

Capítol 1.

Introducció i objectius

1.1. Introducció

1.1.1. El càncer

El càncer s'ha definit com un conjunt de malalties que es caracteritzen per un creixement excessiu i descontrolat de cèl·lules que envaeixen i danyen els teixits i òrgans, provocant finalment la mort de l'individu.¹ Aquestes cèl·lules formen agrupacions o tumors que poden mantenir-se localitzats (tumors benignes) o provocar una invasió a d'altres teixits (tumors malignes) en el fenomen conegut com a metàstasi. Quan les cèl·lules canceroses comencen a reproduir-se de manera descontrolada, perden completament la capacitat d'autocontrol que tenen les cèl·lules normals i les propietats típiques del tipus de cèl·lula al qual pertanyen. Així, per exemple, no poden interaccionar amb les cèl·lules veïnes per disposar-se ordenadament, perden la forma en la majoria dels casos, maten les cèl·lules veïnes i finalment s'obren camí per venes i artèries envaint altres espais del cos. En les cèl·lules cancerígenes el balanç de creixement, determinat per la relació entre la proliferació cel·lular i la incidència de l'apoptosi (mort cel·lular programada), està incontrolat. La proliferació cel·lular i l'apoptosi en el creixement dels tumors està regulada per diferents oncogens i gens supressors de tumor associats amb el cicle cel·lular; així doncs, es podria dir que en alguns casos el càncer és una malaltia genètica.²

Actualment el càncer és una de les malalties amb major incidència en la població occidental, constituint la segona causa de mort en els països desenvolupats, després de les malalties cardiovasculars. La recerca, des de diferents àrees de la ciència, per trobar

¹ Muñoz, A. *Cáncer y Nuevas Terapias*, Ed. Hélice, Madrid, 1997.

² Kim, R.; Tanabe, K.; Uchida, Y.; Emi, M.; Inoue, H.; Toge, T. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002, 50, 343-352.

noves teràpies contra malalties degeneratives com el càncer, centra grans esforços. Actualment existeixen diferents tipus de tractament:

- *Extirpació quirúrgica*. Consisteix en l'eliminació física del tumor. La cirurgia és el mètode més antic emprat en el tractament del càncer, i continua essent adequat per a la majoria dels casos si es diagnostica a temps.
- *Radioteràpia*. Es basa en la utilització de radiacions d'alta energia, amb raigs X o raigs γ , per interrompre la divisió del DNA en les cèl·lules canceroses. El principal efecte secundari és que les cèl·lules sanes també reben la radiació, encara que les cèl·lules cancerígenes són més sensibles per la seva major rapidesa en la reproducció.
- *Quimioteràpia*. Consisteix en l'administració de fàrmacs o hormones i se'n parlarà més extensament en el següent apartat.

1.1.2. Quimioteràpia

L'era de la quimioteràpia comença a finals dels anys 40 i inici dels 50, amb la introducció en clínica dels agents alquilants clàssics i antimetabolits que van millorar sobretot el tractament de limfoma i leucèmia. El descobriment de nous fàrmacs s'ha produït per una gran varietat d'aproximacions, des de l'empírica fins al disseny racional, amb una gran contribució de *serendipity*. Actualment existeix una gran quantitat de fàrmacs amb característiques estructurals molt diverses que s'empren per combatre el càncer, alguns exemples són els que es descriuen a continuació, els quals també es mostren en la Figura 1. 1.³

- *Agents alquilants*. Actuen formant enllaços covalents amb el DNA i impeding la seva replicació. Un exemple d'aquest tipus de fàrmacs és el cisplatí.
- *Antimetabolits*. Bloquegen la síntesi del DNA. Alguns exemples són el metotrexat i el 5-fluorouracil.
- *Antibiòtics antitumorals*. Produeixen diferents efectes citotòxics, com són la inhibició de la síntesi del DNA i RNA o la fragmentació de la cadena del DNA. Interaccionen per intercalació amb el DNA de manera que també inhibeixen la transcripció i actuen com agents alquilants. Aquests fàrmacs són per exemple la bleomicina i la doxorubicina.
- *Antimitòtics*. Inhibeixen la mitosi en la metafase interaccionant amb la tubulina, de manera que bloquegen la formació de microtúbuls, necessaris en la reproducció cel·lular. Formen part d'aquest tipus de fàrmacs els taxoids, dins dels quals el taxol és el més conegut.

³ Ho, Y-P.; Au-Yeung, S. C. F.; To, K.K.W. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23 (5), 633-655.

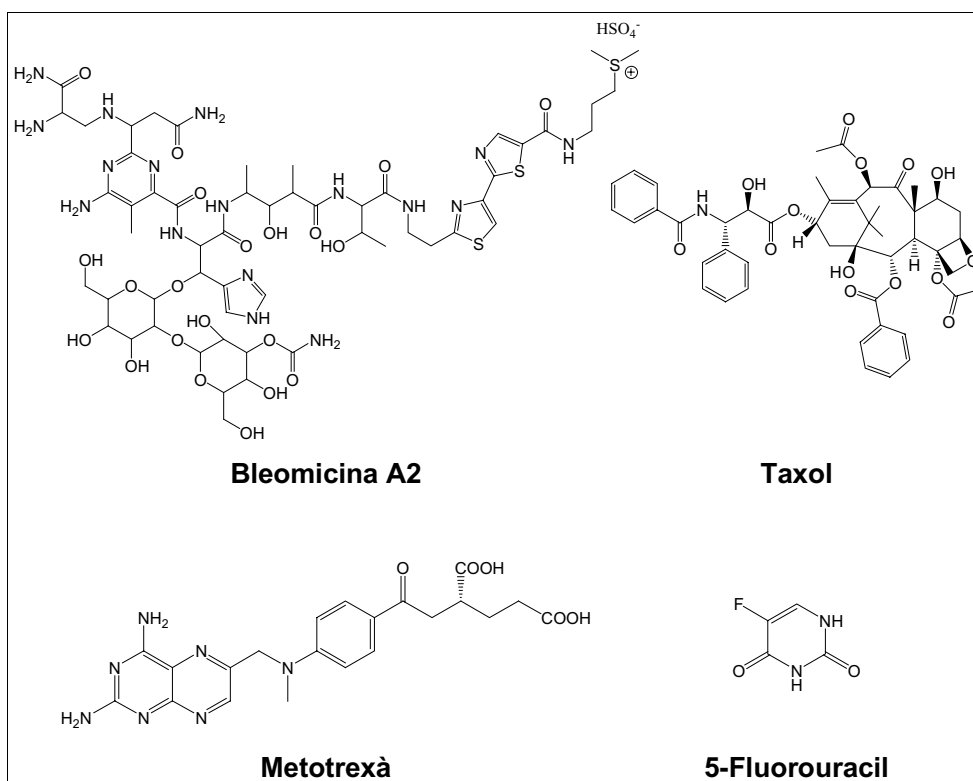


Figura 1. 1. Alguns exemples d'agents quimioterapèutics.

Molts dels fàrmacs quimioterapèutics actuen induint, en última instància, la mort cel·lular per apoptosi. L'apoptosi és morfològicament diferent a la necrosi; la provoquen una sèrie d'estímuls externs que donen lloc a la condensació del nucli i contracció cel·lular, mantenint-se la membrana cel·lular. Després el cos apoptòtic és fagocitat per macròfags associats al tumor. Un cop iniciada l'apoptosi es tracta ja d'un procés irreversible, l'inici o no d'aquest procés està determinat per la relació entre les proteïnes proapoptòtiques i les proteïnes antiapoptòtiques. En la necrosi, per contra, la mort cel·lular es produeix per la destrucció de la membrana de les cèl·lules a causa d'un increment de la pressió osmòtica en l'exterior.

La inducció de l'apoptosi per agents quimioterapèutics està relacionada amb la resposta del tumor i en la millora clínica dels pacients. Ara bé, de vegades es produeix resistència a l'apoptosi i, com a conseqüència, es produeix una disminució de la sensibilitat de les cèl·lules cancerígenes als fàrmacs.²

1.2. El cisplatí

El *cis*-diaminodicloroplatí (II), conegut com a cisplatí, va ser descobert per casualitat per Rosenberg i col.⁴ en els anys seixanta. El seu ús clínic es va aprovar el 1971 i actualment encara és un dels fàrmacs antitumorals més emprats en el tractament d'un gran nombre de càncers. La seva aplicació com a únic agent o amb combinació és molt efectiva en el tractament de càncer de testicles, així com en el tractament de carcinomes cervicals, broncogènics i orofaríngics, limfoma, osteoblastoma i neuroblastoma, entre d'altres.

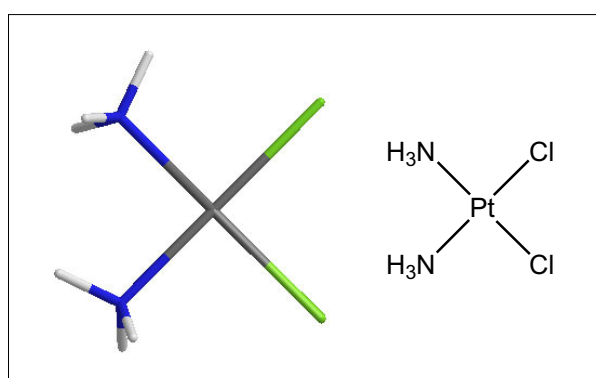


Figura 1. 2. Representació del cisplatí.

De totes maneres, la utilització del cisplatí presenta algunes limitacions, com són:

- Espectre relativament estret de tumors contra els quals presenta activitat.
- Solubilitat limitada en medi aquós, que implica la seva administració per via intravenosa.
- Efectes secundaris que en limiten la dosi. Principalment nefrotoxicitat, neurotoxicitat i disminució de l'hematogènesi.⁵
- Desenvolupament de mecanismes de resistència que presenten alguns tumors després d'un tractament inicial.⁶ Dels mecanismes de resistència se'n parlarà més detalladament en els següents apartats.

El coneixement dels mecanismes d'actuació del cisplatí pot contribuir en la millora de les seves limitacions i en el disseny de nous fàrmacs que les superin.

⁴ a) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature* **1965**, 205, 698-699.

b) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. *Nature* **1969**, 222, 385-386.

⁵ Reedijk, J. *JCS Chem. Commun.* **1996**, 801-806.

⁶ Wong, E.; Giandomenico; C. M. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2451-2466.

1.2.1. Mecanisme d'actuació

Està acceptat que la diana biològica del cisplatí, així com de nombrosos compostos de platí, és el DNA. La seva eficàcia depèn, en gran mesura, de la capacitat d'aquests per unir-s'hi covalentment, modificant-ne l'estructura i els processos de replicació i transcripció, provocant, en última instància, la mort cel·lular per apoptosi.⁷

El cisplatí interacciona amb el DNA del nucli, per tant, ha de ser transportat fins a l'interior de la cèl·lula. La concentració de clorurs en el plasma és molt elevada (aproximadament de 100 mM), de manera que el compost pot mantenir-se neutre i el cisplatí pot travessar la membrana cel·lular per difusió passiva, ja que la concentració de clorurs dins la cèl·lula és molt inferior (aproximadament 20 mM). Un cop dins, pateix el procés d'hidròlisi que es mostra en la Figura 1. 3.⁷ S'ha descrit també que el cisplatí pot ser transportat a l'interior de la cèl·lula mitjançant transport actiu, es tracta d'un transportador anomenat MRP2. Existeix una hipòtesi per la qual el transportador MRP2 seria capaç de transportar també les espècies de platí conjugades amb glutatió cap a l'exterior de la cèl·lula, i per tant podria estar relacionat amb la resistència al fàrmac.⁸

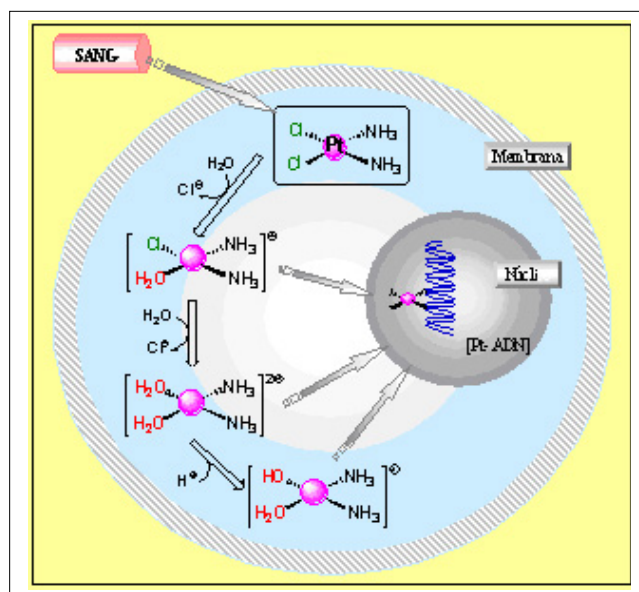


Figura 1. 3. Representació esquemàtica del transport del cisplatí a través de la membrana cel·lular, procés d'hidròlisi que pateix dins la cèl·lula i finalment interacció amb el DNA dins el nucli cel·lular.

⁷ Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2467-2498.

⁸ Guminnski, A.; Harnett, P. R.; deFazio, A. *Lancet Oncology* **2002**, 3, 312-318.

Són les espècies amb aigua com a lligands làbils les que interaccionen finalment amb el DNA, a causa de la seva abundància relativa en el medi (citoplasma i nucli cel·lular) i a la naturalesa del grup sortint (H_2O).⁹

La molècula de cisplatí, i en general els compostos de platí que presenten activitat antitumoral, són capaços d'unir-se al DNA mitjançant un enllaç covalent. La unió es produeix a través dels nitrògens de les bases púriques i pirimidíniques. Es poden formar diferents tipus d'adductes, tots ells representats en la Figura 1. 4.

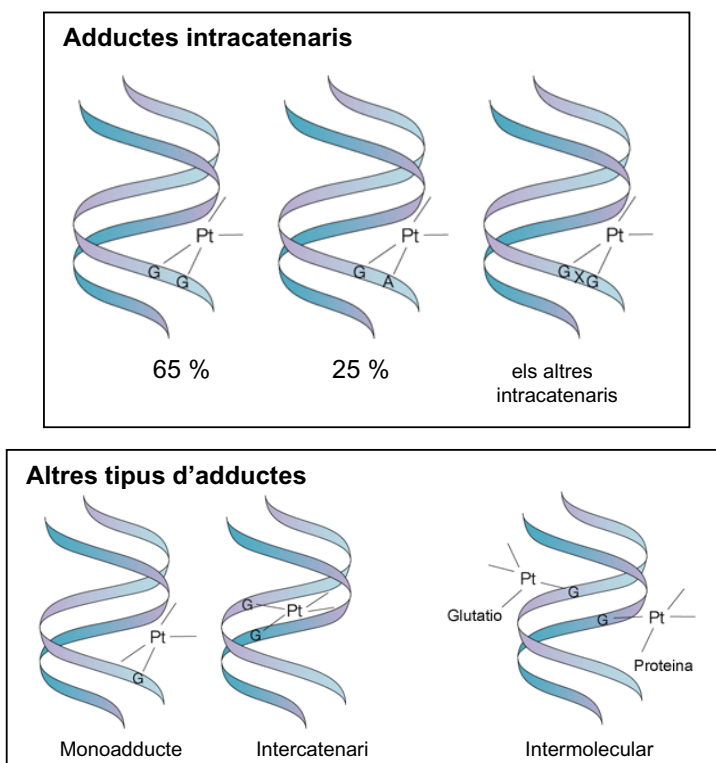


Figura 1. 4. Principals tipus d'adductes que pot formar el cisplatí amb el DNA.

Els adductes majoritaris entre el DNA i el cisplatí són del tipus bifuncional intracatenari. Dins d'aquests, la interacció més abundant és la que es produeix entre dues bases de guanina contínues d(GpG), la unió es dona en l'N7 de la guanina. Estudis recents demostren que la platinació a través de l'N7 de la guanina és més favorable cinèticament i termodinàmicament respecte de la platinació de l'adenina. Juga un paper molt important l'estat de transició, en què el platí adopta una geometria de bipiràmide trigonal estabilitzada per un pont d'hidrogen entre un dels lligands ammino i el grup oxo en C6 de la guanina. Una altra raó per les quals el cisplatí es coordina majoritàriament a la

⁹ Reedijk, J.; Fichtinger-Shepman, A.M.J.; van Oosterom, A.T.; van de Putte, P. *Structure and Bonding*, **1987**, 67, 53-89.

guanina és que les interaccions electròniques Pt-N7 són més fortes en el cas de la guanina que no en l'adenina.¹⁰

Aquesta interacció provoca un canvi en l'estructura secundària i terciària del DNA, que consisteix en la torsió d'entre 30 i 35° de la doble hèlix i un desenrotllament d'uns 20°. En la Figura 1. 5, es compara el DNA lliure amb l'estructura cristal·lina d'un adducte *cis*-bifuncional entre el cisplatí i un desoxidecanucleòtid bicatenari. Aquesta estructura fou determinada el 1995 mitjançant difracció de raigs X i estudis de RMN.¹¹

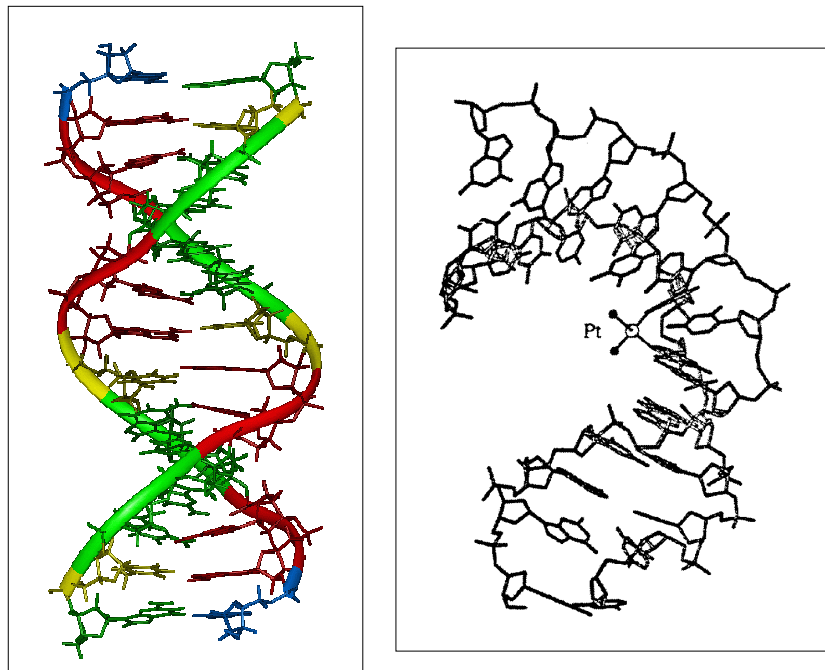


Figura 1. 5. Comparació entre la conformació B-DNA (esquerra) i l'estructura cristal·lina d'un adducte *cis*-bifuncional entre el cisplatí i un desoxidecanucleòtid bicatenari (dreta). S'observa la torsió de la doble hèlix per la unió del complex metàl·lic i el trencament dels enllaços dels parells de Watson-Crick.

Encara no es coneix amb exactitud quin és el factor determinant que provoca la mort per apoptosi en algunes cèl·lules tumorals per uns determinats compostos. El que sí sembla clar és que el canvi conformacional en l'estructura del DNA, el reconeixement molecular d'algunes proteïnes d'aquest canvi i la interacció del fàrmac amb les proteïnes que intervenen en la replicació i transcripció cel·lulars, juguen un paper molt important.

¹⁰ Baik, M-H.; Friesner, R. A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14082-14092.

¹¹ a) Takahara, P. M.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J. *Nature* **1995**, *377*, 649-652.

b) Gelasco, A.; Lippard, J. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 9230-9239.

c) Yang, D.; van Boom, S. S. G. E.; Redjick, J.; van Boom, J. H.; Wang, A. H. J. *Biochemistry* **1995**, *34*, 12912-12920.

Actualment se centra molta atenció en la identificació i caracterització de proteïnes capaces de reconèixer les lesions que el cisplatí provoca en el DNA, ja que es creu que tenen un paper clau en els mecanismes de resistència i en els mecanismes que finalment provoquen la mort cel·lular per apoptosi. Existeixen diferents famílies de proteïnes implicades en aquest reconeixement, les més importants són les proteïnes NER (*Nucleotide Excision Repair*), les proteïnes MMR (*MisMatch Repair*) i les proteïnes de domini HMG (*High-Mobility Group*).

Proteïnes NER. Són proteïnes responsables de la reparació dels adductes cisplatí-DNA i per tant sembla que es tracta d'un dels principals mecanismes de resistència al fàrmac. Actuen mitjançant la hidròlisi de l'enllaç fosfodiester en ambdós costats de la cadena lesionada, on hi ha l'adducte amb el cisplatí, i promovent la síntesi del nou segment del DNA eliminat. Segurament les proteïnes NER actuen independentment del cicle cel·lular.¹²

Proteïnes MMR. La funció d'aquest tipus de proteïnes és rastrejar el DNA acabat de sintetitzar i corregir els errors comesos per la DNA polimerasa, és a dir, les proteïnes MMR són capaces d'identificar i substituir els nucleòtids incorporats de forma errònia. Se sap que aquest tipus de proteïnes actuen principalment en la fase post-replicativa, el que encara es desconeix és la relació exacta que hi ha entre el reconeixement de les lesions provocades pel cisplatí per part de les proteïnes MMR i la citotoxicitat. Sembla que una manca de MMR podria incrementar la tolerància, per part de les cèl·lules, de les lesions provocades pel cisplatí en el DNA.¹³

Proteïnes de domini HMG. Fins ara està acceptat que determinades proteïnes de dominis HMG poden modular la sensibilitat de les cèl·lules en front del cisplatí. Existeixen dues hipòtesis del seu mecanisme d'actuació. La primera, exposa que l'adducte cisplatí-DNA atrapa les proteïnes de dominis HMG, que moltes vegades actuen com a factors de transcripció, de manera que les allunyen de les seves posicions habituals i alteren la seva funció cel·lular. L'altra hipòtesi suggereix que les proteïnes de dominis HMG interaccionen amb els adductes de cisplatí-DNA bloquejant el reconeixement molecular de les proteïnes reparadores del DNA. Cal destacar però, que les dues hipòtesis no són excloents.⁷ L'adducte cisplatí-DNA també és reconegut per altres tipus de proteïnes, que es postula que afecten de la mateixa manera que les proteïnes de domini HMG. És el cas de la TBP (*TATA binding protein*), que forma part del factor de transcripció TFIID, o la histona H1.

¹² Wang, D.; Hara, R.; Singh, G.; Sancar, A.; Lippard, S. J. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6747-6753.

¹³ Bravec, V.; Kasparikova, J. *Drug Resistance Updates* **2002**, *5*, 147-161.

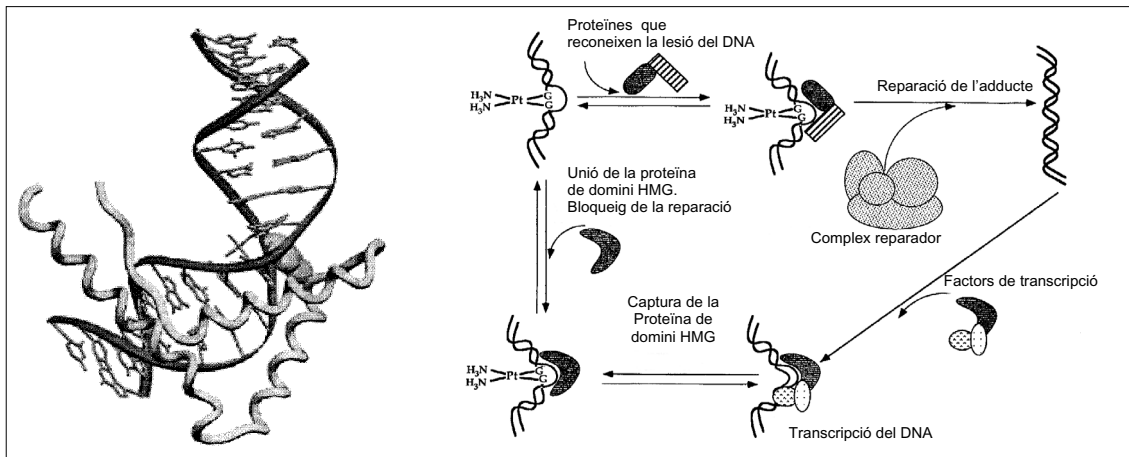


Figura 1. 6. Estructura del domini HMG1 enllaçat al nucleòtid, que conté un adducte cis-GG, $d(CCTCTCTG^GACCTTCC)-d(GGAAGGTCCAGAGAGG)$, on $G^$ indica la localització del cisplatí (esquerra). Diagrama esquemàtic de la hipòtesi segons la qual les proteïnes de domini HMG poden mitjançar la citotoxicitat del cisplatí (dreta).

1.2.2. Mecanismes de resistència

Un dels problemes més importants que presenta el cisplatí és que després d'un cert temps les cèl·lules adquireixen mecanismes de resistència al fàrmac. La resistència es reconeix per una disminució del senyal apoptòtic i, per tant, per la supervivència de les cèl·lules.¹⁴ Essencialment hi ha els següents mecanismes de resistència al fàrmac, que es representen esquemàticament en la Figura 1. 7:¹⁵

- *Capacitat reparadora del DNA* que duen a terme les proteïnes reparadores. Es tracta del mecanisme de resistència més important i ja explicat anteriorment.
- *Disminució de l'acumulació del fàrmac en el medi cel·lular.* En general està acceptat que aquesta disminució és deguda a la menor entrada del fàrmac en la cèl·lula i no pas a la sortida d'aquest. Tanmateix, s'han caracteritzat noves proteïnes de membrana capaces de transportar fora de la cèl·lula el cisplatí conjugat amb sulfat o glutatió.
- *Inactivació per biomolècules amb un grup tiol.* És sabut que existeix un augment significatiu de glutatió (GSH) en les cèl·lules resistents al cisplatí i que aquest forma fàcilment un complex amb el cisplatí impedit que el compost arribi a la seva diana biològica, el DNA. El complex de cisplatí amb el glutatió és eliminat

¹⁴ Siddik, Z. H. *Oncogene* **2003**, 22, 7265-7279.

¹⁵a) Weiss, R. B.; Chistian, M. C. *Drugs* **1993**, 46 (3), 360-377.

b) Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Pérez, J. M. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 645-662.

de la cèl·lula mitjançant una bomba depenent d'adenosina trifosfat (ATP). El cisplatí en l'interior de la cèl·lula també reacciona amb la metal·lotionina, una proteïna involucrada en la detoxificació de metalls pesats. No es coneix una relació directa entre aquesta proteïna i la resistència al cisplatí; el que sí s'ha vist és que determinades cèl·lules que adquireixen resistència mostren un augment de la concentració de metal·lotionina.¹⁶

- *Inactivació de l'apoptosi.* Són molts els gens i les proteïnes involucrades en el procés apoptòtic, en el qual es creu que és necessari que el dany cel·lular superi un cert llindar. Qualsevol alteració provocada en les proteïnes involucrades en l'apoptosi, ja sigui per inducció d'un senyal antiapoptòtic o per l'avortament d'un senyal proapoptòtic, és un possible mecanisme de resistència al fàrmac.¹⁷

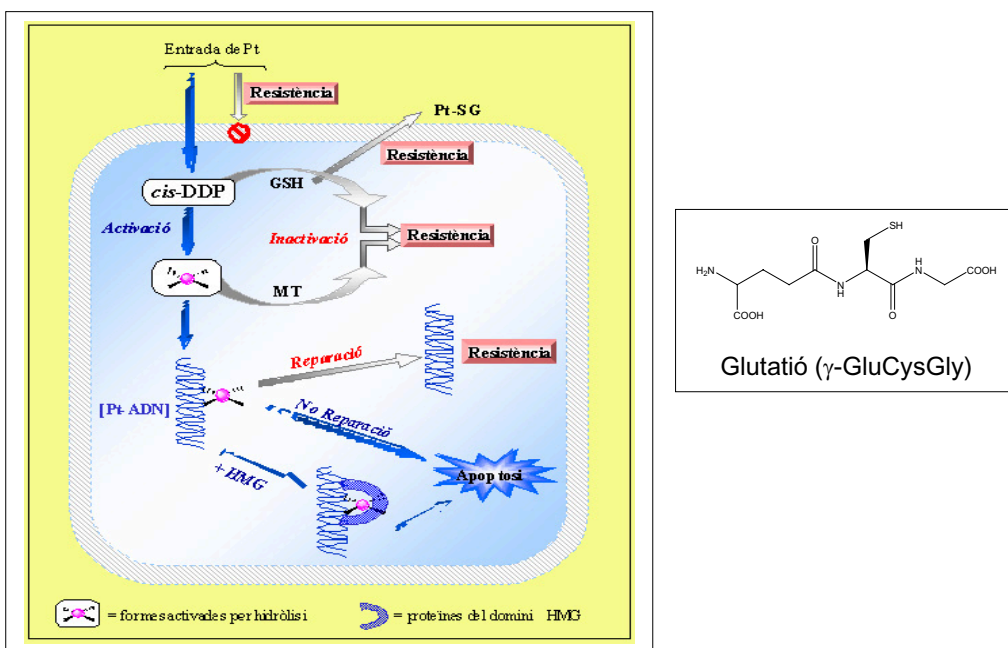


Figura 1. 7. Representació esquemàtica dels principals mecanismes de resistència (esquerra) i representació del glutatió (dreta).

Davant d'aquestes limitacions el repte és l'obtenció de nous fàrmacs amb una activitat antitumoral semblant al cisplatí, que alhora siguin efectius en un espectre més ampli de tumors, siguin menys tòxics i no presentin resistència creuada amb el cisplatí o els seus anàlegs.

¹⁶ Jordan, P.; Carmo-Fonseca, M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1229-1235.

¹⁷ Boulikas, T.; Vougiouka, M. *Oncology Reports* **2003**, *10*, 1663-1682.

1.3. Desenvolupament de nous fàrmacs

Des del descobriment de l'activitat antitumoral del cisplatí per Rosenberg i col·laboradors, s'han sintetitzat i estudiat nombrosos compostos de platí, amb la intenció de millorar el seu espectre d'acció i aconseguir la màxima activitat i selectivitat amb la mínima toxicitat. De seguida es va provar d'establir una correlació estructura-activitat amb l'objectiu de poder modular estructuralment els fàrmacs i comprendre millor els seus mecanismes d'actuació. Tot i que són molts els compostos de platí provats com a possibles fàrmacs, només el cisplatí i el carboplatí s'empren en el tractament d'algun tipus de càncer a escala mundial; el nedaplatí està aprovat en el Japó i l'oxaliplatí a Europa, Amèrica llatina i Àsia.¹⁸ Aquests es mostren en la Figura 1. 8.

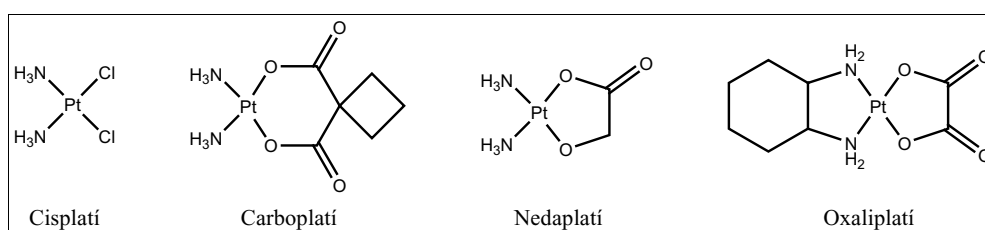


Figura 1. 8. Compostos de platí aprovats com a fàrmacs.

A continuació es descriuen breument les característiques i mecanismes de l'oxaliplatí, i es comparen amb el cisplatí, ja que l'oxaliplatí és el primer compost de platí que demostra tenir activitat en front del càncer de còlon i d'ovari, i no mostra resistència creuada amb el cisplatí o el carboplatí.

1.3.1. L'oxaliplatí

L'oxaliplatí [(1*R*, 2*R*)-*trans*-ciclohexà-1,2-diaminaoxalat]platí(II)] és un fàrmac de tercera generació. Actualment s'usa principalment en el tractament del càncer colorectal en combinació amb 5-fluorouracil i leucovorin. Aquests resultats donen suport a la hipòtesi que les modificacions estructurals en els lligands no làbils dels compostos de platí poden alterar l'espectre d'activitat antitumoral i superar la resistència.¹⁹

¹⁸ Guo, Z.; Sadler, P. J. *Angw. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1512-1531.

¹⁹ Galanski, M.; Yasemi, A.; Slaby, S.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Raush, M.; Nazarov, A. A.; Keppler, B. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 707-714.

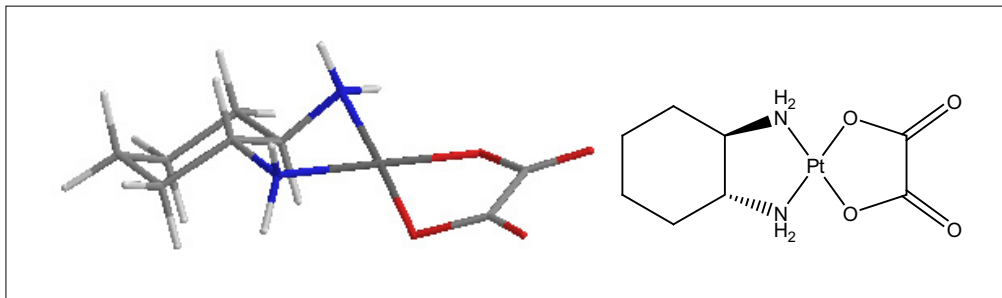


Figura 1. 9. Representació de l'oxaliplatí.

Els tipus d'adductes que forma l'oxaliplatí amb el DNA són pràcticament idèntics als que forma el cisplatí. La proporció d'adductes intracatenaris amb dues guanines contínues o bé una adenina i una guanina és la mateixa que en el cas del cisplatí. També són similars els efectes que provoca l'oxaliplatí en l'estructura del DNA, i de la mateixa manera l'estructura d'un adducte d(GpG) *cis*-bifuncional entre l'oxaliplatí i un desoxidecanucleòtid bicatenari ha estat resolta mitjançant difracció de raigs X. Tanmateix, les estructures cristal·lines del cisplatí i l'oxaliplatí enllaçats al DNA fan palesa la formació d'un pont d'hidrogen amb la guanina situada en la posició 3' només en el cas de l'oxaliplatí; el formen l'NH pseudoequatorial del lligand (1*R*, 2*R*)-*trans*-ciclohexà-1,2-diamina i l'O6 de la guanina en 3'. Aquest pont d'hidrogen només s'identifica quan el lligand és l'enantiòmer (*R,R*); quan el lligand és l'enantiòmer (*S,S*) no es forma, la qual cosa podria explicar la menor activitat d'aquest segon compost. Tot això posa de manifest la importància de la quiralitat, que juga un paper determinant en la diferent interacció entre els enantiòmers de l'oxaliplatí i el DNA.²⁰

És a dir, les úniques diferències entre els adductes cisplatí-DNA i oxaliplatí-DNA són la formació del pont d'hidrogen abans esmentat i els lligands no làbils. En el cas de l'oxaliplatí és més voluminós i més apolar. Tanmateix, s'ha vist que l'oxaliplatí necessita menys lesions en el DNA per aconseguir la mateixa inhibició cel·lular que el cisplatí. També es coneix que la interacció de l'adducte oxaliplatí-DNA amb diferents proteïnes és diferent que en el cas del cisplatí. L'oxaliplatí és més hidrofòbic, amb la qual cosa podria interaccionar més fàcilment amb les butxaques hidrofòbiques de les proteïnes.²¹ D'altra banda, se sap que les proteïnes MMR pràcticament no reconeixen aquest tipus d'adductes i per tant la citotoxicitat del fàrmac no està condicionada per la seva presència. Aquest fet es podria atribuir a l'impediment estèric del lligand no polar ciclohexà-1,2-diamina que evitaria el reconeixement de la lesió per part de les proteïnes MMR.¹³

²⁰ Spingler, B.; Whittington, D. A.; Lippard, S. J. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 5596-5602.

²¹ Chaney, S.G. *International Journal of Oncology* **1995**, *6*, 1291-1305.

Així doncs, sembla clara la influència dels lligands no làbils en l'activitat, selectivitat i toxicitat dels compostos de platí. Petites modificacions estructurals poden conduir a fàrmacs actius o no en front de determinats tumors. És per aquest motiu que és interessant estudiar la relació estructura-activitat per tal de poder dissenyar nous fàrmacs que superin els mecanismes de resistència i siguin efectius en un espectre més ampli de tumors. En el següent apartat es realitzarà un estudi de la relació estructura-activitat en compostos de platí.

1.4. Estudi de la relació estructura-activitat en compostos de platí

És difícil establir una relació estructura-activitat ja que són molts els factors que poden intervenir-hi. Per exemple, les reaccions que es poden patir abans d'arribar a la cèl·lula, la velocitat i els mecanismes d'absorció en la cèl·lula, la inactivació prèvia a l'enllaç amb el DNA, la velocitat d'unió al DNA, el tipus d'adducte que es forma i la seva reparació. Tots aquests aspectes poden suposadament influir de forma clara en l'activitat del complex.²² També cal considerar el tipus de compostos que es volen comparar, és a dir, cal que formin part d'una mateixa família amb característiques estructurals similars. Un altre factor a tenir en compte és el tipus de cèl·lules que s'empren a l'hora de realitzar els estudis de l'activitat citoreguladora dels diferents compostos. En definitiva, cal comparar aquells compostos que tenen un mateix mecanisme d'actuació i unes característiques estructurals similars per poder determinar la influència dels diferents grups funcionals. Una bona aproximació per preveure l'activitat del compost és analitzar l'estabilitat de l'adducte compost-DNA, encara que finalment les proves *in vitro* i *in vivo* són les determinants.

El 1973, Clearer i Hoeschele van postular una sèrie de normes estructurals que havien de complir els compostos anàlegs al cisplatí per tal que existís activitat antitumoral.²³ Es van realitzar estudis amb compostos de fórmula genèrica *cis*-[Pt(X)₂(L)₂] i les regles empíriques establertes foren:

- Fórmula genèrica del tipus [Pt(X)₂(L)₂].
- Disposició *cis* dels lligands.
- Els lligands L havien de ser N-donadors, inerts a la substitució i amb un enllaç N-H, com a mínim.

²² Hambley, T. W. *Coord. Chem. Rev.* **1997**, 166, 181-223.

²³ Cleare, M. J.; Hoeschle, J. D. *Bioinorg. Chem.* **1973**, 2, 187-209.

- Els lligands X havien de ser un grup monoaniònic, de manera que el complex fos neutre.
- L'enllaç Pt-X havia de presentar una labilitat intermitja: ni massa làbil (tòxic) ni massa poc (inert).

Aquesta és la primera vegada que es parla de relació estructura-activitat per a compostos de platí amb activitat citoreguladora. Posteriorment s'ha demostrat però, el seu incompliment i s'han sintetitzat compostos amb activitat antitumoral provada que incompleixen aquestes regles. Es tracta de compostos en disposició *trans*, mononuclears o polinuclears catiónics, amb lligands N-donadors monodentats o bidentats sense enllaços N-H en els nitrògens, amb lligands biològicament actius, amb lligands S-donadors, amb derivats de platí (IV) i pal·ladi (II), amb compostos organometàl·lics, etc.

En els següents punts s'intentarà resumir els aspectes estructurals més rellevants i la seva influència en el mecanisme d'actuació dels diferents compostos, centrant-se sobretot en els complexos de platí tipus *cis* i en la influència dels lligands no làbils, ja que són les característiques principals que s'han tingut en compte a l'hora de dissenyar els complexos sintetitzats en el present treball. Tot i així, de vegades, no està gens clara la correlació estructura-activitat.

1.4.1. Influència de la solubilitat

La polaritat d'una substància és molt important des del punt de vista terapèutic ja que en pot dependre tant la seva activitat i toxicitat com la seva administració. En general els compostos de platí que són més solubles en aigua tenen una major activitat, encara que això també pot comportar un augment en la toxicitat. S'ha vist que quan un compost presenta una solubilitat similar en lípids i aigua s'assoleix un mínim de toxicitat i un màxim d'índex terapèutic.²²

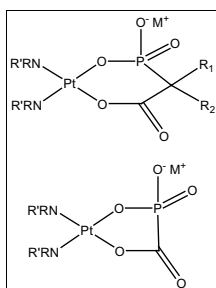


Figura 1. 10. Exemples de compostos de platí(II) amb fosfats com a lligands làbils.

Així doncs, la solubilitat en aigua és un factor molt important que condiciona l'activitat del compost. En alguns casos s'han modificat els lligands làbils per tal d'augmentar la solubilitat del compost en aigua. S'han emprat, per exemple, derivats de l'àcid fosfòric que alhora tenen propietats anticancerígenes, antivíriques i antibactericides.²⁴ Aquests compostos són solubles en aigua i mostren millors resultats en proves biològiques que els respectius anàlegs.

²⁴ Hollins, L. S.; Miller, A. V.; Amundsen, A. R.; Schurig, J. E.; Stern, E. W. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 105-111.

Una altra manera d'augmentar la solubilitat és emprar agents solubilitzants com és el cas de les α -ciclodextrines o de polímers solubles en aigua, com el polivinilpirrolidone. L'ús d'aquests agents també dona un augment significatiu en l'activitat dels compostos.²⁵

1.4.2. Influència dels alcohols i dels àcids carboxílics

Quan un compost té un grup hidroxil, que fa que augmenti la seva polaritat, s'ha vist que, en general, l'activitat del compost disminueix, ja que també ho fa la seva lipofília. Per contra, quan l'alcohol està protegit amb un grup làbil, la seva activitat *in vivo* augmenta.²⁶

Dins de la següent sèrie de compostos es compleix en general que els lligands amb grups polars presenten menor activitat que els corresponents anàlegs.

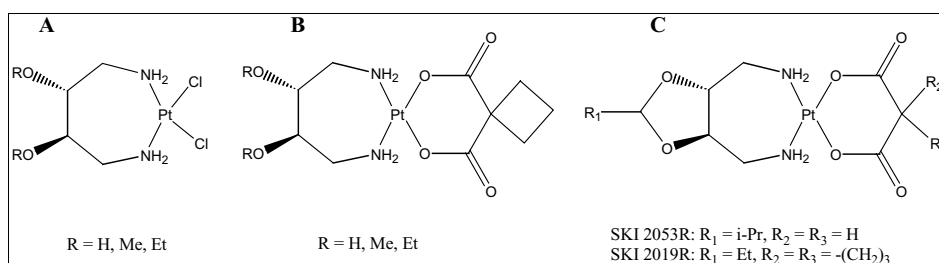


Figura 1. 11. Comparació de les sèries de compostos **A**, **B** i **C** que tenen grups alcohols lliures i protegits.

D'aquesta manera, l'activitat per als compostos amb grups etoxi és superior a la que presenten aquells compostos amb el grup metoxi, i aquests són alhora més actius que els corresponents alcohols. Sorprenentment però, el compost **B** amb l'alcohol lliure presenta major activitat. També s'ha vist que els compostos **C** presenten una major activitat que els **A** i **B**.²⁷

En la sèrie següent també s'observa la mateixa gradació pel que fa a l'activitat. El compost **1** és el menys actiu. El compost **3**, que té el grup 1,3-dioxolà, presenta major activitat i millors factors de resistència que no pas el seu anàleg amb els dos grups hidroxil lliures.²⁸

²⁵ Brumer, H.; Hankofer, P.; Treitinger, B. *Chem. Ber.* **1990**, 1029-1038.

²⁶ Jolley, J. N.; Yanovsky, A. I.; Kelland, L. R.; Nolan, K. B. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, 83, 91-100.

²⁷ Kim, D-K.; Gam, J.; Cho, Y-B.; Kim, H-T.; Kim, K. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6 (6), 647-652.

²⁸ Kim, D-K.; Kim, Y-W.; Kim, H-T.; Kim, K. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6 (6), 643-646.

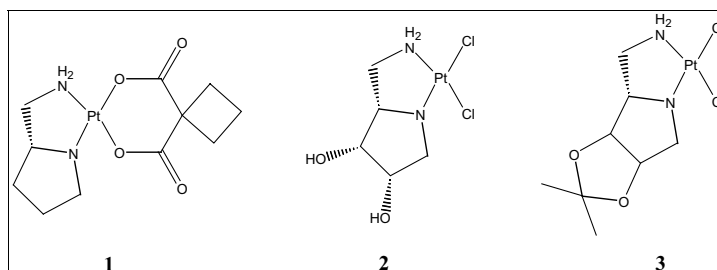


Figura 1. 12. Influència dels grups hidroxil i d'aquests protegits.

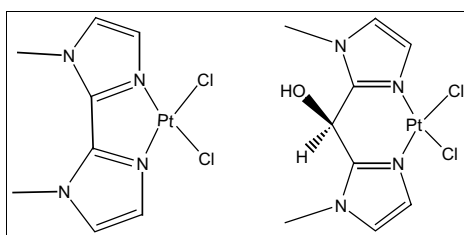


Figura 1. 13. Compostos que es diferencien per la presència o no d'un grup hidroxil.

No sempre, però la presència d'un alcohol significa una menor activitat. En els compostos que es mostren en la Figura 1. 13 passa exactament el contrari, el compost amb un grup hidroxil és més actiu, tot i tenir un major impediment estèric.^{29, 6} En aquest cas s'atribueix la major activitat a la possibilitat de formar ponts d'hidrogen

amb les bases del DNA de manera que s'estabilitza l'adducte compost-DNA. Caldria veure però, l'activitat que presenta un anàleg amb l'alcohol protegit.

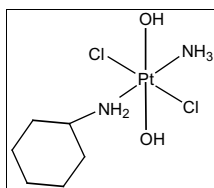


Figura 1. 14. Compost de Pt(IV) amb els grups hidroxil en posició axial.

En algun compost de Pt(IV) la presència de grups hidroxil en les posicions axials és imprescindible per tal que mostrin activitat (Figura 1. 14), tot i que possiblement *in vivo* es produeix la reducció al corresponent complex de Pt(II). Aquest, però, és inactiu.¹⁸

Els àcids carboxílics també augmenten la polaritat dels compostos i per tant la seva solubilitat. *In vivo*, aquests grups es troben en forma de carboxilats, de manera que es produeix una repulsió amb els fosfats del DNA i en general són menys actius.⁷

1.4.3. Influència de les amines

Les amines són, fins ara, els millors lligands no sortint. La seva influència en el mecanisme d'acció i en l'activitat dels diferents tipus de compostos és un tema encara avui de controvèrsia. La informació que hi ha de vegades és contradictòria i ha anat canviant des de les regles establertes el 1973 per Clearer i Hoeschele. En un principi es

²⁹ Hambley, T. W.; Jones, A. R. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, 212, 35-59.

va creure que era imprescindible que les amines tinguessin com a mínim un grup NH per tal que el compost presentés certa activitat citoreguladora.³⁰ Després es va demostrar que existien compostos actius que no presentaven cap enllaç NH. Llavors la teoria més estesa fou que no era necessari un enllaç NH, sinó que les amines havien de presentar poc impediment estèric al voltant de l'àtom de platí per tal de poder formar l'adducte amb el DNA. La majoria d'aquests compostos són amines que formen part d'un enllaç π pla, de manera que l'impediment estèric és petit.^{31, 32} De totes maneres, s'ha demostrat que quan existeix un enllaç NH, aquest facilita l'aproximació al DNA i forma un pont d'hidrogen amb els fosfats en l'adducte amb d(GpG).^{29, 30, 33} Recentment fins i tot s'ha postulat que el disseny de nous fàrmacs de platí ha d'encaminar-se cap a la síntesi de molècules capaces de formar ponts d'hidrogen amb el DNA en les proximitats de la lesió amb el platí.²⁰

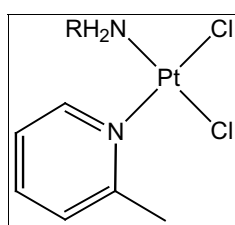


Figura 1. 15. Representació de l'AMD473.

L'impediment estèric al voltant de l'àtom de platí però, no sempre és desfavorable i pot tenir un paper important en l'activitat del compost. Un exemple és el del compost AMD473^{34, 18} que es mostra en la Figura 1.15. Quan el metil de la metilpiridina es troba en posició *meta* o *para*, el compost no és actiu. En el cas de la substitució en *orto* existeix un cert impediment estèric en la posició axial del complex, el qual provoca una disminució de la velocitat de

substitució del complex planoquadrat. D'aquesta manera s'evita que el glutatió i altres tiols desactivin el compost i aquest manté la capacitat de provocar lesions citotòxiques en el DNA.³⁵

D'altra banda, quan els grups amino tenen substituents alquils petits, l'activitat dels complexos de platí augmenta, ja que s'incrementa també la seva lipofília. Per exemple, quan es canvia R = pentil per R = hexil, en el compost que es mostra en la figura tant la toxicitat com l'activitat disminueixen considerablement per motius de solubilitat i de lipofília.²² En contraposició, molts autors defensen que l'activitat d'aquest tipus de compostos disminueix quan les amines tenen grups alquil com a substituents, és a dir que de major a menor activitat tindriem: $\text{NH}_3 > \text{NH}_2\text{R} > \text{NHR}_2 > \text{NR}_3$.^{36, 37}

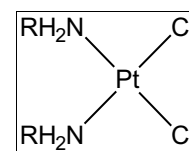


Figura 1. 16. Compost de Pt(II) amb grups amino com a substituents. R = alquil.

³⁰ Kaim, W.; Schwederski, B. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life. An Introduction and Guide*. John Wiley & Sons. **1994**, 263-372.

³¹ Marzilli, L. G.; Saad, J. S.; Kuklenyik, Z.; Keating, K. A.; Xu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (12), 2764-2770.

³² Ziegler, C. J.; Silverman, A. P.; Lippard, S. J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5, 774-783.

³³ Barnard, C. F. J. *Platinum Metals Rev.* **1989**, 33 (4), 162-167.

³⁴ Kelland, L. R.; Barnard, C. D. J. *Drugs of the Future* **1998**, 23 (10), 1062-1065.

³⁵ Jansen, B. A.; van der Zwar, J.; den Dulk, H.; Brouwer, J.; Reedijk, J. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 245-249.

³⁶ Bloemink, M. J.; Heetebrij, R. J.; Inagaki, K.; Kidani, Y.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 4656-4661.

Un altre aspecte a tenir en compte és que els lligands siguin monodentats, com els grups ammino, o bidentats, com el 1,2-diaminociclohexà. En general es compleix que els compostos amb lligands monodentats mostren major mutagènesi.

L'oxaliplatí és un compost quiral amb el qual s'han realitzat nombrosos estudis i s'ha comparat amb un gran nombre de compostos amb estructura similar per tal de poder establir millor el seu mecanisme d'actuació.¹⁹ Tal i com s'ha explicat anteriorment, el compost més actiu és el que té una configuració *trans* (*R, R*), en contra dels compostos *trans* (*S, S*) i *cis*, que presenta forma *meso*.^{38, 39}

Comparant l'oxaliplatí amb altres compostos similars, estructuralment es pot veure com canvia l'activitat dels compostos en canviar l'estructura dels mateixos. Per exemple, quan el lligand en comptes de ser la ciclohexà-1,2-diamina és la cicloheptà-1,2-diamina, el compost és actiu encara que no tant; per contra quan el lligand és el 1,2-ciclopentadiamina el compost ja no és actiu.^{21, 40}

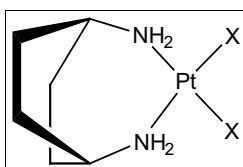


Figura 1. 17. Representació d'un complex de Pt(II) amb el lligand *cis*-ciclohexà-1,4-diamina.

La disposició del complex a l'hora de formar l'adducte amb el DNA té una gran influència sobre la seva activitat i queda palesa en el següent exemple. El compost amb el lligand *cis*-ciclohexà-1,4-diamina presenta diferents valors d'IC₅₀ i factors de resistència que el mateix compost però amb el ciclohexà-1,2-diamina com a lligand.⁴¹

1.4.4. Influència de la quiralitat

És lògic pensar, *a priori*, que la quiralitat serà un factor important en la interacció del compost amb el DNA, molècula també quiral. Tanmateix, no s'han trobat diferències significatives en l'activitat en compostos anàlegs al cisplatí de fórmula genèrica *diamPtCl*₂ (on *diam* = diamina quiral quelant), és a dir, que aquests compostos no presenten reconeixement quiral en la reacció amb el DNA. Sorprenentment, però, sí que ho fan quan reaccionen amb un dinucleòtid.^{38, 42} De totes maneres hi ha altres compostos quirals, a banda del ja esmentat cas de l'oxaliplatí, que també presenten diferent activitat en funció de l'enantiòmer.

³⁷ Bourdeaux, E. A. *International Journal of Quantum Chemistry* **2001**, 83, 255-258.

³⁸ Pasini, A.; Zunino, F. *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 615-624.

³⁹ Bruck, M. A.; Bau, R. *Inorg. Chim. Acta* **1984**, 92, 279-284.

⁴⁰ Burchenal, J. H.; Kalaher, K.; Dew, K.; Lokys, L.; Gale, G. *Biochimie* **1978**, 60, 961-965.

⁴¹ Hoeschele, J. D.; Schowlter, H. D. H.; Kraker, A. J.; Elliot, W. L.; Roberts, B. J.; Kampf, J. W. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2630-2636.

⁴² Gullotti, M.; Pasini, A.; Ugo, R. *Inorg. Chim. Acta* **1984**, 91, 223-227.

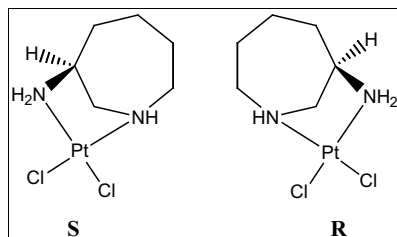


Figura 1. 18. Exemple de dos complexos enantiomèrics que mostren diferent activitat.

En la figura es mostra un exemple. Els dos compostos presenten diferent activitat i diferent estabilitat dels seus respectius adductes amb el DNA. El complex de configuració S presenta menor impediment estèric, pot situar-se millor en el solc major del DNA i formar adductes bifuncionals.²⁹

Un altre exemple és el compost DWA2114R, representat en la Figura 1. 19. En aquest cas l'activitat dels dos enantiòmers és similar, el compost de configuració S però, té major nefrotoxicitat.²

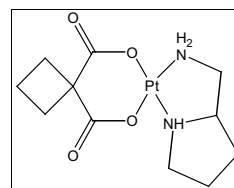


Figura 1. 19. Representació del compost DWA2114R.

1.4.5. Compostos organometàl·lics

La coordinació dels lligands al metall a través d'un enllaç organometàl·lic de tipus π , en certa manera, presenta un avantatge si es considera el mecanisme d'actuació d'aquest tipus de compostos. Se sap que són les formes aquatitzades i carregades positivament del cisplatí les que, en última instància, interaccionen amb el DNA. Així doncs, amb aquest tipus de compostos es pretén desplaçar els equilibris que es mostren en la Figura 1. 20 cap a la formació de l'adducte amb el DNA, ja que els enllaços organometàl·lics tipus π presenten un major efecte *trans* que no pas les amines.⁴³

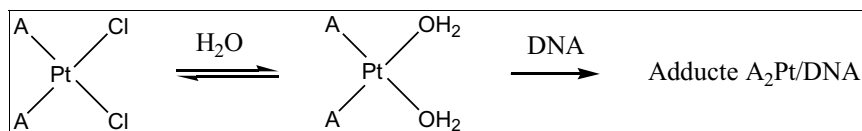


Figura 1. 20. Equilibris de formació de l'adducte amb el DNA.

⁴³ Brown, D. B.; Khokhar, D. B.; Hacker, A. R.; McCormack, M. P. J.J. *Inorg. Chim. Acta* **1982**, 67, 45-52.

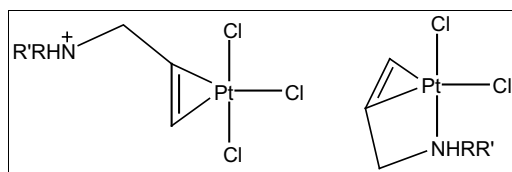


Figura 1. 21. Formes de coordinació d'un lligand amino olefínic.

Emprant com a lligands amino-olefines, poden obtenir-se dos tipus de compostos: el lligand pot coordinar-se formant un quelat, o bé, el lligand només s'uneix a través del doble enllaç, quan l'amina es troba en forma d'amoni. En general s'obtenen millors

resultats d'activitat quan el lligand és neutre.

1.4.6. Compostos amb doble mecanisme d'acció

Per tal de superar la resistència després d'una dosi inicial i ampliar l'espectre de tumors en front dels quals el cisplatí és actiu, s'han desenvolupat tota una sèrie de fàrmacs de platí amb la característica comuna de tenir com a lligands molècules biològicament actives. Aquestes poden ser agents intercalants⁶ del DNA, com les acridines; agents radiosensibles,⁴⁴ com els nitroimidazoles; compostos dinuclears⁴⁵ que actuen d'*antisense* i en la formació de triple hèlix; profàrmacs, com les cefalosporines activables per β -lactamases, per al mètode d'immunoconjugats;⁴⁶ lligands que actuen com a antimetabolits, i polímers naturals com a portadors.

1.4.7. Compostos en disposició *trans*

En un principi es va creure que era necessària una disposició en *cis* dels lligands perquè el complex fos actiu. Tot i així existeixen nombrosos compostos en *trans* que són actius, encara que no formen majoritàriament adductes 1,2-intracatenaris amb el DNA. Els compostos *trans* són més reactius cinèticament que els compostos *cis*, i com a conseqüència també són més susceptibles de desactivació. Per aquest motiu, els lligands impedits estèricament, en general i en contra del que succeeix en els compostos en *cis*, fan que augmenti la seva activitat ja que en disminueixen la seva cinètica.^{6,47}

⁴⁴ a) Bales, J. R.; Mazid, M. A.; Sadler, P. J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1985**, 795-802.

b) Farrell, N.; Skov, K. A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1043-1044.

⁴⁵ Farrell, N. *Comments Inorg. Chem.* **1995**, 16(6), 373-389.

⁴⁶ Hanessian, S.; Wang, J. *Can. J. Chem.* **1993**, 71, 896-906.

⁴⁷ Natile, G.; Coluccia, M. *Metal Ions in Biological Systems* **2004**, 42, 209-250.

1.4.8. Farmacocinètica

Fins ara hem vist la influència dels lligands no sortint en l'activitat i toxicitat dels compostos de platí. Una altra manera d'incidir en l'activitat és modificar els lligands sortint, d'aquesta manera es pot modular la farmacocinètica dels compostos.⁴⁸ Aquest és un tema molt ampli que no entrarem a tractar en profunditat. Només a tall d'exemple comentarem que el carboplatí és menys tòxic i pot administrar-se en majors dosis que el cisplatí gràcies a una cinètica més lenta.

1.5. Perspectives de futur

Com ja s'ha anat comentant, el futur d'aquests fàrmacs passa per ampliar l'espectre de tumors en front dels quals és actiu el cisplatí, superar els mecanismes de resistència, augmentar l'activitat, disminuir la seva toxicitat i millorar la selectivitat. És difícil obtenir compostos que compleixin totes aquestes característiques, per això és important conèixer els mecanismes d'actuació i establir correlacions estructura-activitat, que ens permetin, en última instància, modular estructuralment els compostos per a obtenir els millors resultats.

1.6. Objectius

Dins el marc de la síntesi de nous compostos de platí com a possibles agents antitumorals i tenint en compte les correlacions estructura-activitat comentades en la introducció, es van plantejar els següents objectius per al present treball:

- *Disseny de diamines*, com a lligands no làbils, capaces de formar un quelat amb el platí. L'interès principal és sintetitzar lligands amb el mateix esquelet, en aquest treball es tracta de 1,2-bis(aminometil)ciclohexà, però amb diferents característiques que ens permetin, en última instància, establir una correlació estructura-activitat. Les característiques estructurals que es volen introduir per estudiar la seva influència en l'activitat són per exemple:
 - Un grup que permeti augmentar la hidrofília dels compostos, com un grup hidroxil, un metoximetiloxi derivat.

⁴⁸ O'Dwyer, P. J.; Stevenson, J. P.; Johnson, S.W. *Drugs* **2000**, *59*(4), 19-27.

- Un grup que permeti augmentar-ne la lipofília, com un metoxil o una cadena alifàtica.
- Diamines bicícliques, que presentin una major rigidesa i un major impediment estèric.
- Un doble enllaç o un sistema aromàtic, per estudiar la influència d'un sistema π .

Per a la síntesi d'aquests compostos s'ha de considerar la disponibilitat dels productes de partida, la versatilitat que permeti obtenir un gran nombre de productes comparables entre sí i la ruta sintètica, que ha de constar de pocs passos amb uns rendiments acceptables.

- *Síntesi i caracterització dels complexos de platí (II)*. Es pretén coordinar les diamines sintetitzades al platí, de manera que formin un quelat de set baules i caracteritzar els complexos resultants mitjançant espectroscòpia de RMN i IR, espectrometria de masses, anàlisi elemental i quan sigui possible mitjançant difracció de raigs X de monocristall.
- *Estudis d'interacció amb el DNA*. Com ja s'ha explicat, el DNA és la principal diana biològica d'aquest tipus de compostos. Per aquest motiu es vol estudiar com hi interaccionen mitjançant les tècniques de dicromisme circular, electroforesi en gel d'agarosa i microscòpia de forces atòmiques.
- *Assaigs in vitro de l'activitat antiproliferativa* amb línies cel·lulars canceroses sensibles i resistents al cisplatí. Aquests han de permetre establir una correlació estructura-activitat entre els complexos sintetitzats.