcun prodotto. Questo è probabilmente dovuto ad un maggiore ingombro sterico dei leganti N,N-sostituiti.

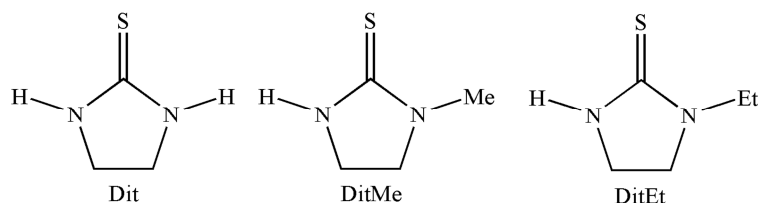


FIGURA 27 LEGANTI IMIDAZOLIDIN-2-TIONE **D** STUDIATI.

Dagli spettri IR si può osservare che in tutti i complessi sono presenti i segnali di stretching Cl-O del gruppo perclorato e quelli di bending C=C-H del sistema aromatico fenantrolinico.

I complessi misti sono scarsamente solubili in acqua e nei più comuni solventi organici (DMF, DMSO, acetonitrile, isopropanolo, etanolo, metanolo). Questo non consente di studiare gli equilibri di formazione dei complessi tramite tecniche spettrofotometriche e potenziometriche.

5.2. Studio del momento di dipolo dei complessi di Pt(II)

La polarità di un composto ne influenza la solubilità, i meccanismi di trasporto nel corpo e le modalità di ingresso nella cellula. Per determinare la polarità di un composto viene solitamente determinato il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua. A causa della scarsa solubilità dei complessi di Pt(II) sintetizzati non è possibile determinarne sperimentalmente il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ed è stato quindi studiato il momento di dipolo attraverso calcoli quantomeccanici.

I momenti di dipolo sono stati calcolati con metodi semi-empirici PM3. Sebbene i risultati ottenuti con tale metodo possano talvolta discostarsi dai valori sperimentali (Kozelka and Bergès 1998), esso è largamente utilizzato per l'ottimizzazione della geometria molecolare in quanto necessita di minori risorse di calcolo (Alias et al. 2012, Chojnacki 2003, Fuks et al. 2005, Ravera et al. 2011, Senerovic et al. 2014).

In questo caso i valori del momento di dipolo non sono stati considerati come valore assoluto ma utilizzati per ordinare i composti secondo polarità crescente. Inoltre, i valori ottenuti sono dello stesso ordine di grandezza di quelli riportati in letteratura per complessi di platino simili. Ad esempio, per il complesso $[PtL_2Cl_2]$ ($L = 5\text{-metil-5(4-piridil)idantoina}$) è stato calcolato un momento di dipolo pari a 13.35 D (Bakalova et al. 2009) mentre per i complessi $[PtLCl_2] \cdot H_2O$ sono pari a 2.96 e 3.97 D (rispettivamente per $L = (1H\text{-benzimidazol-2-ilmetil})\text{-}(4\text{-metossil-fenil})\text{-ammina}$ e $(1H\text{-benzimidazol-2-ilmetil})\text{-}(4\text{-metil-fenil})\text{-ammina}$) (Abdel Ghani and Mansour 2011).

I valori calcolati sui complessi di Pt(II) studiati sono riportati in **Tabella 15**.

Momento di dipolo (D)	
[Pt(phen)Cl ₂]	16.03
[Pt(phen)(Dit) ₂] ²⁺	5.44
[Pt(phen)(DitMe) ₂] ²⁺	7.86
[Pt(phen)(DitEt) ₂] ²⁺	10.27
[Pt(phendione)Cl ₂]	9.83
[Pt(phendione)(Dit) ₂] ²⁺	1.81
[Pt(phendione)(DitMe) ₂] ²⁺	3.18
[Pt(phendione)(DitEt) ₂] ²⁺	3.73
[Pt(phendiolo)Cl ₂]	14.45
[Pt(phendiolo)(Dit) ₂] ²⁺	10.03
[Pt(phendiolo)(DitMe) ₂] ²⁺	13.88
[Pt(phendiolo)(DitEt) ₂] ²⁺	17.15

TABELLA 15 MOMENTI DI DIPOLO CALCOLATI CON METODI SEMI-EMPIRICI PM3 PER I COMPLESSI DI Pt(II).

I complessi contenenti solo un legante fenantrolinico presentano polarità crescente nell'ordine [Pt(**phendione**)Cl₂] < [Pt(**phendiolo**)Cl₂] < [Pt(**phen**)Cl₂]. Il complesso più polare risulta quindi essere quello con il legante **phen**. Questo risultato è in linea con quanto ci si aspetta per un complesso quadrato planare con due sostituenti molto polari come gli atomi di cloro in configurazione *cis*.

Per quanto riguarda i complessi con leganti misti, nella serie di complessi contenenti **phen** la polarità aumenta all'aumentare della lunghezza della catena presente sul sostituito imidazolidintionico. Il complesso più polare risulta quindi essere [Pt(**phen**)(DitEt)₂]²⁺ che è però meno polare rispetto al complesso [Pt(**phen**)Cl₂]. Mentre nella serie con il legante **phendione** l'andamento è lo stesso, nei complessi contenenti **phendiolo** la polarità aumenta allo stesso modo nei complessi misti ma il complesso contenente il legante **DitEt** risulta più polare di [Pt(**phendiolo**)Cl₂].

5.3. Attività citotossica dei complessi di Pt(II)

L'attività dei complessi di Pt(II) sintetizzati è stata testata su diverse linee cellulari; i valori di CC₅₀ sono riportati in **Tabella 16**.

	CC ₅₀ (μM)				
	DU-145	HEP-G2	SK-MES-1	CCRF-CEM	CCRF-SB
[Pt(phen)Cl ₂]	*	*	*	2.3	2.0
[Pt(phen)(Dit) ₂](ClO ₄) ₂	*	*	*	7.2	13.4
[Pt(phen)(DitMe) ₂](ClO ₄) ₂	*	*	*	2.4	1.1
[Pt(phen)(DitEt) ₂](ClO ₄) ₂	*	*	*	3.4	5.8
[Pt(phendione)Cl ₂]	9	15	7.7	2.1	2.2
[Pt(phendione)(Dit) ₂](ClO ₄) ₂	6.1	12.9	5.2	1.4	2
[Pt(phendione)(DitMe) ₂](ClO ₄) ₂	*	*	*	*	*
[Pt(phendione)(DitEt) ₂](ClO ₄) ₂	18.8	10.7	10.8	2.5	3.4
[Pt(phendiolo)Cl ₂]	22	50	10	3.3	1.8
[Pt(phendiolo)(Dit) ₂](ClO ₄) ₂	5.1	8	5.2	0.9	0.97
[Pt(phendiolo)(DitMe) ₂](ClO ₄) ₂	*	*	*	*	*
[Pt(phendiolo)(DitEt) ₂](ClO ₄) ₂	17.4	1.6	9	2.9	1.8
Cisplatino	2.0	12.0	20.0	1.1	1.22

TABELLA 16 CITOTOSSICITÀ DEI COMPLESSI DI Pt(II) CON PHEN, PHENDIONE E PHENDIOLO, E LEGANTI IMIDAZOLIDINTIONICI.

I valori indicati con * rappresentano test ancora in corso su alcune linee cellulari o misure da ripetere. I complessi di formula generale [Pt(**D**)₂Cl₂] presentano valori di CC₅₀ maggiori di 100 μM, risultando quindi privi di attività citotossica (valori non riportati in tabella).

In **Figura 28** sono riportati in grafico i dati relativi alla citotossicità sulle linee tumorali leucemiche per i complessi contenenti solo leganti fenantrolinici [Pt(**phenX**)Cl₂] (indicati come Pt(**phenX**)), per i complessi [Pt(**phenX**)(**Dit**)₂](ClO₄)₂ e [Pt(**phenX**)(**DitEt**)₂](ClO₄)₂ (indicati rispettivamente con +2 **Dit** e +2 **DitEt**).

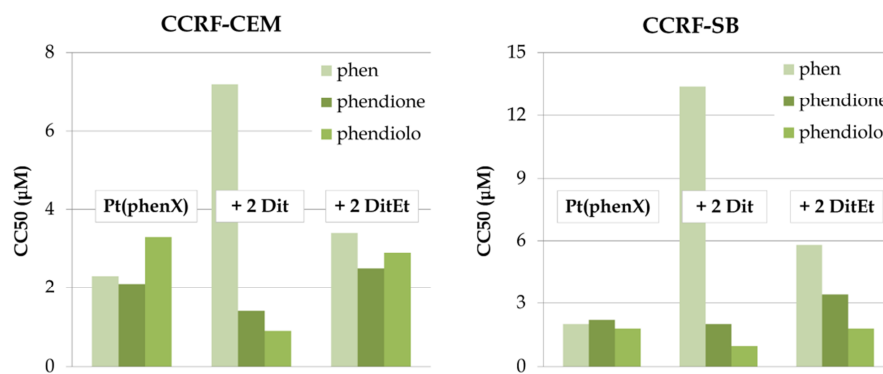


FIGURA 28 CITOTOSSICITÀ DEI COMPLESSI DI PT(II) CON PHEN, PHENDIONE E PHENDIOLO SULLE LINEE TUMORALI CCRF-CEM E CCRF-SB.

Si può osservare che la citotossicità dei complessi sulle linee tumorali leucemiche è inversamente proporzionale alla polarità calcolata. Per quanto riguarda i complessi di **phen** contenenti il legante **DitMe**, essi non rispettano la correlazione trovata come si può osservare dai valori di CC_{50} riportati in **Tabella 16**. Il complesso più attivo è generalmente quello che contiene **phendiolo** come legante fenantrolinico.

In **Figura 29** sono riportati i grafici dell'attività citotossica dei complessi di platino con **phendione** e **phendiolo** sulle linee tumorali di tipo solido.

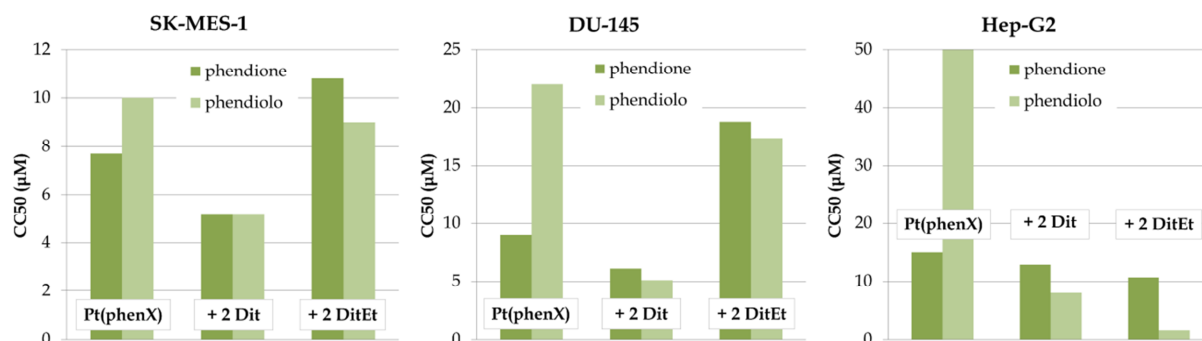


FIGURA 29 CITOTOSSICITÀ DEI COMPLESSI DI PT(II) CON PHENDIONE E PHENDIOLO SULLE LINEE TUMORALI SK-MES-1, DU-145 E HEP-G2.

In generale, i complessi contenenti **phendione** e **phendiolo** risultano poco attivi su queste linee cellulari, anche rispetto a quelle leucemiche. I complessi più attivi sono quelli che contengono il legante **Dit**, che presenta il valore di CC_{50} minore tranne che nella linea tumorale epatica (Hep-G2) in cui è più attivo il complesso contenente il legante **DitEt**. Per quanto riguarda l'effetto dei diversi leganti fenantrolinici, nei complessi misti è sempre più attivo il phendiolo mentre nei complessi con formula $[Pt(\text{phenX})Cl_2]$ è più attivo il complesso contenente il phendione.

In tutte le linee cellulari il complesso più attivo è quello che contiene il **phendiolo** come legante fenantrolinico e il **Dit** come legante ausiliare.

5.4. Confronto con i complessi di Cu(II)

I complessi di Cu(II) e di Pt(II) studiati presentano gli stessi leganti fenantrolinici e imidazolidintionici. E' quindi interessante confrontarne la citotossicità per valutare il contributo del centro metallico. Bisogna però considerare che i complessi di platino studiati presentano un solo legante fenantrolinico e un legante imidazolidintionico mentre quelli di rame presentano uno o due leganti fenantrolinici e un solo legante imidazolidintionico.

- I complessi di Pt(II) risultano generalmente meno attivi di quelli di Cu(II) su tutte le linee cellulari studiate. I complessi di platino presentano i valori più bassi di CC_{50} , nel range 1-13 μ M, sulla linea tumorale di leucemia linfoblastica acuta di tipo B (CCRF-SB). Sulla stessa linea cellulare, i complessi di rame presentano CC_{50} nel range 0.07-1.4 μ M.
- Sia nei complessi di rame che in quelli di platino, i complessi con il legante **phendiolo** sono generalmente i più attivi su tutte le linee cellulari testate. Fa eccezione la linea tumorale epatica Hep-G2, su cui risultano più attivi i complessi con **phendione**.
- Nei complessi di platino la sostituzione di un legante **Dit** con un **DitEt** si traduce in un aumento del valore di CC_{50} di 2-3 volte. Nei complessi di Cu(II) invece, la sostituzione dei leganti imidazolidintionici con quelli tiofenici non porta a delle variazioni significative nella citotossicità. L'influenza del legante ausiliario risulta quindi molto più marcata nei complessi di Pt(II).

6 - Studio delle combinazioni di cisplatino e complessi di Cu(II)

Il cisplatino interagisce con alcune delle proteine deputate all'omeostasi del rame nell'uomo. Allo scopo di verificare se questa interazione può avere ricadute interessanti in campo biomedico, è stata studiata l'attività citotossica di miscele di cisplatino e complessi di Cu(II). I complessi di rame studiati, riportati in **Figura 30**, mostrano attività citotossica contro diverse linee tumorali cellulari. Le combinazioni binarie di cisplatino e dei tre complessi di rame sono state quindi studiate per individuare l'eventuale attività sinergica,

antagonista o additiva. Tutti i sistemi sono stati testati sulla linea cellulare umana di leucemia linfoblastica acuta di tipo T (CCRF-CEM).

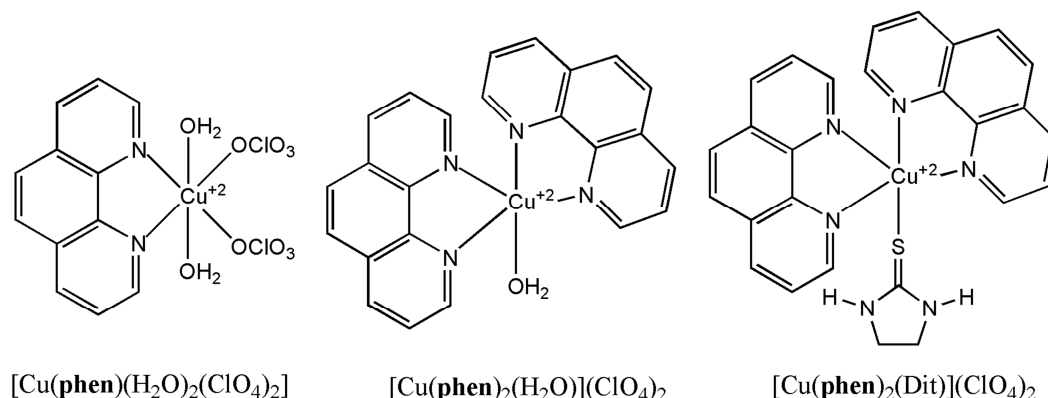


FIGURA 30 COMPLESSI DI RAME STUDIATI IN COMBINAZIONE CON IL CISPLATINO.

Per effettuare questo studio è stato necessario sviluppare un nuovo metodo per lo studio della sinergia in miscele di due o più farmaci. Il metodo da noi proposto si basa sull'utilizzo del Disegno Sperimentale (DS) per la costruzione dell'esperimento e sulle Reti Neurali Artificiali (RNA) per l'interpretazione dei risultati. Il metodo sviluppato è spiegato nei paragrafi 6.1, 6.2 e 6.3 mentre i risultati relativi ai tre sistemi studiati sono riportati nei paragrafi successivi.

6.1. Definizione di effetto additivo e di sinergia

Prima di poter discutere di sinergia o di antagonismo tra farmaci è essenziale definire cosa si intende per effetto additivo. Quest'ultimo è stato definito in diversi modi da diversi autori in letteratura. Generalmente, l'attività citotossica del farmaco è misurata come percentuale del numero di cellule morte rispetto al numero di cellule totali. Supponendo che due o più farmaci siano somministrati in maniera sequenziale, il primo farmaco agisce sulla totalità delle cellule mentre il secondo esplica la sua attività citotossica solo sulle cellule sopravvissute all'azione del primo farmaco e così via. L'effetto additivo non è la somma algebrica delle citotossicità dei farmaci.

In accordo con questa considerazione, è stata introdotta in letteratura da Webb e Bliss una formula per calcolare l'effetto additivo, in cui alla somma algebrica delle attività è stato aggiunto un terzo termine che tiene conto della sequenzialità dell'azione dei farmaci (Bliss 1939, Webb 1961). La formula, originariamente proposta per lo studio delle combinazioni di veleni, è riportata in **Equazione 1**, dove E.A. è l'effetto additivo, a_1 è la citotossicità del farmaco 1 e a_2 è la citotossicità del farmaco 2.

$$E.A. = a_1 + a_2 - \frac{a_1 a_2}{100}$$

EQUAZIONE 1 EFFETTO ADDITIVO IN COMBINAZIONI DI DUE FARMACI SECONDO BLISS E WEBB.

Questa formula permette di calcolare l'effetto additivo solo in combinazioni con due farmaci ed è stata determinata in modo empirico.

Per combinazioni con più di due farmaci, abbiamo introdotto l'**Equazione 2**, dove a_i sono le mortalità dei farmaci alla concentrazione i e $C_{n,k}$ sono le combinazioni semplici senza ripetizione delle mortalità degli n farmaci presi in combinazioni di k farmaci.

$$E.A. = \sum_{i=1}^n a_i + \sum_{k=2}^n \left[(-1)^{k-1} \frac{C_{n,k}\{a_1, a_2, \dots, a_n\}}{100^{k-1}} \right]$$

EQUAZIONE 2 EFFETTO ADDITIVO IN COMBINAZIONI DI n FARMACI.

L'**EQUAZIONE 2** è una definizione operativa dell'effetto additivo, valida per qualsiasi farmaco ed indipendente dai meccanismi d'azione coinvolti. I valori di effetto additivo calcolati con questa equazione sono espressi in percentuali comprese tra 0 e 100 %. Per combinazioni di due farmaci, l'**EQUAZIONE 2** si riduce all'**Equazione 1** proposta da Webb e Bliss. Per combinazioni di tre farmaci invece assume la forma riportata nell'**EQUAZIONE 3**.

$$E.A. = a_1 + a_2 + a_3 - \frac{a_1 a_2 + a_2 a_3 + a_1 a_3}{100} + \frac{a_1 a_2 a_3}{100^2}$$

EQUAZIONE 3 EFFETTO ADDITIVO IN COMBINAZIONI DI 3 FARMACI.

Sinergia e antagonismo possono essere definiti come discostamento positivo o negativo della mortalità sperimentale della combinazione di farmaci dalla mortalità additiva calcolata secondo l'**Equazione 2**. Abbiamo quindi calcolato l'effetto netto della combinazione (net multi-drug effect index o NMDEI) secondo l'**Equazione 4**, dove a_{exp} è la mortalità misurata sperimentalmente per la combinazione in esame.

$$NMDEI = a_{exp} - E.A.$$

EQUAZIONE 4 EFFETTO NETTO DELLA COMBINAZIONE DI PIÙ FARMACI.

Se il valore di NMDEI è positivo, la combinazione di farmaci presenterà effetto sinergico mentre se è negativo si avrà effetto antagonista. Il valore di NMDEI può essere anche uguale a zero, nel caso in cui i due farmaci presentino effetto puramente additivo.

6.2. Scelta delle combinazioni da studiare

La scelta di quante e quali combinazioni di farmaci di cui determinare sperimentalmente la citotossicità è di fondamentale importanza per la costruzione di un modello affidabile per il sistema studiato. Maggiore è il numero degli esperimenti effettuati, migliore è l'accuratezza del modello ottenuto. Il numero totale degli esperimenti è comunque limitato dal tempo impiegato e dal costo. L'utilizzo del disegno sperimentale assicura un buon compromesso tra l'uso del minor numero possibile di esperimenti e l'ottenimento di un modello accettabile. Infatti, il DS permette di distribuire gli esperimenti nell'intervallo di studio in modo da massimizzare la quantità di informazioni estrapolata dal sistema.

Per ogni composto sono state studiate le concentrazioni comprese tra 0 e due volte la CC_{50} . Quest'ultima è stata quindi stimata in precedenza per ogni composto. Nell'elaborazione dei dati è stato riscontrato che la bontà del fitting è influenzata dalla qualità con cui si determinano i punti della curva dose-risposta.

Al fine di costruire un buon modello con le reti neurali artificiali sono stati scelti i punti sperimentali da testare in modo da soddisfare due requisiti:

- studiare le combinazioni di farmaci in modo ragionato nello spazio;
- determinare accuratamente le curve dose-risposta dei singoli farmaci.

6.3. Costruzione della rete neurale artificiale

Lo schema della rete neurale artificiale utilizzata è riportato in **Figura 31**.

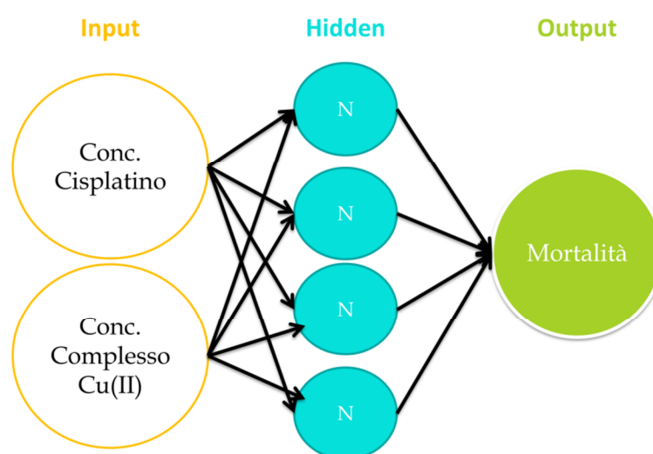


FIGURA 31 SCHEMA DELLA RETE NEURALE ARTIFICIALE.

Le concentrazioni di cisplatino e del complesso di rame in esame sono state utilizzate come dati di input. Dal grafico della variazione dello scarto quadratico medio rispetto al numero di neuroni, è stato determinato il numero ottimale di neuroni nello strato hidden, che è

risultato pari a 4 per i sistemi con $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$ e $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$ mentre per il sistema con $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ sono stati usati 5 neuroni. Le mortalità delle combinazioni e dei composti singoli sono state utilizzate come dati di output.

Per ogni sistema la rete è stata sottoposta ad una fase di training e ad una fase di validazione, utilizzando i dati sperimentali dei set di training e validazione, rispettivamente. I punti corrispondenti alle curve dose-risposta sono stati inclusi nel training set mentre i punti di validazione sono stati scelti in modo casuale utilizzando il metodo di cross-validation.

La costruzione della rete è considerata completa quando nella validazione si raggiunge un minimo dello scarto quadratico medio. Nella fase di predizione, alla rete è stato sottoposto un set di valori di input costituito da una griglia equispaziata di 40×40 valori di concentrazione, in grado di coprire l'intero range di concentrazioni studiato. Per la griglia di combinazioni sottoposta alla rete è stato calcolato punto per punto l'effetto additivo secondo l'Equazione 1. E' stato quindi calcolato l'effetto netto di tutte le combinazioni secondo l'Equazione 4, sostituendo ad a_{exp} il valore calcolato dalla rete neurale.

6.4. Sistema cisplatino- $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$

Sono state studiate le combinazioni con cisplatino in una concentrazione compresa tra 0 e 2 μM e $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$ nel range 0-5 μM . E' stata misurata la citotossicità di 42 combinazioni, 9 soluzioni di cisplatino e 9 di complesso di rame. Di questi 60 punti, 25 sono stati usati come training set, 24 come validation set e 11 come test set, come riportato in Figura 32.

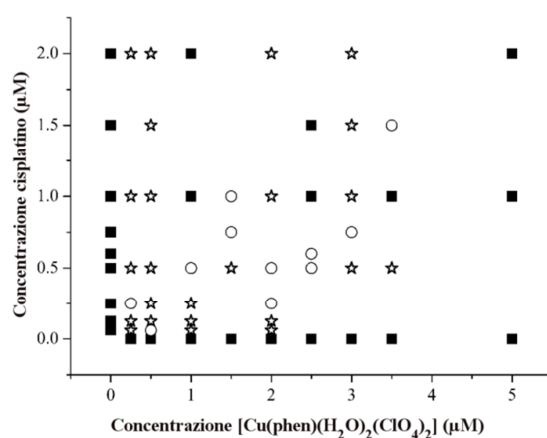


FIGURA 32 DISEGNO SPERIMENTALE UTILIZZATO PER IL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$; ■ TRAINING SET, ☆ VALIDATION SET, ○ TEST SET.

La rete è stata costruita attraverso le fasi di training e validazione. E' possibile valutare la bontà del fitting confrontando la mortalità calcolata con quella sperimentale. Come si vede dal grafico riportato in **Figura 33**, i valori calcolati dalla rete sono in ottimo accordo con quelli determinati sperimentalmente.

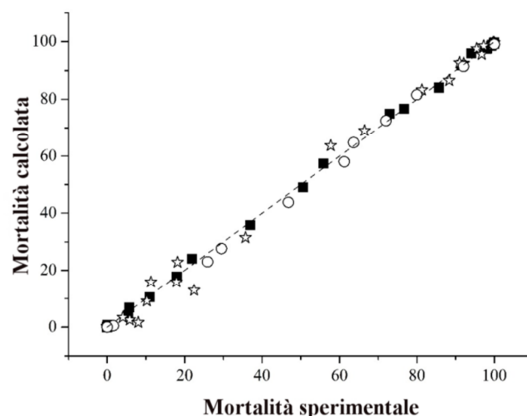


FIGURA 33 MORTALITÀ SPERIMENTALE IN FUNZIONE DELLA MORTALITÀ CALCOLATA PER IL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$; ■ TRAINING SET, ☆ VALIDATION SET, ○ TEST SET.

Un ottimo accordo con i dati sperimentali si ha anche nelle curve dose-risposta del cisplatino e del $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$, riportate in **Figura 34** e **Figura 35**.

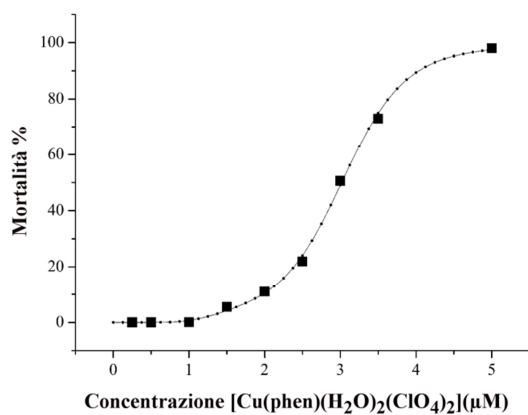


FIGURA 34 CURVA DOSE-RISPOSTA PER $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$; ■ punti sperimentali, ● punti calcolati.

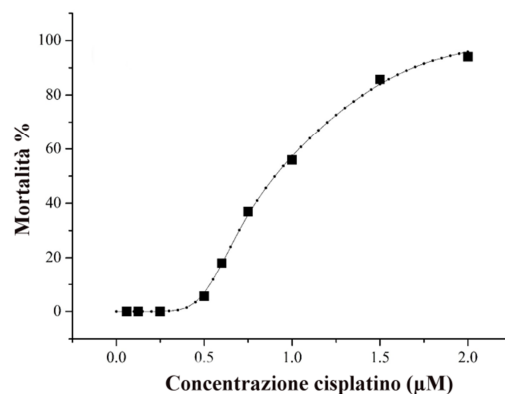


FIGURA 35 CURVA DOSE-RISPOSTA PER IL CISPLATINO; ■ punti sperimentali, ● punti calcolati.

I valori calcolati del NMDEI per tutto il range studiato sono riportati nel grafico in **Figura 36**.

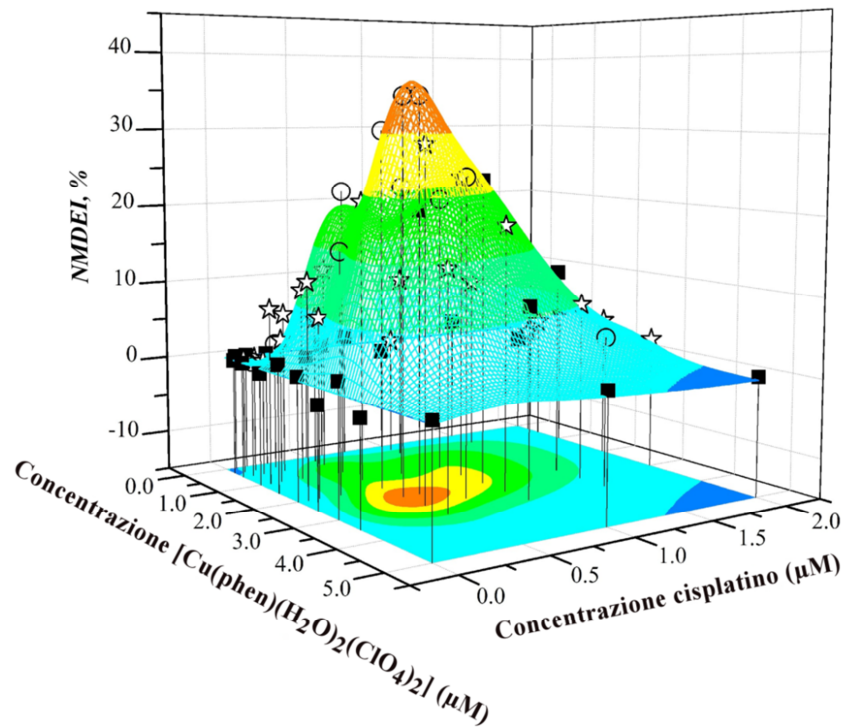


FIGURA 36 EFFETTO NETTO DELLE COMBINAZIONI NEL RANGE STUDIATO PER IL SISTEMA CISPLATINO-
[Cu(phen)(H₂O)₂(ClO₄)₂]; VALORI SPERIMENTALI DEL ■ TRAINING SET, ☆ VALIDATION SET E ○ TEST SET.

Nel range studiato tutte le combinazioni danno effetto sinergico o effetto puramente additivo; non sono infatti presenti valori di NMDEI minori di 0, che indicano combinazioni con effetto antagonista. I punti sperimentali di training, validation e test set giacciono sulla superficie calcolata, confermando l'accuratezza del modello.

Per facilitare la discussione dei risultati, la superficie è stata ridotta ad un grafico bidimensionale, il contour plot riportato in **Figura 37**. In questo grafico la percentuale di NMDEI è espressa tramite una scala cromatica mentre sugli assi x e y sono riportate le concentrazioni dei due composti. Il massimo di sinergia si ha per la combinazione cisplatino-[Cu(phen)(H₂O)₂(ClO₄)₂] 0.55-2.63 μM, che corrisponde ad un rapporto di circa 1:5. Per questa combinazione la percentuale di sinergia è pari al 38 % mentre la mortalità è del 73.6 %. Considerando che presi singolarmente alle stesse concentrazioni del massimo di sinergia, il cisplatino ha una mortalità del 11.8 % mentre il complesso di rame del 29.3 %, si può comprendere l'importanza nella somministrazione medica di trovare le combinazioni corrispondenti ai massimi di sinergia.

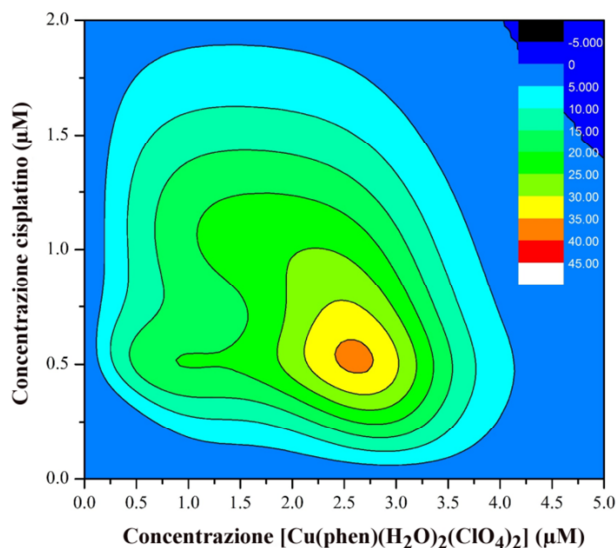


FIGURA 37 CONTOUR PLOT PER IL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{ClO}_4)_2]$.

6.5. Sistema cisplatino- $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$

Sono state studiate le combinazioni tra i due composti nello stesso range di concentrazione, compreso tra 0 e 2 μM . E' stata determinata la citotossicità di 34 miscele, sei soluzioni di cisplatino e quattro soluzioni di complesso di rame. Dei 44 punti misurati sperimentalmente, 18 sono stati usati come training set, 16 come validation set e 10 come test set, come riportato in **Figura 38**.

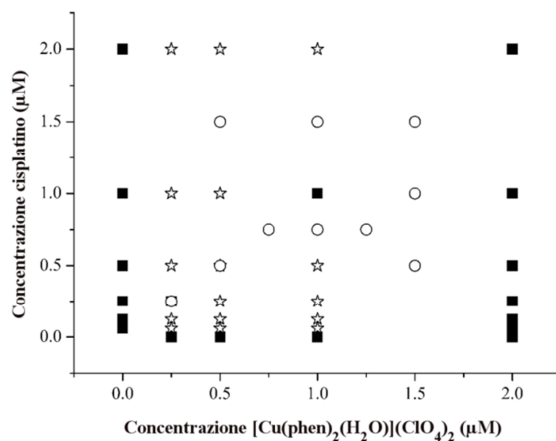


FIGURA 38 DISEGNO SPERIMENTALE UTILIZZATO PER IL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$; ■ TRAINING SET, ☆ VALIDATION SET, ○ TEST SET.

Dopo la validazione della rete, è stata valutata la bontà del fitting confrontando le mortalità sperimentali con quelle calcolate (il cui grafico è riportato in **Figura 39**) e costruendo le curve dose-risposta per il cisplatino (vedi **Figura 35**) e il complesso di rame (riportata in **Figura 40**). Malgrado alcuni punti sperimentali si discostino dalla curva dose-risposta

calcolata per $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$, il valore di CC_{50} calcolato è in accordo con quello determinato sperimentalmente e complessivamente il modello è in buon accordo con i dati sperimentali.

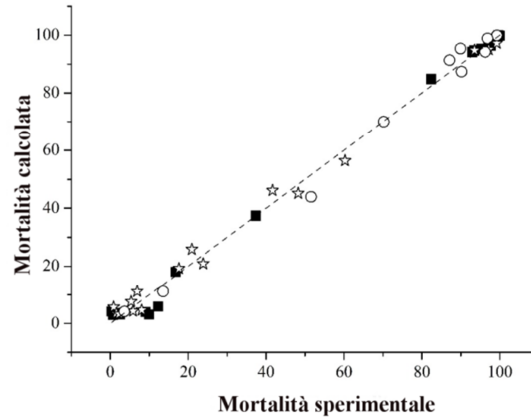


FIGURA 39 MORTALITÀ SPERIMENTALE IN FUNZIONE DELLA MORTALITÀ CALCOLATA PER IL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$; ■ TRAINING SET, ☆ VALIDATION SET, ○ TEST SET.

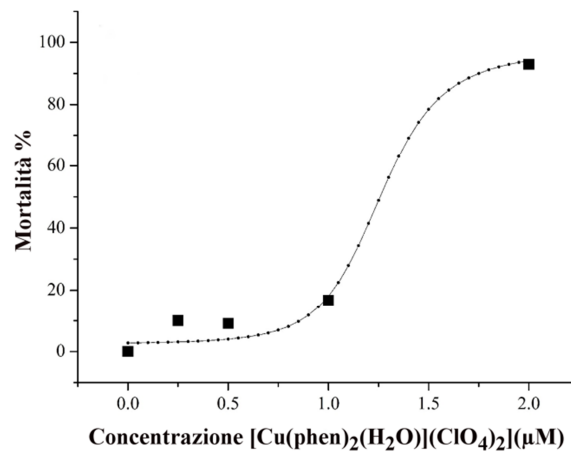


FIGURA 40 CURVA DOSE-RISPOSTA PER $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$; ■ punti sperimentali, ● punti calcolati.

Il grafico del valore del NMDEI in funzione delle concentrazioni dei due composti è riportato in **Figura 41**.

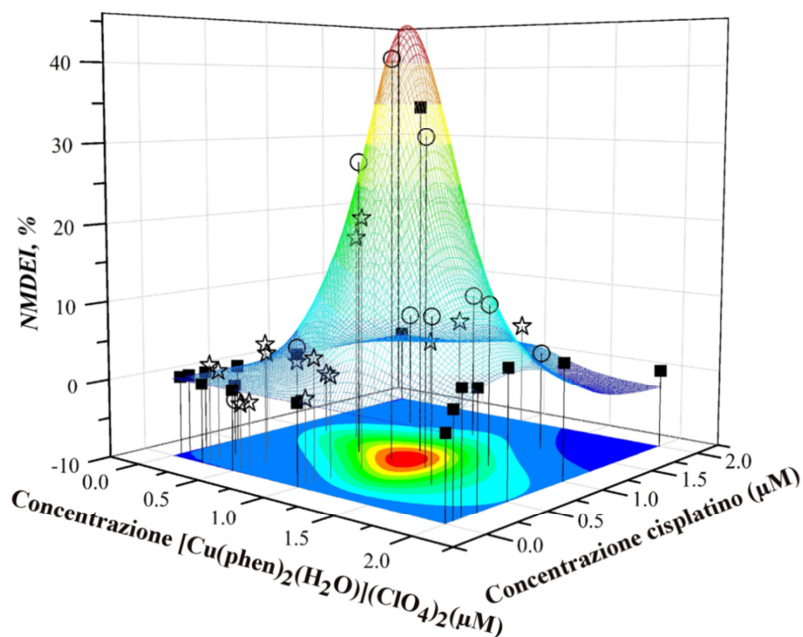


FIGURA 41 EFFETTO NETTO DELLE COMBINAZIONI NEL RANGE STUDIATO PER IL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$; VALORI SPERIMENTALI DEL ■ TRAINING SET, ☆ VALIDATION SET E ○ TEST SET.

Dal grafico è possibile vedere che le combinazioni dei due composti danno effetto sinergico in tutto il range studiato. I punti sperimentali cadono nella superficie calcolata, indicando un buon accordo del modello con il sistema studiato. In particolare, i punti contrassegnati con il simbolo ○, che costituiscono il test set, sono stati scelti e misurati dopo la costruzione della superficie riportata in **Figura 41**. Come si può vedere meglio dal contour plot riportato in **Figura 42**, il massimo di sinergia si ha per la combinazione cisplatino-complesso di rame 0.85-1.05 μM . Dai rapporti delle concentrazioni il massimo di sinergia corrisponde ad una combinazione circa 1:1 tra cisplatino e $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$.

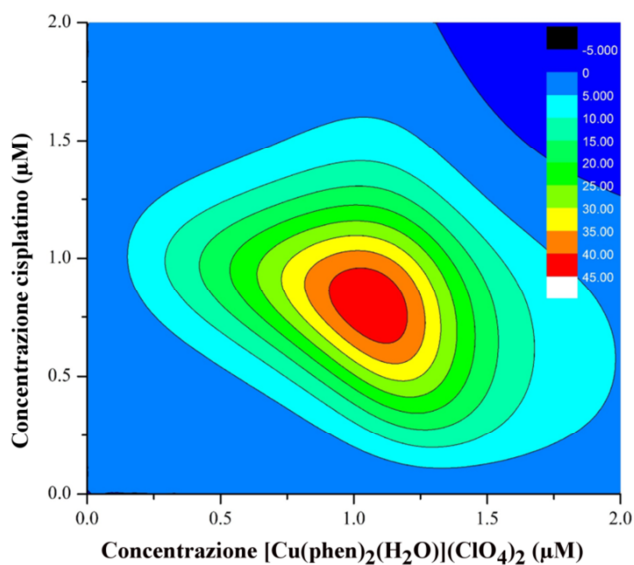


FIGURA 42 CONTOUR PLOT DEL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$.

La combinazione del massimo ha una mortalità del 86 %. Per confronto, il cisplatino in concentrazione 0.85 μM ha una mortalità del 18.5 % mentre quella del $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ è pari al 19.7 % alla concentrazione di 1.05 μM .

6.6. Sistema cisplatino- $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$

Sono state studiate le combinazioni tra i due composti nello stesso range di concentrazione, compreso tra 0 e 2 μM . E' stata determinata la citotossicità di 33 miscele, sette soluzioni di cisplatino e cinque soluzioni di complesso di rame. Dei 46 punti misurati sperimentalmente, 21 sono stati usati come training set, 19 come validation set e 6 come test set, come riportato in **Figura 43**.

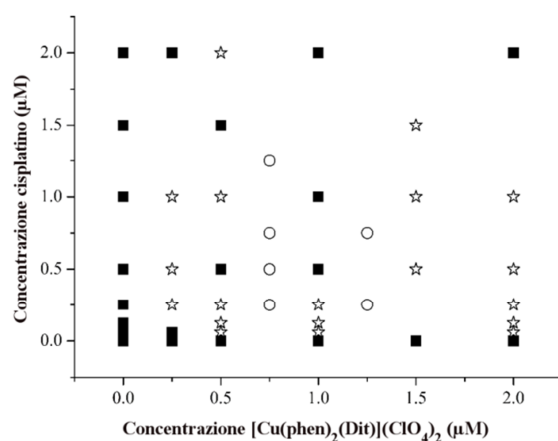


FIGURA 43 DISEGNO SPERIMENTALE UTILIZZATO PER IL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$; ■ TRAINING SET, ☆ VALIDATION SET, ○ TEST SET.

Dopo la costruzione della rete, sono stati realizzati i grafici riportanti la mortalità sperimentale in funzione della mortalità calcolata (riportato in **Figura 44**) e la curva dose-risposta per $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$ (riportata in **Figura 45**). Da questi grafici si trova che il modello proposto è in ottimo accordo con i dati sperimentali.

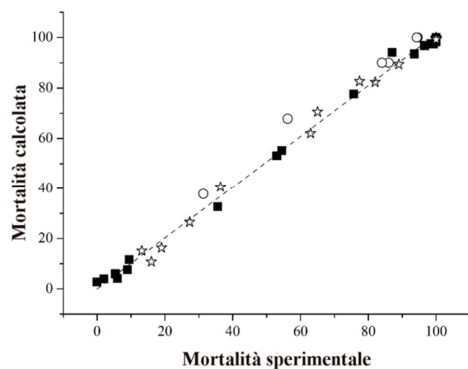


FIGURA 44 MORTALITÀ SPERIMENTALE IN FUNZIONE DELLA MORTALITÀ CALCOLATA PER IL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$; ■ TRAINING SET, ☆ VALIDATION SET, ○ TEST SET.

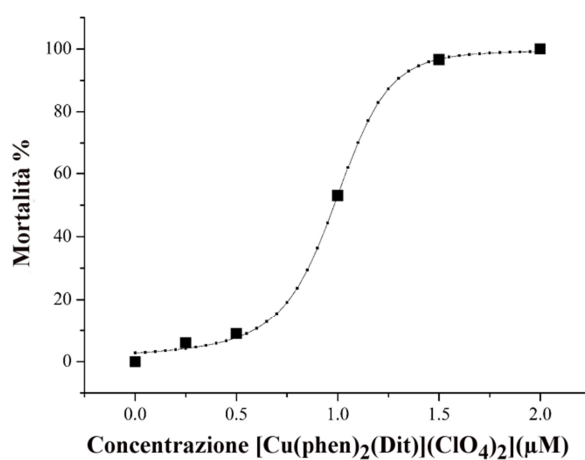


FIGURA 45 CURVA DOSE-RISPOSTA PER $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$; ■ punti sperimentali, ● punti calcolati.

Mettendo in grafico i valori di NMDEI calcolati (**Figura 46**) si può osservare che anche in questo caso non ci sono zone di antagonismo nell'intervallo di combinazioni dei due composti studiate e i punti sperimentali sono in accordo con la superficie calcolata.

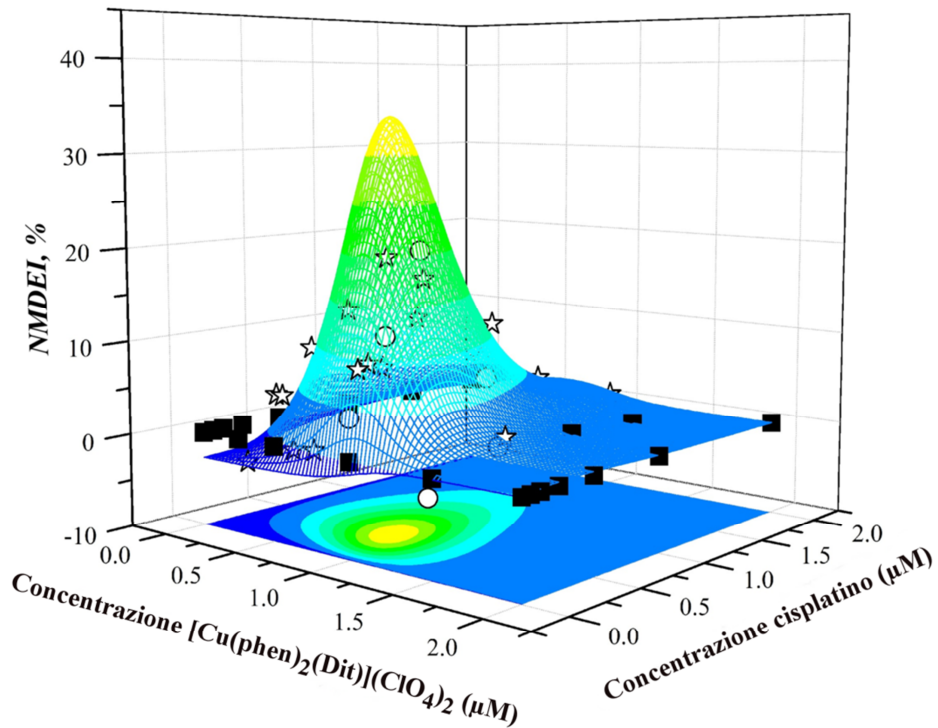


FIGURA 46 EFFETTO NETTO DELLE COMBINAZIONI NEL RANGE STUDIATO PER IL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$; VALORI SPERIMENTALI DEL ■ TRAINING SET, ☆ VALIDATION SET E ○ TEST SET.

Come si può vedere nel contour plot riportato in **Figura 47**, la combinazione con il massimo di sinergia, pari al 35 %, è quella con cisplatino $0.45 \mu\text{M}$ e $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$ $0.87 \mu\text{M}$.

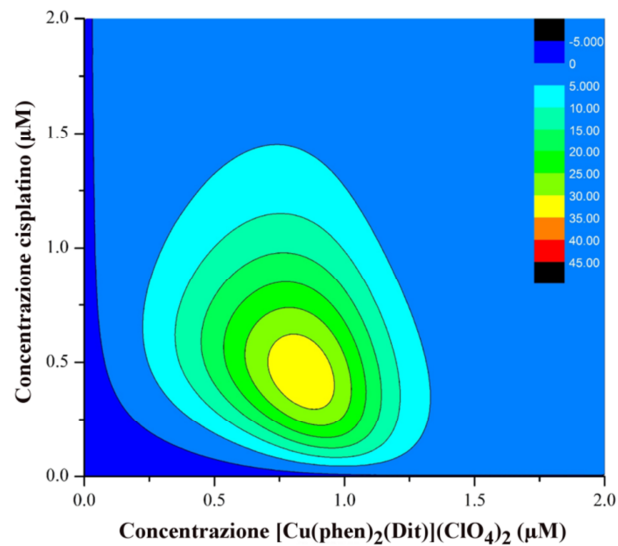


FIGURA 47 CONTOUR PLOT PER IL SISTEMA CISPLATINO- $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$.

Mentre i composti presi singolarmente hanno una mortalità del 32.9 e 27.5 %, rispettivamente per il complesso di rame e il cisplatino, la combinazione ha una mortalità del 82.8 %.

Bibliografia

- Abdel Ghani NT, Mansour AM: Palladium(II) and platinum(II) complexes containing benzimidazole ligands: Molecular structures, vibrational frequencies and cytotoxicity. *J. Mol. Struct.* 991: 108-126, 2011.
- Alias M, Shakir C, Mohammad FI, Yousif E: Synthesis and cytotoxic effect on RD cell line of Pd(II) and Cu(II). *J. Saudi Chem. Soc.* , 2012.
- Bakalova A, Varbanov H, Stanchev S, Ivanov D, Jensen F: DFT study of the structure and spectral behavior of new Pt(II) complexes with 5-Methyl-5(4-pyridyl)hydantoin. *Int. J. Quantum Chem.* 109: 826-836, 2009.
- Bliss CI: The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26: 585-615, 1939.
- Bodige S, MacDonnell FM: Synthesis of free and ruthenium coordinated 5,6-diamino-1,10-phenanthroline. *Tetrahedron Lett.* 38: 8159-8160, 1997.
- Carta F, Maresca A, Scozzafava A, Supuran CT: Novel coumarins and 2-thioxo-coumarins as inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. *Bioorg. Med. Chem.* 20: 2266-73, 2012.
- Chojnacki H: Quantum chemical studies on newly synthesized tin anticancer compounds. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 630: 291-295, 2003.
- Comba P, Krämer R, Mokhir A, Naing K, Schatz E: Synthesis of New Phenanthroline-Based Heteroditopic Ligands - Highly Efficient and Selective Fluorescence Sensors for Copper(II) Ions. *Eur. J. Inorg. Chem.* 4442-4448, 2006.
- Fournier L, Gauron C, Xu L, Aujard I, Saux T Le, Gagey-eilstein N, Maurin S, Dubruille S, Baudin J, Bensimon D, Volovitch M, Vrizz S, Jullien L: A Blue-Absorbing Photolabile Protecting Group for in Vivo Chromatically Orthogonal Photoactivation, 2013.
- Fuks L, Sadlej-Sosnowska N, Samochocka K, Starosta W: Experimental and quantum chemical studies of structure and vibrational spectra of platinum(II) and palladium(II) thiourea chlorides. *J. Mol. Struct.* 740: 229-235, 2005.
- Gans P, Sabatini A, Vacca A: Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the hyperquad suite of programs. *Talanta* 1739-1753, 1996.
- Grzesiak AL, Matzger AJ: Selection and discovery of polymorphs of platinum complexes facilitated by polymer-induced heteronucleation. *Inorg. Chem.* 46: 453-457, 2007.
- Hao C, March RE: Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of salt cluster ions: Part 2 - Salts of polyatomic acid groups and of multivalent metals. *J. Mass Spectrom.* 36: 509-521, 2001.
- Inglett GE, Smith FG: The formation of a new nitrogen heterocyclic ring system by the loss of carbon monoxide from 1,10-phenanthroline-5,6-quinone. *J. Am. Chem. Soc.* 72: 842-844, 1950.
- Keniley LK, Ray L, Kovnir K, Dellinger L a, Hoyt JM, Shatruk M: TTF-Annulated phenanthroline and unexpected oxidative cleavage of the C=C bond in its ruthenium(II) complex. *Inorg. Chem.* 49: 1307-9, 2010.

- Kleineweischede A, Mattay J: Synthesis of Amino- and Bis(bromomethyl)-Substituted Bi- and Tetradentate N-Heteroaromatic Ligands: Building Blocks for Pyrazino-Functionalized Fullerene Dyads. *European J. Org. Chem.* 2006: 947–957, 2006.
- Kozelka J, Bergès J: Ab initio calculations on cis-[PtCl₂(PMe₃)₂]: Search for a model chemistry for platinum(II) complexes. *J. Chim. Phys.* 95: 2226–2240, 1998.
- Kulandasamy R, Adhikari AV, Stables JP: A new class of anticonvulsants possessing 6 Hz activity: 3,4-dialkyloxy thiophene bishydrazones. *Eur. J. Med. Chem.* 44: 4376–84, 2009.
- Lambeck R, Kropf VH: Aldoximanhydrid-N-oxide aus aromatischen Aldoximen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 700: 18–28, 1966.
- Lin X-Y, Tang S-J, Wu W-S: 5,6-Dihydroxy-1,10-phenanthroline-1-ium chloride dihydrate. *Acta Crystallogr. Sect. E* 65: o2367, 2009.
- Minagawa Y, Kigawa J, Itamochi H, Kanamori Y: Cisplatin-resistant HeLa Cells Are Resistant to Apoptosis via p53-dependent and -independent Pathways. *Japanese J. Cancer Res.* 90: 1373–1379, 1999.
- Murphy G, Murphy C, Murphy B, Hathaway B: Crystal structures, electronic properties and structural pathways of two [Cu(phen)₂(OH₂)]²⁺[Y]²⁻ complexes (phen = 1,10-phenanthroline, Y = CF₃SO₃⁻ or ClO₄⁻). *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2653–2660, 1997.
- Ostrovskiy DP, Garazd YL, Garazd MM, Khilya VP: Synthesis of derivatives of the hydrazones of 5-phenylfuro[3,2-g]chromen-7-ones. *Chem. Heterocycl. Compd.* 46: 1318–1324, 2011.
- Ozturk T, Ertas E, Mert O: A Berzelius reagent, phosphorus decasulfide (P₄S₁₀), in organic syntheses. *Chem. Rev.* 110: 3419–78, 2010.
- Paw W, Eisenberg R: Synthesis, Characterization, and Spectroscopy of Dipyridocatecholate Complexes of Platinum. *Inorg. Chem.* 36: 2287–2293, 1997.
- Pivetta T, Isaia F, Verani G, Cannas C, Serra L, Castellano C, Demartin F, Pilla F, Manca M, Pani A: Mixed-1,10-phenanthroline-Cu(II) complexes: synthesis, cytotoxic activity versus hematological and solid tumor cells and complex formation equilibria with glutathione. *J. Inorg. Biochem.* 114: 28–37, 2012.
- Polshettiwar V, Kaushik MP: A new, efficient and simple method for the thionation of ketones to thioketones using P₄S₁₀/Al₂O₃. *Tetrahedron Lett.* 45: 6255–6257, 2004.
- Ravera M, Gabano E, Sardi M, Ermondi G, Caron G, McGlinchey MJ, Müller-Bunz H, Monti E, Gariboldi MB, Osella D: Synthesis, characterization, structure, molecular modeling studies and biological activity of sterically crowded Pt(II) complexes containing bis(imidazole) ligands. *J. Inorg. Biochem.* 105: 400–409, 2011.
- Roy S, Hagen KD, Maheswari PU, Lutz M, Spek AL, Reedijk J, van Wezel GP: Phenanthroline derivatives with improved selectivity as DNA-targeting anticancer or antimicrobial drugs. *ChemMedChem* 3: 1427–34, 2008.
- Senerovic L, Zivkovic MD, Veselinovic A, Pavic A, Djuran MI, Rajkovic S, Nikodinovic-runic J: Synthesis and Evaluation of Series of Diazine-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes through in Vitro Toxicity and Molecular Modeling: Correlation between Structure and Activity of Pt(II) Complexes², 2014.

Webb JL: Effect of more than one inhibitor. In *Enzymes and Metabolic Inhibitors* Academic Press: 66, 488.: 1961.

Xie Y, Fujimoto T, Dagleish S, Shuku Y, Matsushita MM, Awaga K: Synthesis, optical properties and charge transport characteristics of a series of novel thiophene-fused phenazine derivatives. *J. Mater. Chem. C* 1: 3467, 2013.

Zheng RH, Guo HC, Jiang HJ, Xu KH, Liu BB, Sun WL, Shen ZQ: A new and convenient synthesis of phendiones oxidated by $\text{KBrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ at room temperature. *Chinese Chem. Lett.* 21: 1270–1272, 2010.

Conclusioni

1 - *Conclusioni*

2 - *Prospettive*

Ringraziamenti

Appendice I. Taratura del pHmetro con il metodo di Gran

*Appendice II. Determinazione delle costanti di
formazione di un complesso metallico per via
potenziometrica*

Appendice III. Disegno Sperimentale

Appendice IV. Reti neurali artificiali

Bibliografia

1 - Conclusioni

Questo lavoro di tesi è stato focalizzato sulla preparazione di complessi metallici a base di Cu(II) e Pt(II), sullo studio delle loro proprietà antitumorali e sulla correlazione tra la struttura e le proprietà osservate.

Come leganti per la preparazione dei complessi metallici sono stati selezionati i derivati della 1,10-fenantrolina quali **phendione**, **phendiolo** e **phendiossima**, che sono stati opportunamente sintetizzati. Tra questi leganti, il phendiolo presenta la maggiore attività citotossica su tutte le linee cellulari testate, ad eccezione del carcinoma epatocellulare.

Sono stati preparati i complessi di Cu(II) con **phendione** e **phendiolo** ed è stata testata la loro attività citotossica nei confronti di linee tumorali umane. E' emerso che il complesso contenente due leganti **phendiolo** è il più attivo sulle linee cellulari di leucemia linfoblastica acuta (sia di tipo B che T), carcinoma prostatico e polmonare a cellule squamose. Sulla linea cellulare di carcinoma epatocellulare risulta più attivo invece il complesso $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$.

Dalla correlazione tra struttura e proprietà citotossiche emerge quindi che i complessi più attivi sono quelli contenenti due leganti fenantrolinici. Inoltre, sulla stessa linea cellulare l'attività dei complessi rispecchia quella del relativo legante. Infatti, sulla linea cellulare di carcinoma epatocellulare il **phendiolo** risulta poco attivo così come i suoi complessi.

La sostituzione di un legante di tipo imidazolidintionico nel complesso $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Dit})](\text{ClO}_4)_2$ con un legante di tipo tiofenico è responsabile, nelle linee tumorali studiate, di una leggera variazione (all'interno dello stesso ordine di grandezza) della CC_{50} rispetto al complesso precursore.

Per quanto riguarda lo studio dei composti in soluzione, sono state determinate le costanti di idrolisi del Cu(II) e costanti di protonazione dei leganti **phen** e **phendione** a 25 e 37 °C, in NaCl 0.1 M. Nelle stesse condizioni sperimentali sono state determinate le costanti di formazione dei complessi di Cu(II) con **phen** e **phendione**.

Sono stati quindi preparati dei complessi di Pt(II) con i leganti fenantrolinici **phen**, **phendione** e **phendiolo** e complessi misti contenenti anche leganti imidazolidintionici. Dall'analisi dei dati di citotossicità emerge che i complessi di Pt(II) sono meno citotossici

dei corrispondenti complessi di Cu(II), il che potrebbe essere imputabile alla presenza di un solo legante fenantrolinico. Inoltre, i complessi contenenti **phendiolo** si confermano come i più attivi in tutte le linee tumorali studiate ad eccezione di quella di carcinoma epatocellulare. Questo conferma una selettività simile del legante e dei suoi complessi nei confronti delle diverse linee cellulari, come osservato anche nei composti di rame. Nei complessi di Pt(II), l'introduzione di un legante ausiliare imidazolidintionico ne aumenta la citotossicità. Inoltre, variando i sostituenti presenti sul legante ausiliare, la variazione di attività citotossica è più marcata che nei complessi di Cu(II). Il complesso più attivo risulta essere quello con il legante **Dit** e non si osserva una variazione di selettività nei confronti delle linee tumorali al variare del legante imidazolidintionico, come invece osservato per i complessi di Cu(II).

Infine, è stato sviluppato un metodo generale per lo studio delle combinazioni di farmaci e per l'individuazione delle combinazioni a maggiore effetto sinergico. È stata elaborata una nuova definizione di effetto additivo, valida anche per combinazioni di tre o più farmaci. La serie di esperimenti è stata progettata con l'ausilio di un disegno sperimentale mentre l'analisi dei dati è stata effettuata sfruttando una rete neurale artificiale. Sono state quindi studiate combinazioni di cisplatino con tre complessi di rame aventi attività citotossica. Dall'analisi dei dati è emerso che tutti i sistemi presentano effetto sinergico in tutto l'intervallo di combinazioni studiato. Per ogni sistema sono state determinate le concentrazioni dei due componenti che presentano il massimo effetto sinergico e la citotossicità di queste combinazioni è stata confermata da misure sperimentali.

2 - Prospettive

Alla luce dei risultati raccolti nel presente lavoro di tesi risulta interessante proseguire lo studio di complessi di rame con leganti derivati dalla 1,10-fenantrolina. In particolare, i complessi con i leganti **phendiammina** e **phenditione**, la cui sintesi è stata iniziata in questo lavoro, possono presentare dei vantaggi rispetto ai complessi testati finora in termini di maggiore solubilità e/o possibilità di formare complessi a ponte.

Inoltre, la solubilità della **phendiammina** in acqua potrebbe rendere possibile lo studio in soluzione della formazione dei suoi complessi con il Cu(II).

Pur avendo fornito utili indizi nella correlazione struttura-proprietà, i complessi di Pt(II) con derivati della 1,10-fenantrolina non si sono rivelati molto promettenti in quanto non presentano attività citotossica particolarmente rilevante e sono scarsamente solubili. Lo sviluppo di complessi simili dovrebbe essere votato a superare queste due problematiche.

Sulla base dei risultati ottenuti in questo lavoro, è di rilevante interesse studiare le combinazioni di complessi di Cu(II) con altri farmaci antitumorali. Da una parte è interessante verificare se l'effetto sinergico sia presente nella stessa misura anche in combinazione con altri chemioterapici a base di platino come il carboplatino o l'oxaliplatino. D'altra parte, sarebbe utile studiare le combinazioni con chemioterapici con altri meccanismi d'azione, per verificare se la sinergia con i complessi di platino deriva dall'azione su uno stesso meccanismo.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare innanzitutto il mio supervisore, la dott.ssa Tiziana Pivetta, per avermi seguito durante il periodo di dottorato e per avermi dato l'opportunità di lavorare su questo interessante argomento.

Vorrei ringraziare la dott.ssa Maria Grazia Cabiddu per la sintesi dei leganti tiofenici e per il sostegno e la guida nella sintesi di alcuni leganti fenantrolinici. Ringrazio il prof. Francesco Isaia per la sintesi dei leganti imidazolidintionici e per le discussioni costruttive in questi anni.

Ringrazio la prof.ssa Alessandra Pani e tutto il suo gruppo di ricerca per le misure di citotossicità e il prof. Francesco Demartin e i suoi collaboratori per la risoluzione strutturale del complesso $[\text{Cu}(\text{phendione})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$.

Un ringraziamento particolare va a Marianna e Elisa, che mi sono state sempre vicine in questi tre anni. Ragazze, siete davvero fantastiche e avete reso piacevole il tempo passato insieme tra dolci, thè e chiacchiere.

Grazie anche ai miei colleghi Matteo, Mauro e Erika per il sostegno reciproco in questo periodo e a Roberto per le lunghe chiacchierate.

Vorrei ringraziare le mie amiche Silvia, Irene e Graziella, per tutte le merende il sabato pomeriggio e per tutto l'affetto dimostratomi questi anni. Un grazie va anche a Daniela per aver rivisto parte dell'introduzione e anche a Carla; non c'è bisogno di un motivo perché siete entrambe sempre nei miei pensieri.

Infine, ringrazio i miei genitori per il continuo incoraggiamento e per lo stimolo a credere in un mondo migliore e mia sorella, perché i discorsi su gatti e cibo sono terapeutici.

E infine vorrei ringraziare Matteo ma non ci sono abbastanza parole.

Appendice I.

Taratura del pHmetro con il metodo di Gran

L'elettrodo viene calibrato giornalmente con una titolazione acido forte-base forte per controllare la risposta dell'elettrodo, determinare l' E^0 e la concentrazione della base.

Nella cella di misura vengono pesati 1 mL di HCl a titolo noto (circa 0.1 M), 2 mL di NaCl 1 M e la soluzione viene portata a 20 mL con H₂O distillata. La soluzione nella cella di misura viene termostata alla temperatura a cui si effettueranno le misure successive e tenuta in blanda agitazione sotto flusso di argon. Nella soluzione vengono immersi l'elettrodo e la sonda termometrica. La soluzione viene quindi titolata con NaOH (circa 0.1 M) facendo almeno 70 aggiunte.

Per l'elaborazione dei dati ed il calcolo del volume equivalente è possibile sfruttare il metodo di Gran (Gran 1952). La concentrazione totale di protone in ogni punto della titolazione è un valore noto, calcolabile tramite l'EQUAZIONE 5:

$$C_{tot} H^+ = \frac{(C_a \cdot V_a) + (C_b \cdot V_b)}{V_{tot} + V_b}$$

EQUAZIONE 5

dove C_a e V_a sono rispettivamente la concentrazione analitica e il volume dell'acido, C_b e V_b sono la concentrazione analitica e il volume della base e V_{tot} è il volume della cella di misura. La concentrazione della base viene espressa per convenzione con un segno negativo.

Dalla concentrazione totale di protone è possibile ricavare la concentrazione di protone libero secondo l'EQUAZIONE 8.

$$K_w = [H^+] [OH^-]$$

EQUAZIONE 6

$$[OH^-] = \frac{K_w}{[H^+]} = K_w [H^+]^{-1}$$

EQUAZIONE 7

$$C_{tot} H^+ = [H^+] - K_w [H^+]^{-1}$$

EQUAZIONE 8

A valori di pH inferiori a 5, nell'EQUAZIONE 8 il secondo termine è trascurabile rispetto al primo e la concentrazione di protone libero è uguale alla concentrazione totale di protone secondo l'EQUAZIONE 9.

$$[H^+] = C_{tot} H^+$$

EQUAZIONE 9

A valori di pH superiori a 9, il primo termine dell'EQUAZIONE 8 è trascurabile e la concentrazione di protone libero è calcolabile tramite l'EQUAZIONE 10.

$$[H^+] = - \frac{K_w}{C_{tot} H^+}$$

EQUAZIONE 10

La quantità di protone libero è calcolabile secondo l'EQUAZIONE 11.

$$[H^+] = 10^{-pH} = 10^{-\frac{E^0-E}{s}}$$

EQUAZIONE 11

A pH minore di 5, l'EQUAZIONE 9 è valida ed eguagliandola all'EQUAZIONE 11 si ottiene l'EQUAZIONE

12.

$$(V_{tot} + V_b) 10^{-\frac{E^0-E}{s}} = C_a \cdot V_a + C_b \cdot V_b$$

EQUAZIONE 12

L'intercetta della retta rappresenta il volume equivalente della titolazione mentre la pendenza corrisponde alla concentrazione della base.

In modo analogo, per valori di pH maggiori di 9, si eguaglia l'EQUAZIONE 10 CON EQUAZIONE 11 e si ottiene l'EQUAZIONE 13.

$$(V_{tot} + V_b) 10^{-\frac{E^0-E}{s} - pK_w} = C_a \cdot V_a + C_b \cdot V_b$$

EQUAZIONE 13

Idealmente l'intercetta delle due rette dovrebbe coincidere. In realtà, la presenza di anidride carbonica disciolta nella soluzione di base forte usata come titolante può portare a una sovrastima del volume equivalente ottenuto nel ramo basico della titolazione.

I risultati delle tarature dell'elettrodo sono stati elaborati con il programma GLEE (Gans and O'Sullivan 2000). Questo programma sfrutta una versione modificata dell'equazione di Nernst (riportata nell'EQUAZIONE 14) calcolando E^0 e il fattore di pendenza f .

$$E = E^0 + f \frac{2.303 RT}{F} \log[H^+]$$

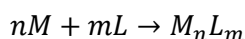
EQUAZIONE 14

Inoltre, esso fornisce una stima del livello di carbonatazione della base forte utilizzata come titolante.

Appendice II.

Determinazione delle costanti di formazione di un complesso metallico per via potenziometrica

La formazione di un complesso metallico può essere descritta dalla reazione generica riportata in EQUAZIONE 15.



EQUAZIONE 15

dove M è il metallo, L è il legante (le cariche sono state omesse per semplicità). La costante di equilibrio della reazione di formazione K_f del complesso sarà è dall'EQUAZIONE 16.

$$K_f = \frac{[M_nL_m]}{[M]^n[L]^m}$$

EQUAZIONE 16

Per determinare la costante è quindi necessario conoscere la concentrazione all'equilibrio del legante, del metallo e del complesso.

Se il legante è un acido o una base debole, è possibile studiare la formazione del complesso misurando la variazione del pH della soluzione in funzione delle aggiunte di una base o di un acido forte, tramite un elettrodo a vetro. Il potenziale dell'elettrodo a vetro dipende linearmente dall'attività dello ione H^+ attraverso la legge di Nernst (EQUAZIONE 17).

$$E = E^0 - \frac{RT}{F} \ln \frac{1}{a_{H^+}}$$

EQUAZIONE 17

In condizioni di forza ionica costante, ossia in concentrazione almeno 10 volte superiore a quella delle specie presenti in soluzione, i coefficienti di attività restano costanti e l'attività è approssimativamente uguale alla concentrazione (Biedermann and Sillén 1953). In questo caso l'equazione di Nernst assume la forma empirica riportata in EQUAZIONE 18.

$$E = E^0 + s \log[H^+]$$

EQUAZIONE 18

dove s è la pendenza della retta che idealmente dovrebbe avere il valore di 59.1 mV a temperatura ambiente. Da questa equazione è quindi possibile calcolare la concentrazione del protone dal potenziale registrato all'elettrodo.

Inoltre, conoscendo le costanti di protonazione del legante e la sua concentrazione analitica, è possibile calcolare la concentrazione all'equilibrio del legante libero. Le costanti di protonazione del legante possono essere determinate attraverso titolazioni potenziometriche di soluzioni a concentrazione nota di legante a cui viene aggiunta una quantità nota di acido o di base per averlo in forma completamente protonata o deprotonata. E' utile effettuare titolazioni a concentrazione diversa di legante in modo da verificare la formazione di specie polimeriche.

Per determinare le costanti di formazione dei complessi è necessario effettuare delle titolazioni a diversi rapporti metallo:legante per studiare la formazione dei complessi in tutte le stechiometrie possibili, come ad esempio i complessi binucleari. Conoscendo la concentrazione di legante libero $[L]$ per ogni valore di potenziale misurato, è possibile calcolare la costante di formazione del complesso sfruttando la legge del bilancio di massa.

Le costanti di formazione del complesso sono state determinate con l'ausilio del programma Hyperquad (Gans et al. 1996).

Appendice III.

Disegno Sperimentale

Un esperimento consiste nel modificare una variabile allo scopo di osservare i cambiamenti che questo produce nel sistema in una o più variabili di risposta. Poiché la validità di un esperimento è direttamente dipendente dalla sua costruzione ed esecuzione, la progettazione dell'esperimento stesso è di fondamentale importanza. Infatti, solo un'organizzazione accurata può assicurare che il tipo e il numero giusto di dati sia disponibile per rispondere alla domanda iniziale nel modo più chiaro ed efficiente possibile.

Il Disegno Sperimentale (DS), in inglese Design Of Experiments (DOE), è un metodo di pianificazione degli esperimenti che permette di ottenere il massimo delle informazioni per un dato numero di esperimenti.

L'approccio del DS si oppone a quello tradizionale che consiste nell'intervenire su una singola variabile alla volta. Questo processo, definito in inglese One Variable At Time (OVAT), è limitato in quanto non considera che le variabili in gioco possono essere correlate tra loro. Infatti, tutti i processi si possono considerare multivariati se non è stato dimostrato il contrario. Nel DS invece vengono variate tutte le variabili dell'esperimento insieme, ottenendo informazioni complete sul comportamento del sistema in tutto l'intervallo studiato. Inoltre, nel DS si possono ottenere informazioni anche da grosse moli di dati anche grazie al fatto che l'elaborazione dei risultati viene solitamente presentata in forma grafica.

Per sviluppare un DS sono necessari diversi passaggi:

- **Definire lo scopo degli esperimenti**

Il primo passo fondamentale è definire a quale domanda si deve rispondere con gli esperimenti.

- **Definire tutti i fattori che possono influenzare il sistema**

E' necessario definire quali sono le variabili che influenzano il sistema. In secondo luogo bisogna decidere quali valori di queste variabili è di interesse studiare e quindi qual è l'intervallo di studio. Inoltre, bisogna ipotizzare la presenza di eventuali variabili nascoste.

- **Pianificare l'esperimento**

Gli esperimenti devono essere distribuiti in tutto l'intervallo di studio. Esistono diversi tipi di DS che si possono usare come il full factorial design, il fractional factorial design, il central composite design, ecc.

- **Eeguire l'esperimento**

- **Analizzare le informazioni ottenute**

I risultati vengono solitamente analizzati con metodi statistici e multivariati come ad esempio l'analisi delle componenti principali (PCA).

I principali vantaggi dell'DS sono la sua applicabilità nei più disparati campi di studio e l'ottenimento di un buon livello di comprensione del sistema.

Appendice IV.

Reti neurali artificiali

Negli esseri umani, la risoluzione dei problemi è affidata al cervello. Esso è formato da una rete di neuroni, connessi l'un l'altro tramite filamenti chiamati dendriti e assoni. Lo studio del funzionamento del cervello umano ha portato alla creazione di reti neurali artificiali (RNA). Le RNA sono dei modelli matematici che cercano di imitare il comportamento delle reti neurali viventi.

In una RNA sono presenti dei nodi o neuroni interconnessi tra loro. I nodi possono essere di Input (ingresso), Output (uscita) o Hidden (nascosti) in base alla loro funzione nella rete. In una rete di tipo stratificato c'è un numero di neuroni di Input pari alle variabili in ingresso, un numero di nodi di output pari alle variabili in uscita e uno o più strati di neuroni hidden, presenti in numero variabile a seconda dell'architettura della rete.

Nella costruzione della rete neurale bisogna innanzitutto individuare il tipo di rete più utile per analizzare il sistema in esame e quindi deciderne l'architettura. Nelle reti stratificate come quelle usate in questo lavoro di tesi, tutti i neuroni di ogni strato sono connessi con quelli dello strato successivo, come mostrato in FIGURA 48.

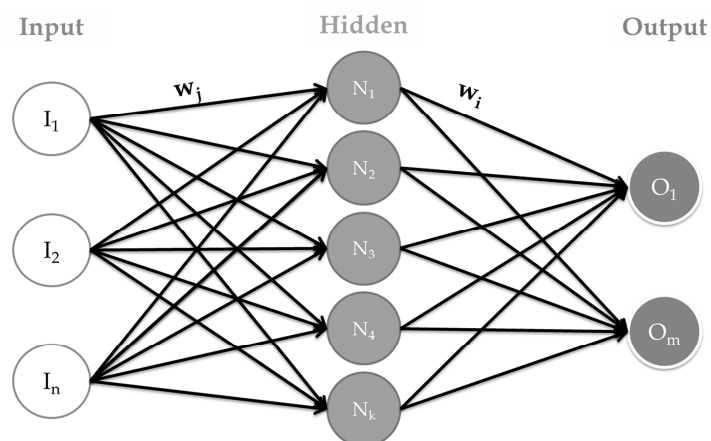


FIGURA 48 STRUTTURA DI UNA GENERICA RETE NEURALE ARTIFICIALE STRATIFICATA.

In questo tipo di reti neurali è necessario decidere quanti strati hidden sono necessari e quanti neuroni vanno inseriti in ciascuno strato. Non è possibile stabilire a priori l'architettura ideale della rete ma è necessario costruire reti diverse e individuare il numero di neuroni oltre il quale la diminuzione dello scarto quadratico medio è

trascurabile. Lo scarto quadratico medio (root mean square o RMS) è la radice quadrata della differenza tra i valori calcolati e quelli sperimentali fratto il numero di valori (EQUAZIONE 19).

$$RMS = \sqrt{\sum_i^N \frac{(x_{calc} - x_i)^2}{N}}$$

EQUAZIONE 19

In generale, il numero di neuroni necessario aumenta all'aumentare della complessità del sistema in esame.

Ad ogni connessione tra due neuroni è associato un peso che viene utilizzato per calcolare il dato in ingresso al neurone. I dati in ingresso al neurone vengono trasformati secondo una funzione di attivazione, che può essere di segno, a gradino o sigmoideale.

Nel caso di una funzione di attivazione sigmoideale in una rete neurale stratificata il dato in ingresso ai neuroni hidden S_j viene calcolato secondo l'EQUAZIONE 20, in cui x_k è il dato del neurone di input k e w_{kj} è il peso associato alla connessione tra il neurone di input k e il neurone hidden j .

$$S_j = \sum_{k=1}^{K+1} w_{jk} x_k$$

EQUAZIONE 20

Il valore di output in uscita dallo strato hidden V_j viene quindi calcolato secondo l'EQUAZIONE 21.

$$V_j = \frac{1}{1 + e^{(-S_j)}}$$

EQUAZIONE 21

L'input allo strato output è calcolato secondo l'EQUAZIONE 22, in cui w_{ij} è il peso associato alla connessione tra il neurone hidden j e il neurone di output i .

$$S_i = \sum_{j=1}^{J+1} w_{ij} V_j$$

EQUAZIONE 22

Il valore di output in uscita dallo strato output O_i viene quindi calcolato secondo l'EQUAZIONE 23.

$$O_i = \frac{1}{1 + e^{(-s_i)}}$$

EQUAZIONE 23

In base al flusso dei segnali le reti possono essere divise in feedforward, se il segnale viene portato solo in avanti, e feedback, se il segnale può essere trasportato anche indietro.

L'apprendimento della rete può essere con o senza supervisione. Nel primo caso la rete ha a disposizione dei valori di input e di output e impara correlandoli mentre nel secondo caso vengono forniti solo valori di input. L'apprendimento con supervisione è il più diffuso ed è un processo iterativo di ottimizzazione che consiste nel determinare i valori dei pesi relativi a tutte le connessioni. La rete ha quindi a disposizione un set di dati con input e output noti detto training set. I pesi vengono modificati in modo da minimizzare l'errore fra il valore di output calcolato dalla rete neurale e il valore reale. Facendo questo, la rete impara ad inferire il legame fra input e output.

Per il processo di apprendimento ad ogni iterazione si calcola il valore di output prodotto dalla rete e il suo discostamento dal valore reale e si modificano i valori dei pesi calcolando la pendenza della superficie di errore e spostandosi nella direzione in cui la diminuzione dell'errore è maggiore. Il processo continua fino al raggiungimento di una soglia di errore prestabilita o dopo un certo numero di iterazioni. Se si usa un algoritmo di backpropagation, il processo di apprendimento avviene in entrambe le direzioni della rete. In una fase definita di forward (avanti) i pesi ottenuti dalla precedente iterazione vengono usati per calcolare gli output dei neuroni per lo strato k che saranno usati come valori di ingresso per lo strato $k+1$. Nella fase successiva di backward (indietro), si calcolano prima i pesi nello strato $k+1$ e gli errori relativi vengono usati per stimare gli errori dei neuroni dello strato k .

L'errore diminuisce durante la fase di training della rete all'aumentare del numero di iterazioni. Il training della rete non può superare un certo numero di iterazioni per evitare di incorrere in overfitting. In questo caso infatti, pur essendo l'errore molto basso, la rete perde la capacità di generalizzare e quindi di predire output per campioni diversi da quelli forniti con il training set.

Una volta terminato il processo di training della rete, bisogna effettuare la validazione sottoponendo un secondo set di dati, detto set di validazione (validation set), per verificare la capacità della rete di rispondere a nuovi input. Infine, un terzo set di dati,

detto test set viene scelto tra i valori predetti dalla rete e, se possibile, misurato sperimentalmente per verificare l'affidabilità delle predizioni della rete.

Le RNA rientrano nella categoria del soft modelling e vengono spesso chiamate black box (scatola nere) perché sono in grado di predire le risposte del sistema senza ipotizzare una legge per il suo funzionamento.

Le reti neurali sono in grado di:

- **apprendere da esempi**
- **generalizzare**
- **astrarre**
- **riprodurre o modellare sistemi non lineari**
- **non risentire del rumore dei dati**

Le RNA vengono utilizzate per la classificazione dei dati, per riconoscere schemi (pattern recognition) su grandi moli di dati, per fare predizioni.

Bibliografia

Biedermann G, Sillén LG: No Title. Ark. Kemi 5: 425, 1953.

Gans P, O'Sullivan B: GLEE, a new computer program for glass electrode calibration. Talanta 51: 33-7, 2000.

Gans P, Sabatini A, Vacca A: Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the hyperquad suite of programs. Talanta 17: 1739-1753, 1996.

Gran G: Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. Analyst 77: 661, 1952.

