

# **Nuevos complejos de coordinación con el ligando dmoPTA: avances en la capacidad antiproliferativa**

Memoria para optar al grado de Doctor con Mención  
Internacional por la Universidad de La Laguna, presentada  
por:

**Elisabet Zenaida Mendoza Nozeman**

Director: Dr. Pablo Lorenzo Luis

Co-director: Dr. Antonio Manuel Romerosa Nieves

Noviembre de 2019



**Pablo Antonio Lorenzo Luis**, Titular de Química Inorgánica (ULL) y **Antonio Manuel Romerosa Nieves**, Catedrático de Química Inorgánica (UAL), como directores del trabajo presentado en esta Memoria.

**CERTIFICAN:** Que la memoria titulada “**NUEVOS COMPLEJOS DE COORDINACIÓN CON EL LIGANDO dmoPTA: AVANCES EN LA CAPACIDAD ANTIPROLIFERATIVA**” ha sido realizada por la Licenciada en Química D<sup>a</sup>. Elisabet Zenaida Mendoza Nozeman, bajo nuestra dirección, en las dependencias de las Áreas de Química Inorgánica (ULL y UAL), durante los años 2014-2019.

**AUTORIZAN:** La defensa de la presente Memoria, dado que reúne los requisitos de calidad y cantidad necesarios para constituir la Tesis Doctoral que la citada Licenciada presenta para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de la Laguna en el Programa de Química e Ingeniería Química.

La Laguna, Noviembre de 2019

Almería, Noviembre de 2019

Fdo.: Dr. Pablo A. Lorenzo Luis

Fdo.: Dr. Antonio M. Romerosa Nieves



## **AGRADECIMIENTOS**

Primero, me gustaría agradecer a mis directores de tesis Pablo Lorenzo Luis y Antonio Romerosa Nievas por confiar en mí a lo largo de estos años y permitirme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral junto a ellos. Gracias por todas esas horas dedicadas a nuestra química, por tantas correcciones de papers, abstracts y tesis; y también por vuestra enorme paciencia, sé que no soy una persona fácil.

También quiero agradecer a Franco Scalambra por todo el tiempo que ha dedicado a enseñarme a trabajar en el laboratorio, a ayudarme a avanzar a lo largo de toda la tesis doctoral y también por la resolución de las estructuras cristalinas y los cálculos teóricos realizados para algunos de mis complejos. Del mismo modo, quiero agradecer a mis compañeros del CIESOL por acogerme como a una más desde el primer momento (Ana, Samira, Franco y Gracia) y también a aquellos con los que más tiempo (y desayunos) he pasado durante los últimos años (Jose, Belén y Andrés).

Agradecimientos a Jose Luis, el mejor técnico que haya podido tener. Aunque haya estado poco por La Laguna, agradezco que siempre me ofreciera una mano cuando lo necesitaba. Gracias también a Joaquín Sanchiz por sacarme de mis apuros cuando me hacía falta y a Sonia por buscarme un hogar cuando llegué a Almería y por realizar las medidas de Difracción de Rayos-X. Muchas gracias también a Jose Manuel Padrón por llevar a cabo los ensayos biológicos de todos los complejos que hemos sintetizado hasta la fecha.

Al equipo de la Universidad de Lisboa, muchísimas gracias por acogerme durante esos tres meses de estancia. Agradecer al profesor Carlos Nieto de Castro, coordinador del centro de Química Estructural de la Universidad de Lisboa por permitirme realizar la estancia en su laboratorio de investigación. Especial gracias a Leonor por enseñarme a manejar el cultivo y tratamiento de las células, a Ricardo por tantas risas y hacerme sentir como en casa en el laboratorio, y a las doctoras Andreia

Valente e Isabel Tomaz por guiarme y acogerme tan amablemente desde el principio. ¡Siento lo de la cubeta!

Finalmente, me gustaría agradecer a mi familia y a aquellos que considero parte de ella por todo el apoyo brindado: A mis padres y hermano por el apoyo incondicional y los ánimos a seguir a lo largo de estos numerosos años; y en especial a mi madre, por las horas que ha pasado al teléfono escuchando mis lloros y quejas. Espero que el esfuerzo que habéis invertido en mí y en mis estudios os permita estar como mínimo orgullosos de este trabajo. Especial agradecimiento también a Juanmi por confiar siempre en mí, tanto a nivel profesional como en otros tantos aspectos de mi vida, ayudándome siempre a seguir adelante. Y finalmente, a Richy, Gerard, Marc y a mis frikis; que, aunque algunos no están muy familiarizados con este mundillo, siempre han sabido darme los empujoncitos emocionales que necesitaba.

Muchísimas gracias a todos.





*Naar mijn grootouders.*



# Índice

Resumen/Abstract.	15
<b>1. Presentación de las publicaciones.</b>	<b>23</b>
1.1. Financiación económica.	25
1.2. Modalidad por compendio de publicaciones.	25
<b>2. Introducción.</b>	<b>31</b>
2.1. La química y su papel en la quimioterapia del cáncer.	35
2.2. Complejos de rutenio: actividad biológica.	42
<b>3. Justificación de la unidad temática</b>	<b>49</b>
<b>4. Objetivos.</b>	<b>57</b>
<b>5. Trabajo experimental.</b>	<b>63</b>
5.1. Métodos.	65
5.2. Síntesis de nuevos complejos.	66
<b>6. Resultados y discusión.</b>	<b>75</b>
6.1. Caracterización de los complejos.	77
6.2. Difracción de Rayos-X.	93
6.3. Ensayos biológicos .	99
6.4. Ensayos complementarios.	102
<b>7. Conclusiones/Conclusions.</b>	<b>113</b>
<b>8. Anexo I.</b>	<b>121</b>
8.1. Publicaciones.	123
<b>9. Anexo II.</b>	<b>145</b>

- 9.1. Comunicaciones a congresos. 147
- 9.2. Trabajo realizado durante la estancia predoctoral. 154





# Resumen / Abstract

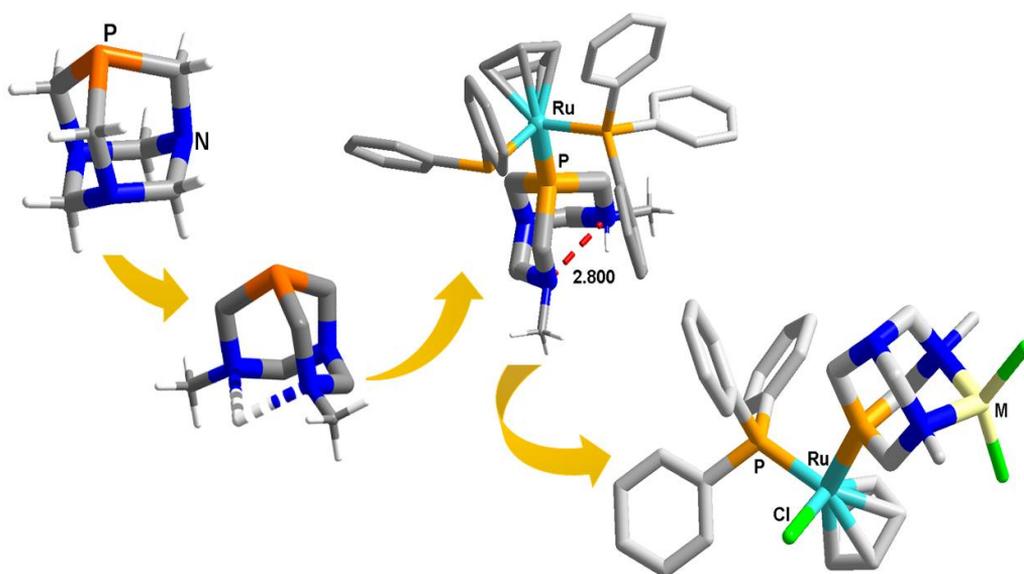
---



## Resumen.

En esta tesis doctoral se han sintetizado y caracterizado nuevos complejos de rutenio de geometría pseudo-octaédrica para realizar estudios de actividad antiproliferativa en células tumorales y establecer nuevas relaciones estructura / actividad en función de los ligandos y sus características hidrofílicas y lipofílicas.

En base a estas consideraciones, en los últimos años hemos dirigido nuestra atención a la síntesis de nuevos complejos  $\{RuCp\}^+$  en combinación con los ligandos PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano), dmPTA (*N,N'*-dimetil-1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano) y (HdmoPTA)<sup>+</sup> (3,7-H-3,7-dimetil-1,3,7-triaza-5-fosfabciclo[3.3.1]nonano, [Figura 1](#)).



[Figura 1](#). Ligandos fosfanos y sus complejos con la unidad *piano-stool*  $\{RuCp\}^+$ .

Desde un punto de vista estructural, este último ligando una vez desprotonado, posee la capacidad de actuar como un ligando quelato a través de sus átomos de  $NCH_3$  ( $N_{CH_3} \cdots N_{CH_3} = 2,800 \text{ \AA}$ ). Asimismo, al

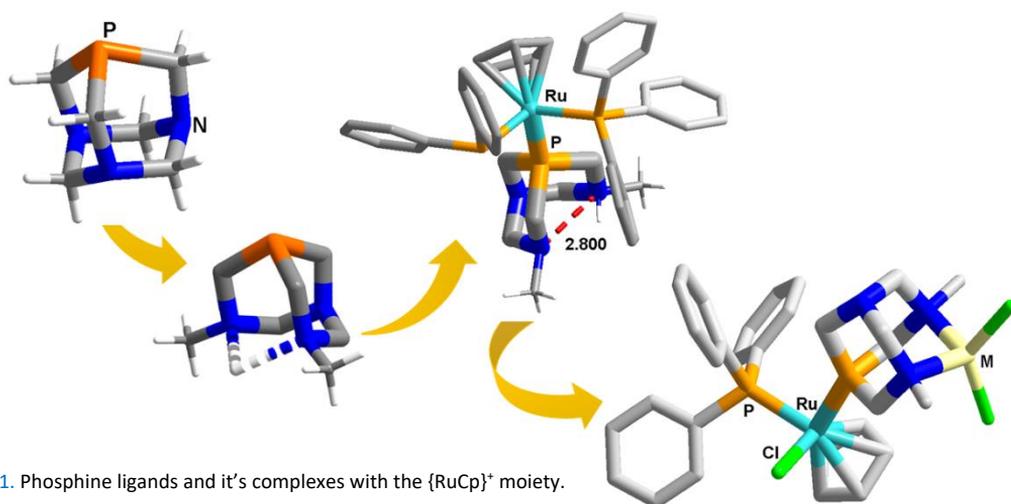
completar la esfera de coordinación del metal en el fragmento {CpRuL} (L = HdmoPTA, dmoPTA), se consiguen diferentes propiedades estéricas, eléctricas, de solubilidad, etc., que han permitido la síntesis de nuevos complejos ([RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)](OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-MCl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, (M = Co, Zn, [Figura 1](#))) con propiedades antiproliferativas mucho mejores (más de 200 veces en algunos casos) que las del conocido fármaco anticancerígeno cisplatino.

Ensayos *in vitro*, frente a diferentes líneas celulares humanas, han mostrado una mejor actividad antiproliferativa del complejo de cinc (GI<sub>50</sub> = 0,030 - 0,083 μM; 30 - 83 nM) cuando se compara con su complejo parental [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)]<sup>2+</sup> (GI<sub>50</sub> = 0,17 - 0,29 μM; 170 - 290 nM). Además, es significativamente más activo que su homólogo de cobalto frente a la línea celular humana de cáncer de mama (T-47D: 83 vs. 210 nM).

## Abstract.

In this doctoral thesis, new pseudo-octahedral ruthenium complexes have been synthesized and characterized in order to study its antiproliferative activity in tumor cells and to establish new structure / activity relationships depending on the ligands and their hydrophilic and lipophilic characteristics.

Based on these considerations, in recent years we have focused our attention to the synthesis of new complexes  $\{\text{RuCp}\}^+$  in combination with the ligands PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane), dmPTA (*N,N'*-dimethyl-1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) and  $(\text{HdmoPTA})^+$  (3,7-H-3,7-dimethyl-1,3,7-triaza-5-phospha-bicyclo [3.3.1] nonane, [Figure 1](#)).



[Figure 1](#). Phosphine ligands and it's complexes with the  $\{\text{RuCp}\}^+$  moiety.

From a structural point of view, this last ligand has the ability to act as a chelate ligand through its NCH atoms once it has been deprotonated ( $\text{NCH}_3 \cdots \text{NCH}_3 = 2.800 \text{ \AA}$ ). In addition, by completing the coordination sphere of the metal in the fragment  $\{\text{CpRuL}\}$  ( $\text{L} = \text{HdmoPTA}, \text{dmoPTA}$ ), different steric, electric and solubility properties, etc, are obtained. This have allowed the synthesis of new complexes

([RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)](OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-MCl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, (M = Co, Zn, [Figure 1](#))) with much better antiproliferative properties (more than 200 times in some cases) than those of the well-known anticancer drug cisplatin.

In *in vitro* assays against different human cell lines, the zinc complex has shown a better antiproliferative activity (GI<sub>50</sub> = 0.030 - 0.083 μM, 30 - 83 nM) when it's compared with its parent complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)]<sup>2+</sup> (GI<sub>50</sub> = 0.17 - 0.29 μM; 170 - 290 nM). In addition, it is significantly more active than its counterpart cobalt complex compared to the human breast's cancer cell line (T-47D: 83 vs. 210 nM).





# 1. Presentación de las publicaciones

---



1. Presentación de las publicaciones.

### **1.1. Financiación económica.**

El desarrollo de esta investigación, ha sido posible gracias a las siguientes fuentes de financiación:

1. Un contrato predoctoral concedido por la Universidad de La Laguna en colaboración con la Obra Social de la Fundación la Caixa (BOC nº 244 Resolución del 9 de diciembre de 2015).
2. Dos proyectos de investigación concedidos al Grupo de Investigación FQM-317 (UAL): CTQ2015-67384-R (MINECO) y P09-FQM-5402 (Junta de Andalucía).
3. COST Action CM1302 (WG1, WG2).

### **1.2. Publicaciones: modalidad de compendio.**

Los trabajos que conforman la presente Tesis Doctoral forman parte de la línea de investigación “Química Organometálica y Catálisis en Agua” desarrollada en el Área de Química Inorgánica de la ULL en estrecha colaboración con el Grupo de Investigación FQM-317 del Departamento de Química Inorgánica de la UAL.

Asimismo, han sido presentados conforme al Artículo 29, apartado 1º publicado en el BOC. núm. 17, viernes 25 de enero de 2013, donde se establece de forma textual:

*“Podrán optar por la presentación de la tesis en modalidad de compendio de publicaciones aquellos doctorandos que, previamente a la presentación de su tesis y con la autorización expresa de su director, tengan publicados o aceptados para su publicación con fecha posterior a la de su matriculación en el programa de doctorado, un número mínimo de tres artículos con unidad temática en revistas científicas que figuren en la relación de revistas del Journal Citations Reports o estén indexadas en bases de reconocido prestigio, tales como Scopus, Latindex o similares, o sean de especial relevancia para su área o áreas afines, y que tengan relación con lo especificado en su plan de investigación.”*

1.2.1.

**Synthesis and Antiproliferative Activity of  
[RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)](OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (HdmoPTA = 3,7-H-3,7-  
Dimethyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo[3.3.1]nonane).**

Zenaida Mendoza, Pablo Lorenzo-Luis, Manuel Serrano-  
Ruiz, Elva Martín-Batista, José M. Padrón, Franco  
Scalambra, y Antonio Romerosa.

Area de Química Inorgánica, Departamento Química, Facultad de Ciencias, Universidad  
de La Laguna,

Area de Química Inorgánica-CIESOL, Departamento de Física y Química, Facultad de  
Ciencias, Universidad de Almería.

BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Centro de  
Investigaciones Biomédicas de Canarias, Universidad de La Laguna.

**Revista:** 2016, 55, 7820–7822.

**DOI:** 10.1021/acs.inorgchem.6b01207

**ISSN:** 0020 – 1669.

**Índice de Impacto:** 4.7 (2017).

**Base de Datos:** Journal Citation Reports – ISI Web of  
Knowledge.

**Posición en la sección:** "Chemistry, Inorganic and Nuclear":

Posición 5<sup>a</sup>/45.

**Cuartil:** Q1.

**Nº de citas:** 18 (4/04/2019)



1.2.2.

**Enhancement of the antiproliferative activity of [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dmoPTA-1κP)]<sup>+</sup> via its coordination to one {CoCl<sub>2</sub>} unit: synthesis, crystal structure and properties of [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-CoCl<sub>2</sub>](OTf)·0.25H<sub>2</sub>O.**

Zenaida Mendoza, Pablo Lorenzo-Luis, Franco Scalambra, José M. Padrón, y Antonio Romerosa.

Area de Química Inorgánica, Departamento Química, Facultad de Ciencias, Universidad de La Laguna,

Area de Química Inorgánica-CIESOL, Departamento de Física y Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Almería.

BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias, Universidad de La Laguna.

**Revista:** 2017, 46, 8009-8012.

**DOI:** 10.1039/c7dt01741c.

**ISSN:** 1477-9226.

**Índice de Impacto:** 4.099 (2017).

**Base de Datos:** Journal Citation Reports – ISI Web of Knowledge.

**Posición en la sección:** "Chemistry, Inorganic and Nuclear":  
Posición 6<sup>a</sup>/45.

**Cuartil:** Q1.

**Nº de citas:** 8 (4/04/2019)



1. Presentación de las publicaciones.

1.2.3.

**One Step Up in Antiproliferative Activity: The Ru-Zn Complex  
[RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-ZnCl<sub>2</sub>](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>).**

Zenaida Mendoza, Pablo Lorenzo-Luis, Franco  
Scalambra, José M. Padrón, y Antonio Romerosa.

Area de Química Inorgánica, Departamento Química, Facultad de Ciencias, Universidad  
de La Laguna,

Area de Química Inorgánica-CIESOL, Departamento de Física y Química, Facultad de  
Ciencias, Universidad de Almería.

BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Centro de  
Investigaciones Biomédicas de Canarias, Universidad de La Laguna.

**Revista:** 2018, 43, 4660-4660.

**DOI:** 10.1002/ejic.201800857.

**ISSN:** 1434 – 1948.

**Índice de Impacto:** 2.578 (2018).

**Base de Datos:** Journal Citation Reports – ISI Web of  
Knowledge.

**Posición en la sección:** "Chemistry, Inorganic and Nuclear":  
Posición 15<sup>a</sup>/45.

**Cuartil:** Q2.

**Nº de citas:** 01 (4/04/2019)



**Seleccionado por la Editorial como:**

➤ **Full Paper VIP**

➤ **Cover Feature**





## 2. Introducción

---





concepto ácido-base de Pearson o los aspectos cinéticos y termodinámicos de los complejos de metales de transición en disolución que, a su vez, son extrapolables a sus análogos biológicos más complejos.



Figura 3. Contribución de los elementos inorgánicos al desarrollo de la Química Bioinorgánica.

## 2.1. La química y su papel en la quimioterapia del cáncer

La Química es una ciencia asombrosa, nos permite preparar sustancias que a su vez contribuyen a la mejora de otras áreas científicas. Asimismo, nos proporciona materiales de incalculable valor añadido que mejoran nuestra calidad de vida; siendo incluso capaces de sanear y controlar el abastecimiento de agua o desarrollar vacunas para el control de muchas enfermedades. Sin embargo, la lucha contra determinadas enfermedades y la mejora en la calidad de vida de las personas que las sufren, son dos grandes retos de nuestra sociedad actual.

El binomio enfermedad/calidad de vida, se acentúa en una de las enfermedades más graves como es el cáncer. Este término que, en sí mismo, se corresponde con más de 200 enfermedades diferentes, lo define la Real Academia de la Lengua (RAE) como: una enfermedad de carácter neoplásico con transformación de células que proliferan de manera anormal e incontrolada (Figura 4).<sup>2</sup> En cualquier caso, genera un gran impacto económico y social.

---

<sup>2</sup> una neoplasia es una masa anormal de tejido que aparece cuando las células se multiplican más de lo debido o no se destruyen en el momento apropiado. A esta definición, se puede añadir que la masa anormal carece de finalidad, hace presa al huésped y es prácticamente autónoma.

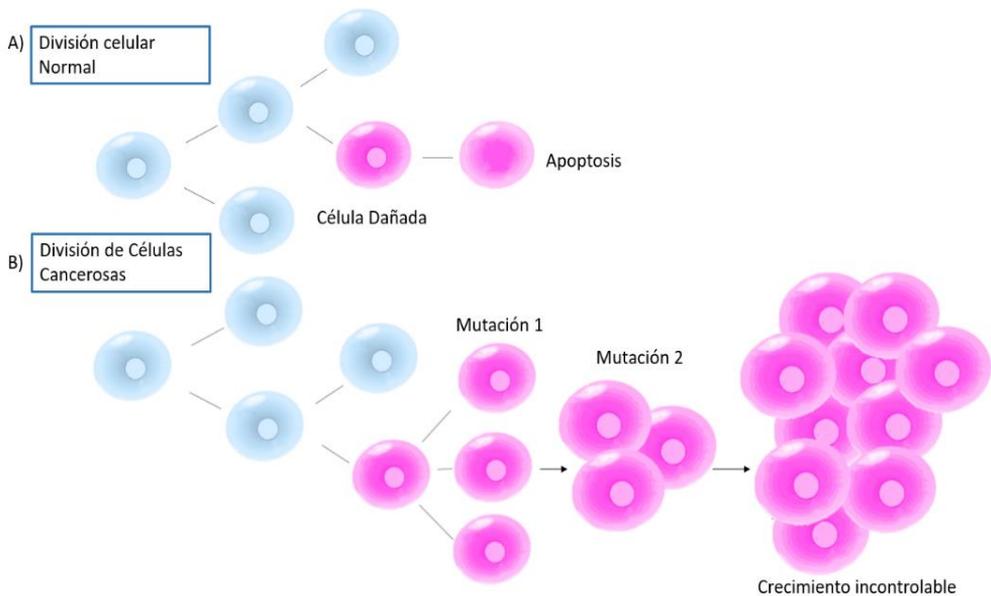


Figura. 4. División celular en A) una célula normal y B) una célula cancerosa.

En 1971, el Presidente Nixon declaró al cáncer como objetivo prioritario e instó a trabajar de forma conjunta a los organismos públicos de investigación y a las empresas farmacéuticas,<sup>3</sup> por lo que años más tarde, empezó a disponerse de fármacos específicos y de eficacia variable. Sin embargo, la gran complejidad que encierra esta enfermedad hace que aún sea considerada uno de los mayores problemas de salud en los países más industrializados.<sup>4</sup>

<sup>3</sup> National Cancer Act 1971.

<sup>4</sup> M. Avendaño, An. Quím, **2012**, 108, 290-295.

Se abre, no obstante, una ventana a la esperanza con el avance en diferentes direcciones de estudio y de enfoque en los tratamientos:

1. Desarrollo de la Biología Molecular (genómica y proteómica), a partir del descubrimiento del primer oncogén humano en 1982.
2. Desarrollo de tres vías de tratamiento: cirugía, quimioterapia y/o radioterapia.
3. Desarrollo de la inmunoterapia: reforzar el propio sistema inmunitario del paciente para que sea éste y no un agente externo, quien luche contra la enfermedad: J. P. Allison y T. Honjo: Premio Nobel de Medicina en 2018.

Pese a todos estos progresos y mientras se investigan nuevas formas de tratamiento, la quimioterapia sigue siendo un pilar fundamental en la lucha contra el cáncer. Si bien influye especialmente en aquellas células capaces de reproducirse con mayor rapidez, como las células tumorales, también afecta simultáneamente a otras células de la médula ósea, del tracto digestivo, de los folículos pilosos o de las uñas. Es por esto por lo que entre los principales efectos adversos se encuentran la inmunosupresión, la astenia, la mucositis y la alopecia. No obstante, estos efectos suelen ser transitorios, aunque si no llegan a ser controlados o tolerados por el paciente pueden producir toxicidad e interrupción temporal del proceso quimioterapéutico.

Afortunadamente, la capacidad de la síntesis inorgánica, entre otras, está permitiendo que los complejos de metales de transición contribuyan a ser una fuente muy valiosa en la quimioterapia del cáncer. Del mismo modo, al obtenerse mediante síntesis, están disponibles en cantidades adecuadas para uso clínico. Actualmente, se está empleando una combinación de fármacos constituidos por un agente anticancerígeno y otros compuestos capaces de mitigar sus graves efectos secundarios.

Por tanto, el diseño y desarrollo de nuevos fármacos es básico para contribuir a la eficacia de las diferentes terapias que se siguen en la lucha contra el cáncer. Además, han de ser capaces de poder erradicar las

células cancerosas sin afectar a los tejidos sanos, reconociendo y seleccionando sitios específicos de malignidad característicos de las células tumorales.

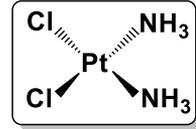


Figura 5. cisplatino.

El primer complejo de metal de transición empleado en el campo de la medicina fue el cisplatino (CDDP, Figura 5).<sup>5</sup> Los ensayos clínicos comenzaron en el año 1971,<sup>6</sup> siendo adquirida la patente por Bristol-Myers Squibb en 1977. Hoy en día sigue teniendo uso clínico en una amplia gama de tipos de cáncer: testicular, ovárico, cervical, de mama y vejiga, entre otros.<sup>7</sup>

Como complejo de coordinación, el cisplatino presenta una estructura plano cuadrada constituida por el átomo central de platino unido a dos ligandos Cl<sup>-</sup> y dos aminos en posición *cis*- (Figura 5). Se le suele aislar como

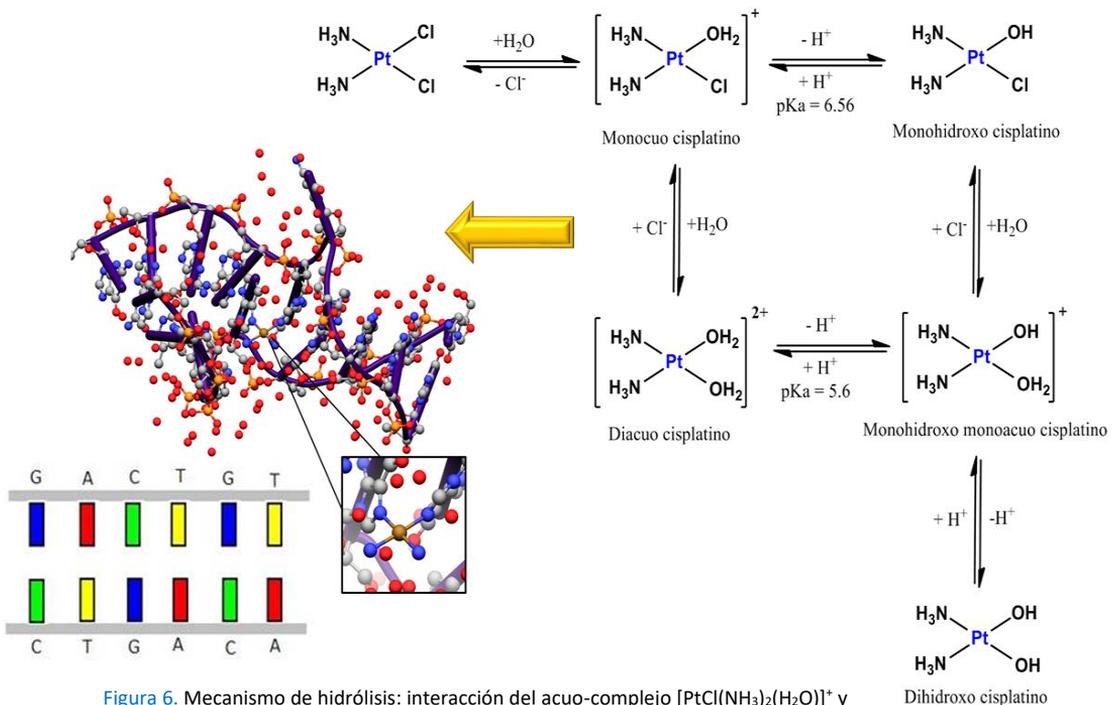


Figura 6. Mecanismo de hidrólisis: interacción del acuo-complejo  $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^+$  y formación del aducto con el ADN.

<sup>5</sup> L. Kelland. *Nat. Rev. Cancer*, **2007**, 7, 573-584.

<sup>6</sup> Aprobado por la FDA en 1978

<sup>7</sup> (a) J. Reedijk. *Chem. Commun.* **1996**, 0, 801-806; (b) E. Wong, C. M. Giandomenico. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2451-2466; (c) A. Casini, C. Gabbiani, *Biochemistry*, **2007**, 46, 12220-12230.

polvo cristalino de color blanco o amarillento, es poco soluble en agua y puede formar aductos con las bases púricas (principalmente las guaninas, [Figura 6](#)).<sup>8</sup> Este mecanismo de acción, que ocurre en el interior celular, transcurre en dos reacciones de hidrólisis consecutivas que dan lugar al acuo-complejo  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ , un potente electrófilo capaz de reaccionar con los grupos sulfidrilos y los átomos N7 de las bases púricas del ADN.<sup>9</sup> Por el contrario, el comportamiento de su homólogo *trans*- implica el enlace a una molécula de guanina y a otra de citosina que se encuentren próximas entre sí. El grado de interacción con el ADN es mucho menor, por lo que el complejo *cis*- es el más utilizado como agente quimioterapéutico.

El proceso que tiene lugar en el interior celular es el de reconocimiento molecular por parte del metal hacia unas secuencias de bases nitrogenadas específicas de la doble hélice del ADN.

Esta forma de coordinación del platino a la cadena de ADN produce una deformación en la hebra de tal magnitud que impide su replicación.<sup>10</sup> El daño provocado sobre el ADN es irreversible, y conduce a una irremediable apoptosis celular. Este efecto es especialmente determinante en las células cancerígenas o dianas que, a diferencia de las células sanas, tienen una elevada velocidad de duplicación que les impide tener un mayor margen de tiempo para desechar el metal por sus propios mecanismos. Esta diferencia implica que, el cisplatino, posee un grado aceptable de discriminación celular que permite su uso clínico, aunque esto no obstaculiza sus graves efectos secundarios.<sup>11</sup>

---

<sup>8</sup> F. Coste, J. M. Malinge, L. Serre, W. Shepard, M. Roth, M. Leng, C. Zelwer. *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 1837-1846.

<sup>9</sup> Se han descrito otros posibles mecanismos: (a) transporte pasivo; (b) endocitosis y (c) transporte activo secundario: J. Reedijk. *Platinum Metals Rev.*, **2008**, 52, 2-11.

<sup>10</sup> S. Dasari, P. B. Tchounwou. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, 5, 364-378.

<sup>11</sup> Las propiedades anticancerígenas del cisplatino fueron descubiertas por B. Rosenberg en 1960 durante sus investigaciones en el crecimiento bacteriano. Demostró que la electrólisis de un electrodo de platino producía la inhibición de la división de la *Escherichia Coli*: B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas. *Nature*, **1965**, 205, 698-699.

## 2. Introducción.

Después de 40 años de estudio, son pocos los compuestos que pueden utilizarse clínicamente con una base de platino, salvo, por ejemplo: el carboplatino o el oxaliplatino como fármacos de segunda y tercera generación, respectivamente (Figura 7). El carboplatino es más estable que el cisplatino, y de actividad equivalente. También se utiliza principalmente en el tratamiento de cáncer de

ovarios, pulmón, cuello y cerebro, y ha ganado popularidad en el tratamiento clínico no solo debido a sus bajos efectos secundarios, sino también por tener una mejor eficacia frente a aquellos tumores a los que el cisplatino presenta resistencia. Además, debido a sus efectos mielosupresores, se utiliza en los protocolos de supresión de la médula ósea en el tratamiento de la leucemia.<sup>12</sup> Por otro lado, el oxaliplatino presenta un mecanismo de acción y un perfil de resistencia diferente al cisplatino y al carboplatino. Se utiliza principalmente en el tratamiento de cáncer colorrectal y en la metástasis del mismo (en combinación con el 5-fluorouracilo (5-FU)/leucovorin).<sup>13</sup> Su mecanismo de acción consiste en la conversión del complejo en un derivado hidratado que posee la capacidad de interactuar con el ADN y formar puentes inter- e intra-catenarios que interrumpen la replicación de esta biomolécula. Su mayor efecto secundario es el desarrollo de neuropatías sensoriales; sin embargo, presenta una menor acción mielosupresora y una menor nefrotoxicidad.

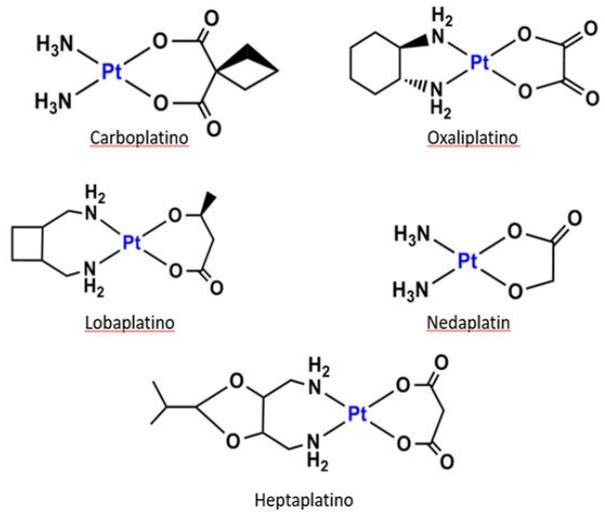


Figura 7. Estructuras de complejos derivados del cisplatino (2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> generación) para su uso clínico.

<sup>12</sup> Este nuevo fármaco, fue descubierto y desarrollado en el instituto de investigación contra el cáncer de Londres. En 1989, Myers obtuvo la aprobación de la Agencia de Alimentos y Medicamentos estadounidense (FDA) para comercializar el carboplatino bajo el nombre de Paraplatin; comenzando a estar disponibles versiones genéricas del fármaco en 2004.

<sup>13</sup> H. Burger, A. Zoumano, A.W.M. Boersma, J. Helleman, E.M.J.J. Berns, R.H.J. Mathijssen, W.J. Loos, E.A.C. Wiemer. Br. J. Pharmacol., 2010, 159, 898-908.

Estos compuestos de coordinación tienen un comportamiento que se corresponde con el de un pro-fármaco.<sup>14</sup> Del mismo modo, cabría destacar que no se combate la formación del tumor, sino la proliferación de las células tumorales ya formadas.

En la última década se ha incrementado el interés de muchos grupos de investigación por compuestos de coordinación que contengan otros metales de transición con fines terapéuticos y/o de diagnóstico, aunque sin excluir al platino.<sup>15-16</sup> La posibilidad de emplear compuestos de coordinación de la 1ª serie de transición, menos costosos y más abundantes [M(II) = Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn]<sup>17</sup> está poco investigada, a pesar de que estos complejos con un adecuado diseño de los ligandos garantizarían una estabilidad suficiente para conservar su integridad estructural en condiciones fisiológicas.<sup>18</sup> Asimismo, el empleo de metales de la 2ª y 3ª serie de transición son más costosos y menos abundantes [M(II) = Ru, Rh, Pd, Os, Ir; Au(I, III)],<sup>19</sup> y aunque requieran condiciones de síntesis más drásticas son en la actualidad los más utilizados. No obstante, la dificultad para internalizar estos sistemas *in vivo* y el bajo nivel de discriminación de su citotoxicidad, son los dos grandes aspectos que obstaculizan la evaluación antiproliferativa de estos compuestos de coordinación y su posterior uso quimioterapéutico.

<sup>14</sup> Compuesto que es metabolizado en un derivado farmacológicamente activo una vez es administrado al paciente; requiere, por tanto, de un paso previo en el interior celular para su activación. Esto puede incluir, por ejemplo, procesos redox o de intercambio de ligando.

<sup>15</sup> (a) A.C. Komor, J.K. Barton, *Chem. Comm.*, **2013**, 49, 3617-3630. (b) M.J. Cleare, *Coord. Chem. Rev.*, **1974**, 12, 349-405. (c) E. Alessio, Z. Guo, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 1539-1540.

<sup>16</sup> R. Jan. *Eur. J. of Inorg. Chem.*, **2009**, 1303-1312;

<sup>17</sup> (a) A.D. Richards, A. Rodger, *Chemical Society Reviews*, **2007**, 36, 471-483. (b) A. Terenzi, M. Fanelli, G. Ambrosi, S. Amatori, V. Fusi, L. Giorgi, V. Turco, G. Barone. *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 4389-4395. (c) K.L. Haas, K.J. Franz. *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 4921-4960. (d) P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2008**, 12. (e) M. Soler, L. Feliu, M. Planas, X. Ribas, M. Costas, *Dalton Trans.*, **2016**, 45, 12970-12982.

<sup>18</sup> R.S. Correa, K.M. de Oliveira, F.G. Delolo, A. Alvarez, R. Mocelo, A.M. Plutin, M.R. Cominetti, E.E. Castellano, A.A. Batista. *J. of Inor. Biochem.*, **2015**, 150, 63-71.

<sup>19</sup> (a) R. Wai, D.L. Ma, E.L.M. C. M. Wong, C.M. Che. *Dalton Trans.*, **2007**, 0, 4884-4892. (c) I. Gamba, G. Rama, E. Ortega, J.D. Marechal, J. Martinez, M. Eugenio, M.V. Lopez. *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 11097-11100. (d) S.H. van Rij, P.J. Sadler, *Drug Discovery Today*, **2009**, 14, 1089-1097.

## 2.2. Complejos de rutenio: actividad biológica

El rutenio en su estado de oxidación +2, presenta una serie de propiedades que le confieren un carácter bioinorgánico:

1. Su capacidad de unirse a la transferrina y a la albúmina de la misma forma en que lo hace el Fe(II) en la sangre. Estas proteínas están involucradas en el transporte de hierro por el torrente sanguíneo hasta las células. Además, las células tumorales presentan una mayor apetencia por el hierro, rutenio y otros metales, ya que al multiplicarse a una mayor velocidad requieren una mayor cantidad de estos iones para cumplir sus funciones vitales. Por ello, esta forma de transporte mediante la albúmina supondría un aumento de la selectividad del complejo hacia el interior de las células tumorales.<sup>20</sup>
2. Sus propiedades redox Ru(III)/Ru(II): los complejos de Ru(III) circulan inertes en el torrente sanguíneo hasta que son reducidos a la especie activa de Ru(II). Esto implica que tanto el uso de un complejo de Ru(III) como uno de Ru(II) estables al aire y a las condiciones del plasma sanguíneo son viables, ya que cuando el complejo llega al entorno tumoral, es difícil que se re-oxide a Ru(III) debido a las condiciones reductoras de este medio.<sup>21</sup>
3. Su lenta cinética de intercambio de ligandos: muchos de los complejos activos frente a determinados tumores requieren de una activación previa que, en algunos casos, implica la sustitución de alguno de sus ligandos. Que esta sustitución sea lenta podría justificar que el complejo pueda circular sin ser modificado por el torrente sanguíneo antes de llegar a su objetivo.<sup>22</sup>

<sup>20</sup> C. Allardyce, P. J. Dyson. *Platinum Metals Rev.*, **2001**, 45, 62-69.

<sup>21</sup> (a) M. J. Clarke. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 69-93. (b) C.S. Allardyce, P.J. Dyson. *Platinum Metals Rev.* **2001**, 45, 62-69. (c) L. Messori, P. Orioli, D. Vullo, E. Alessio, E. Iengo. *Eur J Biochem.* **2000**, 267, 1206-1213.

<sup>22</sup> (a) J. Reedijk. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 236-240. (b) J. Reedijk. *PNAS.* **2003**, 100, 3611-3616. (c) E.S. Antonarakis, A. Emadi. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, 66, 1-9.

Se sospecha que los complejos de rutenio presentan un mecanismo frente al ADN diferente a los de platino. Asimismo, mientras los complejos de Pt(II) adoptan una estructura plano cuadrada, los de Ru(II) presentan una estructura octaédrica y pseudo-octaédrica; no obstante, y bajo un punto de vista del mecanismo de intercambio de ligando, en ambos casos se describe un compuesto intermedio pentacoordinado.<sup>20,23</sup>

Actualmente, existen tres complejos de rutenio que han sido testados clínicamente (Figura 8): el imidazol [*trans*-imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenato] ( $H_2im[trans-RuCl_4(DMSO)Him]$ ), conocido como NAMI-A; el indazol [*trans*-tetraclorobis(1H-indazol)rutenato(III)] ( $H_2in[trans-RuCl_4(Hin)_2]$ ), conocido como KP1019 y la sal sódica del indazol, conocido como NKP-1339.<sup>24</sup>

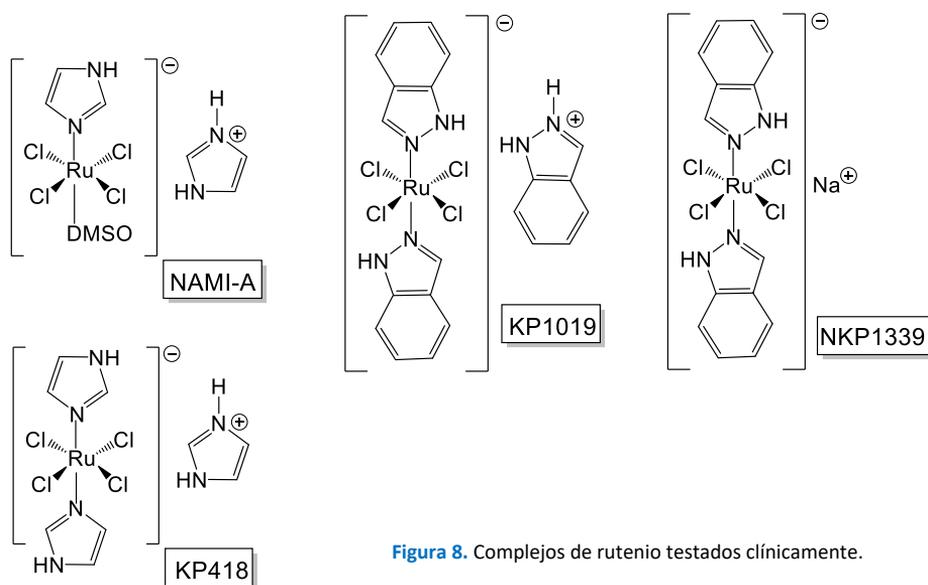


Figura 8. Complejos de rutenio testados clínicamente.

<sup>23</sup> Los complejos planos cuadrados de Pt(II) tienden a intercambiar sus ligandos mediante un mecanismo asociativo, en el cual el ligando entrante forma una especie intermedia pentacoordinada antes de liberar al ligando saliente. Por otro lado, los complejos de Ru(II) siguen un mecanismo de intercambio de ligandos de tipo disociativo, en el cual, primero se libera al ligando saliente dando lugar a la especie intermedia pentacoordinada antes de aceptar al ligando entrante.

<sup>24</sup> P. Zhang, P. J. Sadler. Eur. J. Inorg. Chem. 2017, 1541–1548.

El NAMI-A fue el primer compuesto de coordinación no platinado y considerado como pro fármaco debido a su propiedad antiproliferativa frente al cáncer de pulmón NSCLC (Non Small Cell Lung Carcinoma) y en combinación con la gemcitabina.<sup>25</sup> Bajo un punto de vista de la Química de la Coordinación, este complejo en disolución se activa por un mecanismo de intercambio disociativo fuertemente limitado por el pH del medio. De hecho, a pH 7.4 el mecanismo deriva hacia un intercambio  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Cl}^-$ , neutralizándose la carga de la molécula. Por el contrario, a pH inferior ( $3.0 \leq \text{pH} \leq 5.0$ ) el mecanismo deriva hacia un intercambio del  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{imidazol}$ .<sup>26</sup> Se sospecha que la mayor actividad antiproliferativa es consecuencia de la formación del complejo di-aquo debido a la posibilidad de que se produzca un segundo mecanismo de intercambio disociativo entre otro ligando  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Cl}^-$ .<sup>27</sup> A diferencia del cisplatino, el NAMI-A no inhibe el crecimiento del tumor primario, si no que su actividad principal implica la disminución de la velocidad a la que se produce la metástasis.<sup>28</sup> Además, tanto su mecanismo de acción como sus niveles citotóxicos difieren de los del cisplatino debido a las débiles interacciones que tiene frente al ADN. Por el contrario, manifiesta enlaces fuertes con las proteínas del suero sanguíneo, aumentando la distribución mediada por la transferrina para un transporte más efectivo hacia las células tumorales. Desafortunadamente y tras años de pruebas, este pro fármaco no ha superado las fases I y II de los ensayos clínicos.<sup>29</sup>

---

<sup>25</sup> Los primeros artículos que describen propiedades anticancerígenas de otros complejos de rutenio diferentes, se remontan a 1992. Se trata, por tanto, de compuestos predecesores al NAMI-A: e.g. sobre 1991: *mer-RuCl<sub>3</sub>(dmsO)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)*, investigado inicialmente, patentado en 1989, pero desechado clínicamente.

<sup>26</sup> G. Sava, A. Bergamo, S. Zorzet, B. Gava, C. Casarsa, M. Cocchietto, A. Furlani, V. Scarzia, B. Serli, E. Iengo, E. Alessio, G. Mestroni. *Eur. J. of Cancer*. **2002**, 38, 427–435.

<sup>27</sup> Aldrik H. Velders, A. Bergamo, E. Alessio, E. Zangrando, J. G. Haasnoot, C. Casarsa, M. Cocchietto, S. Zorzet, G. Sava. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1110-1121.

<sup>28</sup> G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. DiGiovine, G. Pezzoni, L. Sartor, S. Garbisa. *Clin. Cáncer Res.* **2003**, 9, 1898 –1905.

<sup>29</sup> S. Leijen, S. A. Burgers, P. Baas et al. *Invest New Drugs*, **2015**, 33, 201-214.

De hecho, en la fase I, los niveles de fármaco tolerados por los pacientes no podían completar los ciclos de 28 días preestablecidos.<sup>30</sup> La progresiva disminución de neutrófilos en los pacientes fue el principal motivo por el que se redujeron los ensayos clínicos a 21 días. Estadísticamente y sobre una población de 15 pacientes estudiados, sólo 9 manifestaron una clara estabilización de la enfermedad (60%), mientras que los 6 restantes (40%) mostraron una evolución continuada del tumor. Durante la fase II se estudió el llamado “escalado de fármaco”, en el que se aumentó la dosis de 300 mg/m<sup>2</sup>·día a 450 mg/m<sup>2</sup>·día. Sólo uno de los pacientes tratados experimentó una reducción del tumor, siendo esto insuficiente como para ampliar el tratamiento a 27 pacientes, así que se concluyó que no superaba los ensayos necesarios como para pasar a la fase III del estudio.<sup>31</sup> Resultados similares se encontraron con su homólogo KP418, una de sus variantes, donde el ligando DMSO ha sido sustituido por un segundo ligando imidazol.

El KP1019, es una molécula de estructura octaédrica con dos N-dadores indazol en la posición *trans* y cuatro ligandos cloruros en el plano ecuatorial. Por un lado, su baja solubilidad en agua dificulta su transporte por el torrente sanguíneo, pero, por otro lado, sus ligandos cloruros favorecen las reacciones de hidrólisis de la misma forma en que ocurre con el cisplatino y el NAMI-A. Mientras que los ensayos *in vitro* muestran que este pro fármaco presenta citotoxicidad frente a líneas celulares de cáncer colorrectal (SW480 y HT29) por inducción a la apoptosis celular;<sup>32</sup> los estudios *in vivo* en tumores colorrectales en ratas muestran que su eficacia era mejor que la del 5-fluorouracilo (5-FU), empleado actualmente en este tipo de cánceres. El KP1019, al igual que el NAMI-A, es capaz de enlazarse fuertemente a la transferrina mediante su centro activo de hierro, por lo que la actividad se fundamenta principalmente con el transporte mediado por esta proteína.

---

<sup>30</sup> Normalmente la dosis de cisplatino para cáncer de pulmón se estima entre los 60 y 80 mg/m<sup>2</sup> intravenosa por día; de 80-120 mg/m<sup>2</sup> entre 1 a 3 días cada tres semanas: The Chemotherapy Source Book, 4ª Ed.; by M.C. Perry; Wolters Kluwer, ISBN: 10:0-7817-7328-8, 2008, pág. 345.

<sup>31</sup> E. Alessio. Eur. J. Inorg. Chem. **2017**, 12, 1549–1560.

<sup>32</sup> S.Kapitza, M. Pongratz, M. A. Jakupec, P. Heffeter, W. Berger, L. Lackinger, B.K. Keppler, B. Marian. J. Cancer Res. Clin. Oncol. **2005**, 131, 101-110.

Actualmente se sigue intentando esclarecer su mecanismo de acción. De hecho, recientes trabajos han estudiado la interacción del KP1019 con una amplia variedad de histonas<sup>33</sup> que tienen mutaciones en la cola terminal.<sup>34</sup> Se demostró que el KP1019 inhibe el crecimiento de las células eucariotas mediante la evacuación de las histonas de la cromatina, lo cual produce imperfecciones y roturas en el ADN. Finalmente, el NKP1339 es una variante del KP1019 donde el catión imidazolium ha sido sustituido por el ion sodio. A diferencia del cisplatino y otros complejos de Ru, esta familia de compuestos (Ru-KP) no interactúan directamente sobre el ADN, sino que enlaza a las proteínas del interior celular.<sup>35</sup> Esta facilidad de reaccionar con las proteínas permite al NKP1339 ser transportado con mayor selectividad a las células tumorales mediante la transferrina y la albúmina,<sup>36</sup> debido a la alta demanda de hierro de las células cancerígenas.<sup>37</sup> Además, a diferencia del NAMI-A, estos complejos pueden administrarse en dosis mayores debido a sus menores efectos citotóxicos.<sup>38</sup>

---

<sup>33</sup> un tipo de proteínas básicas de bajo peso molecular.

<sup>34</sup> V. Singh, G. Kumar Azad, P. Mandal, M. Amarendar Reddy, R. S. Tomar. *FEBS Letters*. **2014**, 588, 1044-1052.

<sup>35</sup> (a) P. Heffeter, K. Böck, B. Atil, M. A. Reza Hoda, W. Körner, C. Bartel, U. Jungwirth, B. K. Keppler, M. Micksche, W. Berger, G. Koellensperger. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, 15, 737–748. (b) M. Groessel, O. Zava, P. J. Dyson. *Metallomics*. **2011**, 3, 591–599.

<sup>36</sup> (a) F. Kratz, B. K. Keppler, M. Hartmann, L. Messori, M. R. Berger. *Met. Based Drugs*, **1996**, 3, 15–23. (b) M. Sulyok, S. Hann, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, G. Stingeder, G. Koellensperger. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2005**, 20, 856-863.

<sup>37</sup> F. Kratz, B. Elsadek. *J. Controlled Release*, **2011**, 161, 1–16.

<sup>38</sup> R. Trondl, P. Heffeter, C. R. Kowol, M. A. Jakupec, W. Berger, B. K. Keppler. *Chem. Sci.*, **2014**, 5, 2925-2932.





# 3. Justificación de la unidad temática

---



## Justificación de la unidad temática.

Los diferentes equilibrios hidrofílico/lipofílico son esenciales para el comportamiento *in vivo* y la eficacia de un complejo metálico bajo condiciones fisiológicas: debe ser suficientemente soluble en agua ya que es el principal componente de los fluidos fisiológicos, pero también en medios orgánicos para pasar a través de la membrana celular.

Se ha observado que la combinación de ligandos fosfanos, arenos, arilos y el ciclopentadienilo contribuyen, no sólo a optimizar este tipo de equilibrios en los complejos de metales que están principalmente en la 2ª y 3ª series de transición, sino a regular las propiedades redox y los factores estéricos (Figura 9).<sup>15c,31,39</sup>

De hecho, el carácter lipofílico tiene un papel determinante tanto en el transporte pasivo del compuesto al interior celular,<sup>40</sup> como en la acumulación de complejo en los orgánulos celulares. Sin embargo, el mecanismo por el cual el carácter lipofílico influye en el aumento de la citotoxicidad de los complejos está aún por determinar. Asimismo, existen numerosos mecanismos metabólicos intracelulares mediados por intercambios de electrones; lo que hace pensar en la posibilidad de que un compuesto sea capaz de intercambiar electrones con componentes de la célula cancerígena, siendo posiblemente éste un factor determinante en su actividad antiproliferativa. Este hecho, ha sido observado en combinación con enzimas redox purificadas.<sup>41</sup>



Figura 9. Representación esquemática de los factores fisicoquímicos implicados en la actividad biológica de

<sup>39</sup> C. Gaiddon, M. Pfeffer. Eur. J. Inorg. Chem. **2017**, 1639–1654.

<sup>40</sup> M. Klajner, C. Licon, L. Fetzer, P. Hebraud, G. Mellitzer, M. Pfeffer, S. Harlepp, C. Gaiddon. Inorg. Chem. **2014**, 53, 5150–5158.

<sup>41</sup> H. R. Bautista, R. O. S. Díaz, L. Q. Shen, C. Orvain, C. Gaiddon, R. Le Lagadec, A. D. Ryabov. J. Inorg. Biochem., **2016**, 163, 28–38.

### 3. Justificación de la unidad temática.

Del mismo modo, los factores estéricos juegan un papel fundamental en la actividad antitumoral de los compuestos. Diversos Grupos de Investigación han demostrado<sup>42</sup> que los compuestos con ligandos aromáticos son capaces de intercalarse entre las cadenas de ADN incrementando de forma sinérgica su citotoxicidad.<sup>43</sup>

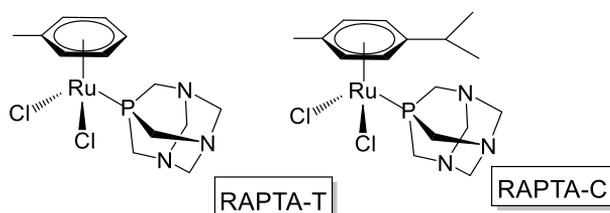


Figura 10. Compuestos RAPTA: nuevos prototipos de complejos Ru-areno con evaluación biológica.

En el caso del Ru(II), se ha descrito una familia de compuestos del tipo  $[[\text{RuL}(\eta^6\text{-areno})(1\kappa\text{P-PTA})]]$  ( $\text{L} = \text{Cl}, \text{PTA}, \text{PPh}_3, \text{oxalato}$ ), conocidos genéricamente como RAPTA (Figura 10).<sup>44</sup> Además de su baja citotoxicidad, en comparación con el cisplatino, los estudios realizados con ADN comercial (calf thymus), sugieren que el RAPTA-C se enlaza a la molécula de ADN fijándola y aumentando el punto de fusión del aducto ADN - RAPTA-C. No obstante, a pesar de no mostrar un enlace selectivo frente al ADN *in vitro*, sí son capaces de interactuar con las histonas,<sup>33</sup> así como con el ARN del medio intracelular.

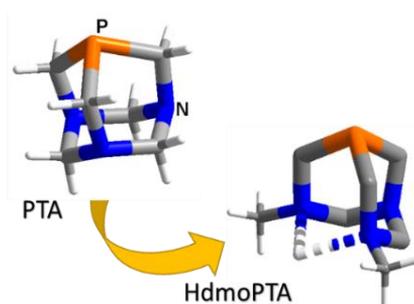
<sup>42</sup> B.M. Zeglis, V.C. Pierre, J.K. Barton. Chem. Commun., **2007**, 44, 4565-4579.

<sup>43</sup> H. K. Liu, P. J. Sadler. Acc. Chem. Res., **2011**, 44, 349-359.

<sup>44</sup> F. Scalambra, P. Lorenzo, I. de los Ríos, A. Romerosa. Eur. J. Inorg. Chem., **2019**, 1529-1538.

### 3. Justificación de la unidad temática.

En el año 2007, se sintetizó en nuestro Grupo de Investigación el ligando 3,7-H-3,7-dimetil-1,3,7-triaza-5-fosfabiciclo[3.3.1]-nonano (HdmoPTA, [Figura 11](#)), un derivado del PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano).<sup>45</sup> Ambos han mostrado ser excelentes ligandos que estabilizan el estado de oxidación +2 en el átomo de Ru y proporcionan un balance hidrofílico/hidrofóbico adecuado al complejo. Son estables, fáciles de preparar y solubles en agua y disolventes orgánicos.



[Figura 11](#). Ligandos PTA y HdmoPTA

A partir de este resultado, se sintetizaron y caracterizaron dos familias de complejos bimetalicos  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-M}^{\text{II}}(\text{acac-}\kappa^2\text{O,O}')^2]$ ;  $\text{M}^{\text{II}} = \text{Co, Ni, Zn}$  y  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-M}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$ ;  $\text{M}^{\text{II}} = \text{Ni, Zn}$ ; a partir del complejo monomérico  $[\text{RuClCp}(\text{HdmoPTA})(\text{PPh}_3)]^+$  y cuyas propiedades antiproliferativas fueron estudiadas ([Figura 12](#)).<sup>46</sup>

<sup>45</sup> A. Mena, P. Lorenzo, A. Romerosa, M. Saoud, M. Serrano. *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 6120–6128.

<sup>46</sup> (a) A. Mena, P. Lorenzo, A. Romerosa, M. Serrano. *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 2246–2248; (b) A. Mena, P. Lorenzo, V. Passarelli, A. Romerosa, M. Serrano. *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 3237–3244. (c) *Bioorg. & Medicinal Chem. Lett.*, **2011**, 21, 4568–4571; (d) M. Serrano, L. M. Aguilera, P. Lorenzo, J. M. Padrón, A. Romerosa. *Dalton Trans.*, **2013**, 42, 11212–11219.

### 3. Justificación de la unidad temática.

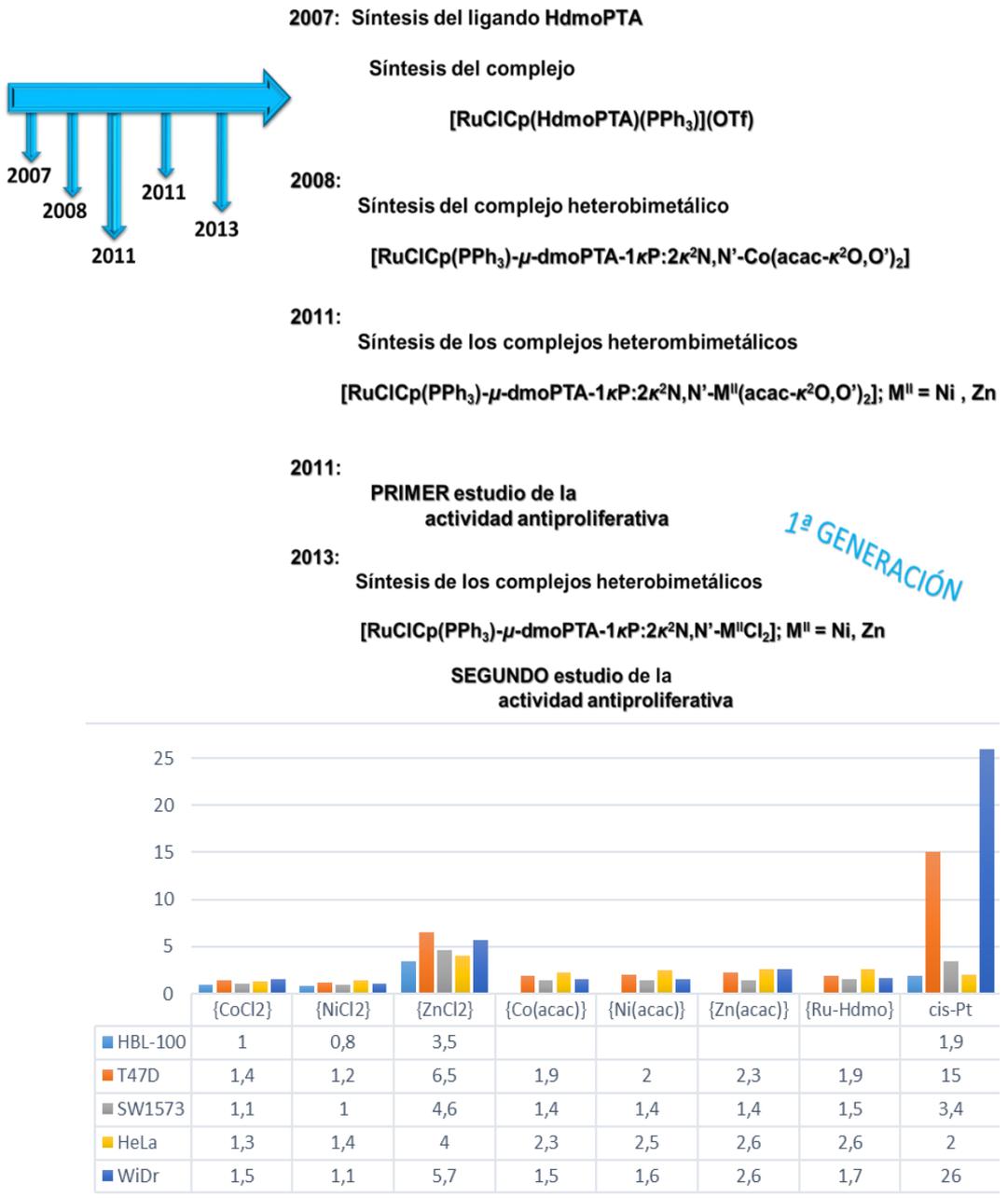


Figura 12. Evolución de la Investigación del Grupo durante el período 2007-2013

### 3. Justificación de la unidad temática.

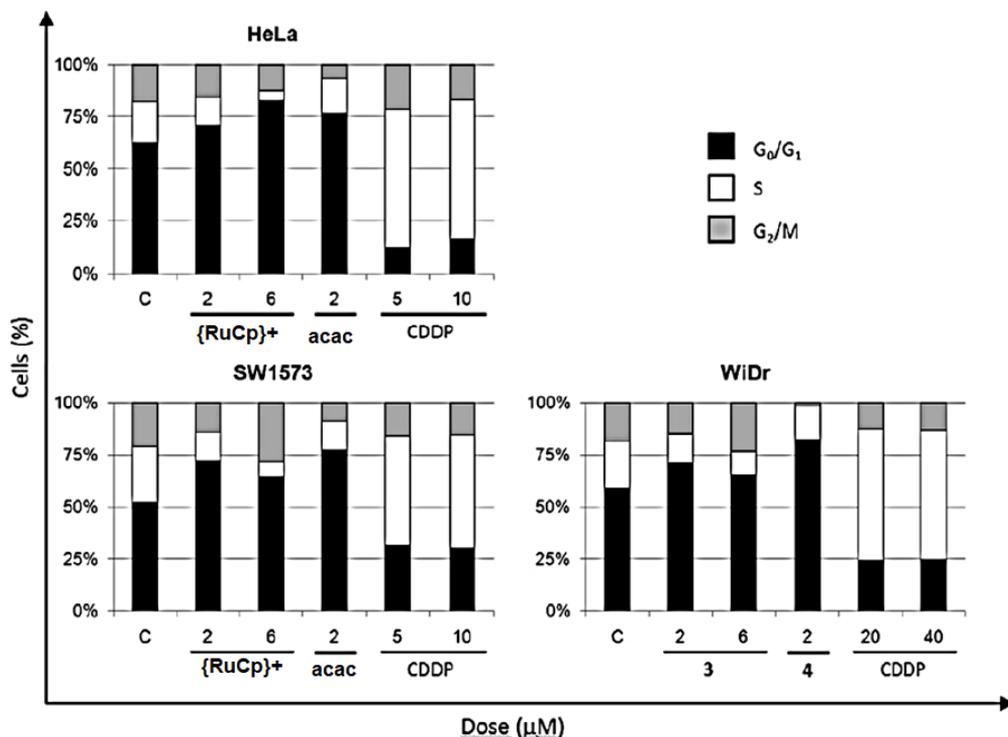


Figura 13. Distribución de fases del ciclo celular de células no tratadas (C) y células tratadas con complejos  $[(RuClCp(HdmoPTA)(PPh_3))^+]$  y  $\{[M(acac-\kappa^2O,-O')_2]; M = Co, Ni, Zn \text{ columnas}\}$  y cisplatino (CDDP) durante 24 h.

Los complejos obtenidos inicialmente mostraban valores de  $GI_{50}$  comprendidos entre 1,1 y 2,6  $\mu M$ , lo cual suponía una mejoría significativa frente a los valores estudiados para el cisplatino: 2,0 y 26  $\mu M$  (Figura 12). Estos resultados mostraban Además, se observó que la actividad tenía lugar durante la fase celular G<sub>1</sub>, por lo que se pudo concluir que estos complejos actuaban mediante un mecanismo de acción antitumoral diferente al descrito para el cisplatino (Figura 13).

No obstante, existía la duda de si un mejor balance lipofílico/lipofóbico podría mejorar la actividad antiproliferativa observada en estos compuestos, lo cual exige mantener la misma estructura básica, pero con aquellos ligandos que permitan conseguir el balance de solubilidad deseado.



# 4. Objetivos

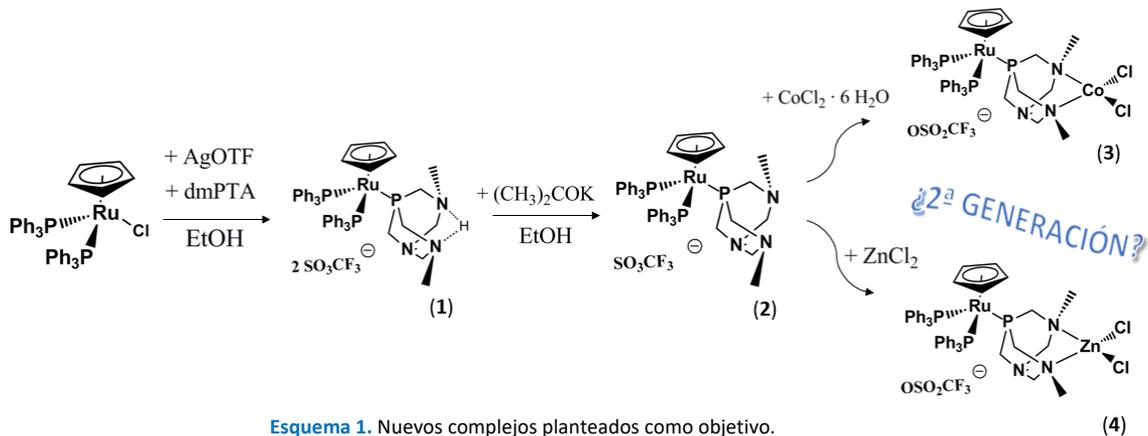
---



## Objetivos.

La presente tesis doctoral, tiene como objetivo principal el dar respuesta a si, mediante una mejora en el balance lipofílico / lipofóbico, es posible mejorar la actividad antiproliferativa de los compuestos metálicos con los ligandos (HdmoPTA)<sup>+</sup> y dmoPTA, y en particular aquellos que han sido obtenidos hasta ahora por nuestro grupo de investigación (Figura 12).

Para ello, se planteó como primer objetivo sustituir el ligando Cl<sup>-</sup> en la unidad compleja [RuCp(Cl)(HdmoPTA)(PPh<sub>3</sub>)]<sup>+</sup> por uno más lipofílico como la trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>), que se consideró como el primer candidato. Este ligando es muy soluble en disolventes orgánicos y prácticamente insoluble en agua, por lo que aportaría lipoficidad a la molécula compleja que constituyera. Por otra parte, el átomo de fósforo es activo en RMN y, por lo tanto, el compuesto metálico en donde esté coordinado, por lo que su propio comportamiento puede estudiarse mediante <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR.



Como segundo objetivo, se plantea comprobar si, pese a las modificaciones introducidas en la esfera de coordinación del átomo de Ru(II), la coordinación de un metal a los átomos de N del ligando dmoPTA sigue ocasionando un incremento en la actividad antiproliferativa respecto al complejo monomérico de rutenio de partida tal y como se había observado con los complejos [RuCpCl(L)(PPh<sub>3</sub>)]<sup>n+</sup> (L = HdmoPTA,

#### 4. Objetivos

$n=1+$ ;  $L = \text{dmoPTA}$ ,  $n=0$ ). Para ello, y con un fin comparativo, se diseñaron vías sintéticas para obtener nuevos complejos bimetálicos Ru-Co y Ru-Zn en donde el átomo de Ru(II) estuviera ligado al átomo de P del ligando dmoPTA, mientras que los otros átomos metálicos estuvieran coordinados a los átomos de nitrógeno  $\text{N}_{\text{CH}_3}$  de dicho ligando ([Esquema 1](#)).





# 5. Trabajo experimental

---



## 5.1. Métodos.

Para desarrollar el [Esquema 1](#) planteado como objetivo de esta investigación, seguimos cuidadosamente las técnicas Schlenk descritas en la bibliografía.

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron comerciales (Aldrich, Scharlab y Acros Organics).<sup>47</sup>

El complejo de partida [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], el ligando PTA y derivados dmPTA y dmoPTA, fueron sintetizados reproduciendo los métodos descritos en la bibliografía.<sup>48</sup>

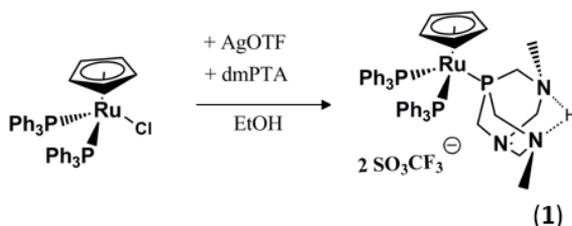
Todas las reacciones han sido seguidas en disolución y caracterizadas por RMN de: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}, <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}; <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C HMBC, y <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C HSQC.<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}}, utilizando los equipos: AVANCE 500 que opera a 500,13 MHz (<sup>1</sup>H), 202,46 MHz (<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}}), y 125,76 MHz (<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}}) para baja temperatura; un BRUKER DRX300 que opera a 300,13 MHz (<sup>1</sup>H), 121,49 MHz (<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}}) y a 75,47 MHz (<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}}); y un BRUKER DRX400 que trabaja a 400,13 MHz (<sup>1</sup>H), 161,98 MHz (<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}}) y 100,04 MHz (<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}}) para las medidas de estabilidad. Para la caracterización en estado sólido, se utilizó un Thermo Nicolet modelo avatar 360FT-IR y en un Bruker Vertex 70; en pastillas de KBr. El análisis elemental fue llevado a cabo en un Fisons Instrument modelo EA 1108. Finalmente, las muestras cristalinas fueron estudiadas por difracción de RX en monocristal usando un BRUKER APEX-II CCD en el rango de  $0,963 \leq 2\theta \leq 26,80$  con fuentes de radiación Mo-K $\alpha$ ,  $\lambda = 0,7107 \text{ \AA}$  y/o Cu-K $\alpha$ ,  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ .

<sup>47</sup> Purification of Laboratory Chemicals. Wilfred L.F. Armarego.

<sup>48</sup> A) A. Mena, P. Lorenzo, A. Romerosa, M. Saoud, M. Serrano. *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 6120-6128. B) D. J. Daigle, A. B. Pepperman Jr., S. L. Vail, J. Heterocycl. Chem., **1974**, 17, 407. C) D. N. Akbayeva, L. Gonslavi, W. Oberhauser, M. Peruzzini, F. Vizza, P. Brüggeller, A. Romerosa, G. Sava, A. Bergamo, *Chem. Commun.* **2003**, 0, 264-265.

## 5.2. Síntesis de nuevos complejos.

Para la síntesis del complejo  $[\text{RuCp}(\text{HdmoPTA})(\text{PPh}_3)_2](\text{SO}_3\text{CF}_3)_2$  (**1**), se añadió un equivalente de  $\text{Ag}(\text{SO}_3\text{CF}_3)$  (0,123 g, 0,479 mmol) a una disolución de  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)_2]$  (0,301 g, 0,421 mmol) previamente disuelto en 30 ml de etanol seco y desoxigenado. Tras filtrar el  $\text{AgCl}$  precipitado, se añadió un equivalente de  $\text{dmPTA}$  (0,209 g, 0,437 mmol) a la disolución y se reflujo durante 2 h. La disolución resultante experimentó un cambio de color de naranja/rojizo a amarillo y se concentró al rotavapor hasta 5 mL restantes. Finalmente, se obtuvieron cristales amarillos tras añadir 5 mL de dietil éter y dejarlo evaporar a temperatura ambiente durante dos días. Los cristales obtenidos se corresponden con una estructura monoclinica en la que un átomo de H se encuentra situado entre los dos N del  $\text{dmPTA}$ .



Esquema 2. Síntesis de 1.

Datos: Rendimiento: 46,0%; es poco soluble en agua ( $S_{25\text{H}_2\text{O}} \leq 0,2$  mg/mL); y soluble en multitud de disolventes orgánicos como etanol ( $S_{25\text{EtOH}} > 80$  mg/mL); y cloroformo ( $S_{25\text{CHCl}_3} = 21,5$  mg/mL). La caracterización de este complejo se realizó en cloroformo deuterado.

## 5. Trabajo experimental

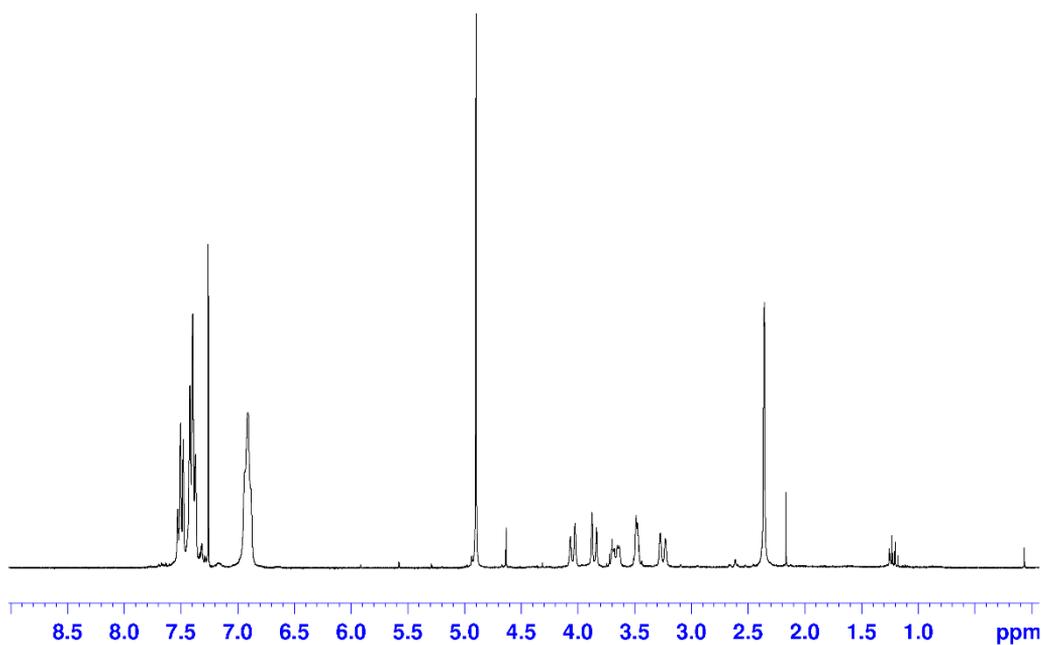


Figura 14. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de **1** en  $\text{CDCl}_3$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

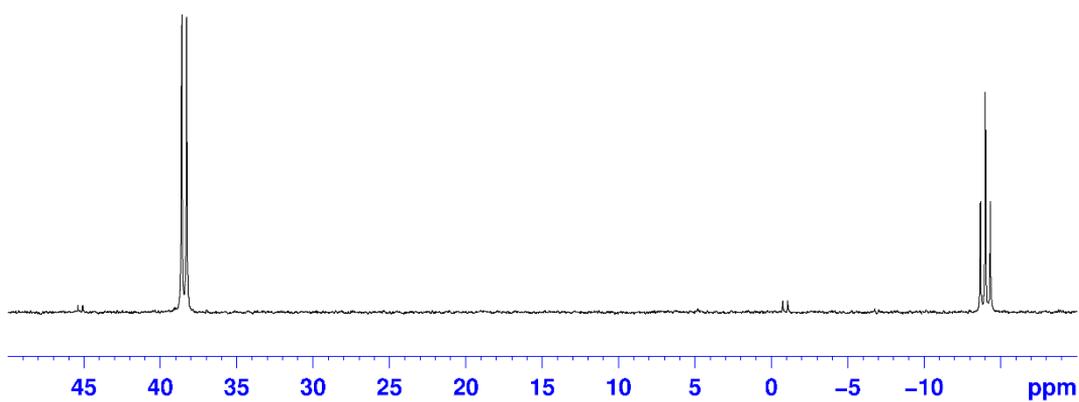
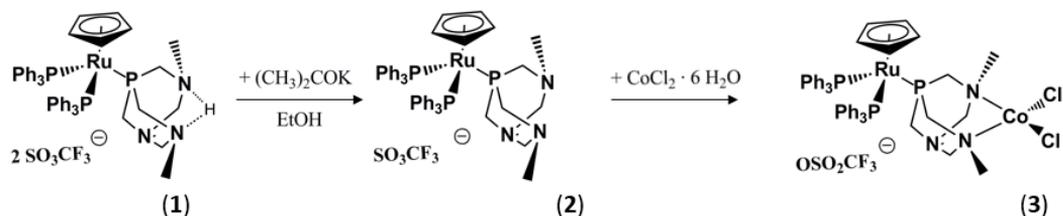


Figura 15. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **1** en  $\text{CDCl}_3$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

La síntesis del complejo bimetálico  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2-\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P}:2\kappa^2\text{N,N}'\text{-CoCl}_2](\text{OTf})\cdot 0,25\text{H}_2\text{O}$  (**3**) comienza con la previa desprotonación de **1** y posteriormente obtener el complejo monometálico  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{dmoPTA-1}\kappa\text{P})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$  (**2**) (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis de 2 y 3.

A un matraz Schlenk en el que previamente se ha disuelto **1** (0,095 g, 0,083 mmol) en etanol destilado y desoxigenado, se añade un equivalente de KO-t-but (0,010 g, 0,090 mmol). Cuando el KO-t-but se ha disuelto completamente, se añade un equivalente de  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . La reacción permanece en agitación y a temperatura ambiente durante 15 minutos hasta que se observa un cambio de color de amarillo a azul/verdoso propio del cobalto. La disolución resultante se concentra al rotavapor hasta reducirlo a 5 mL y se filtra por gravedad para eliminar las partículas de producto que puedan quedar en suspensión. Finalmente, se deja cristalizar bajo una corriente de  $\text{N}_2$  durante varios días.

Datos: Rendimiento: 40,18%; es poco soluble en agua ( $S_{25\text{H}_2\text{O}} < 0,5$  mg/mL); y soluble en multitud de disolventes orgánicos como etanol ( $S_{25\text{EtOH}} = 12,3$  mg/mL), y cloroformo ( $S_{25\text{CHCl}_3} > 97,3$  mg/mL). La caracterización de este complejo se realizó en cloroformo deuterado.

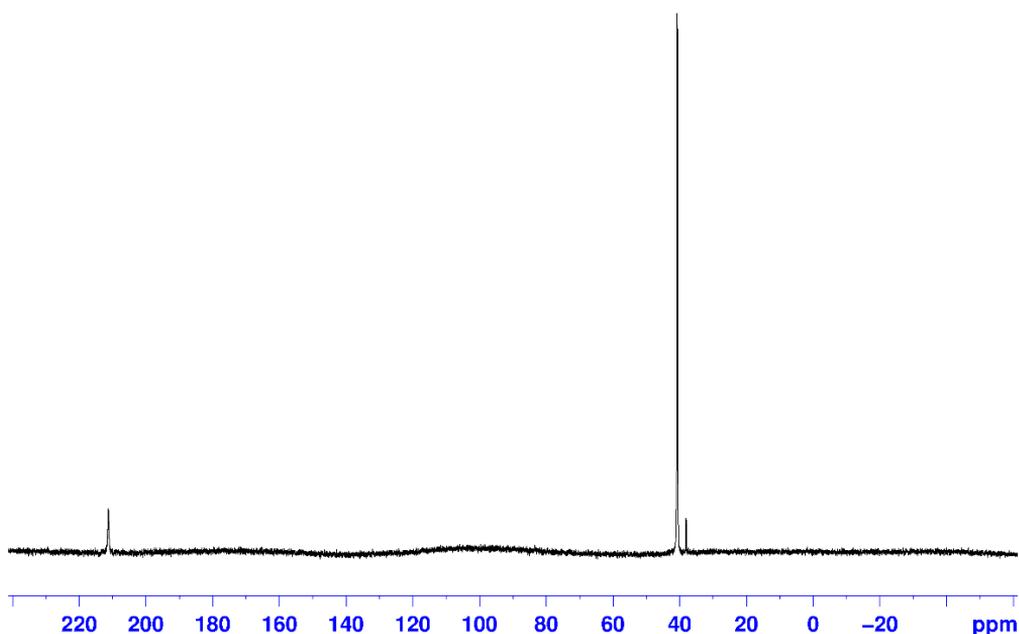
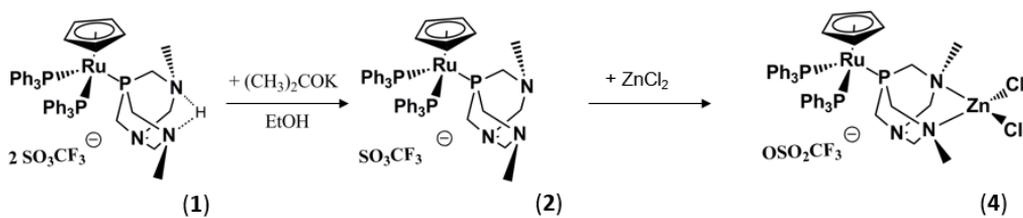


Figura 16. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **3** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

La síntesis del complejo bimetalico  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N}'\text{-ZnCl}_2](\text{OTf})\cdot 0,25\text{H}_2\text{O}$  (**4**) comienza con la obtención del complejo **2** (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis de **4**.

Esta nueva ruta de síntesis requiere generar previamente el complejo **2**. Para ello, se añade un equivalente de KO-t-but (0,100 g, 0,086 mmol) a un matraz de Schlenk en el que ya se encuentra disuelto **1** (0,095 g, 0,083

mmol) en THF desoxigenado. Cuando el KO-t-but se ha disuelto completamente, el matraz se lleva a total sequedad y el polvo resultante se redisuelve en  $\text{CHCl}_3$ . Esta disolución se filtra para eliminar el precipitado de KOTf y, posteriormente, se concentra al rotavapor. Por último, el producto final es precipitado con éter, filtrado por gravedad y lavado con una disolución fría de THF/éter 1:3. Se obtuvo 0,049 g (0,042 mmol) de producto.

Datos: Rendimiento de un 50,6%; es poco soluble en agua ( $S_{25\text{H}_2\text{O}} = 0,5$  mg/mL); y soluble en multitud de disolventes orgánicos. La caracterización de este complejo se realizó en cloroformo deuterado.

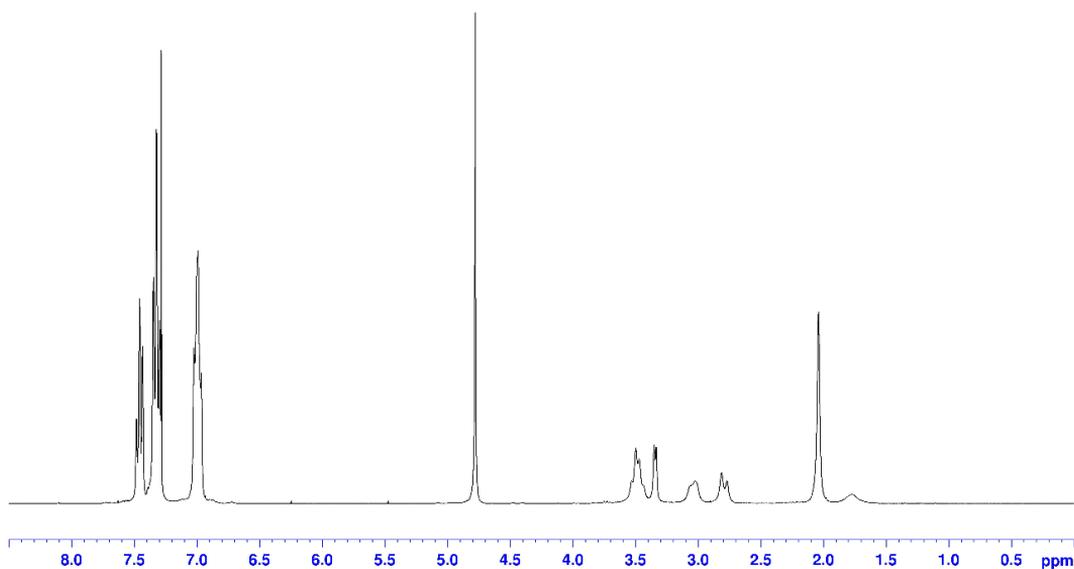


Figura 17. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de **2** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C

## 5. Trabajo experimental

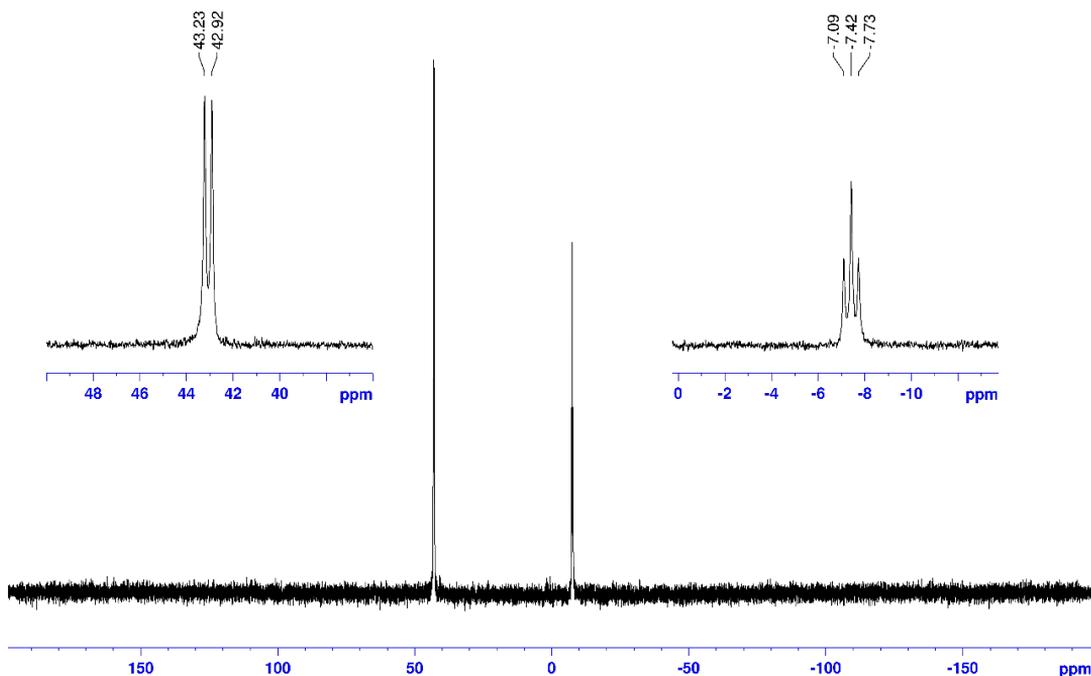


Figura 18. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **2** en  $\text{CDCl}_3$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

Finalmente, a una disolución de **2** (0,098 g, 0,084 mmol) previamente disuelto en 30 mL de etanol desoxigenado, se añade un equivalente de  $\text{ZnCl}_2$  (0,012 g, 0,088 mmol). La reacción permanece en agitación y a temperatura ambiente durante 15 minutos. La disolución resultante se concentra al rotavapor y se deja cristalizar a temperatura ambiente durante varios días.

Datos: Rendimiento: 53,1%; es poco soluble en agua ( $S_{25\text{H}_2\text{O}} = 0,5\text{ mg/mL}$ ); y soluble en multitud de disolventes orgánicos. La caracterización en RMN se realizó en cloroformo deuterado.

## 5. Trabajo experimental

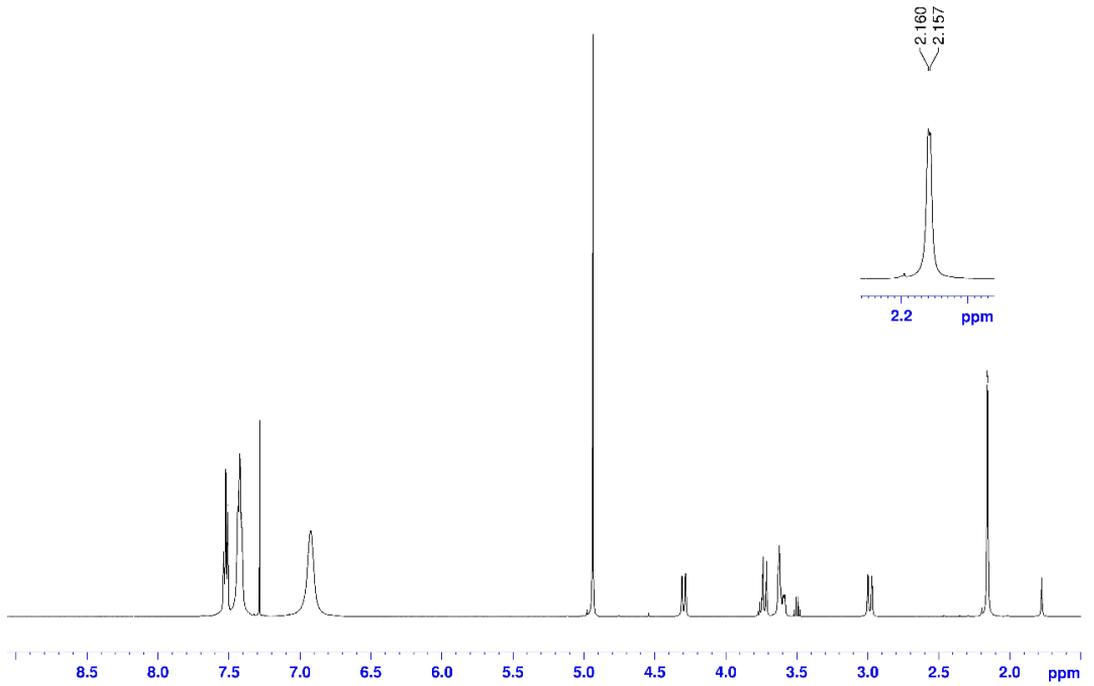


Figura 19. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de 4 en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

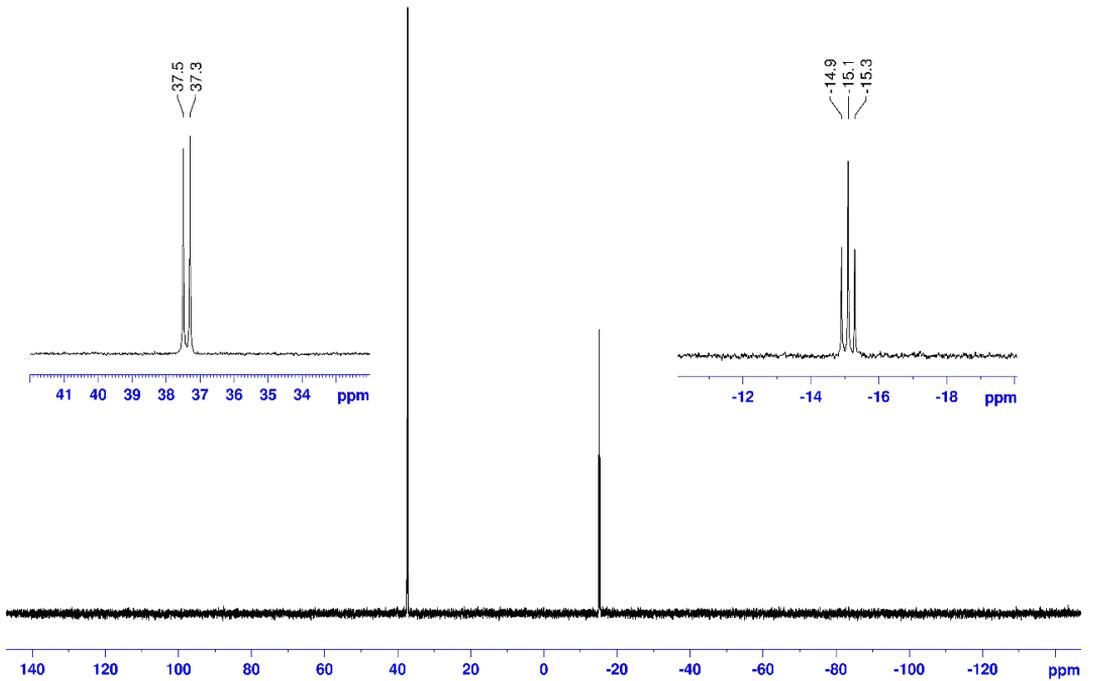


Figura 20. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de 4 en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.





# 6. Resultados y discusión

---



## Resultados y discusión.

### 6.1. Caracterización de los complejos.

La caracterización de los complejos **1**, **2**, **3** y **4** se realizó en cloroformo deuterado, desoxigenado y bajo una atmósfera inerte de N<sub>2</sub>.

El espectro <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} RMN del complejo **1** muestra dos señales características: un triplete a -14,01 ppm y un doblete a 38,44 ppm que se corresponden con el HdmoPTA y las dos PPh<sub>3</sub>, respectivamente. Además, estos desplazamientos químicos son distintos a los encontrados en la bibliografía para **1'** (46,13 ppm – 1,80 ppm).<sup>45</sup>

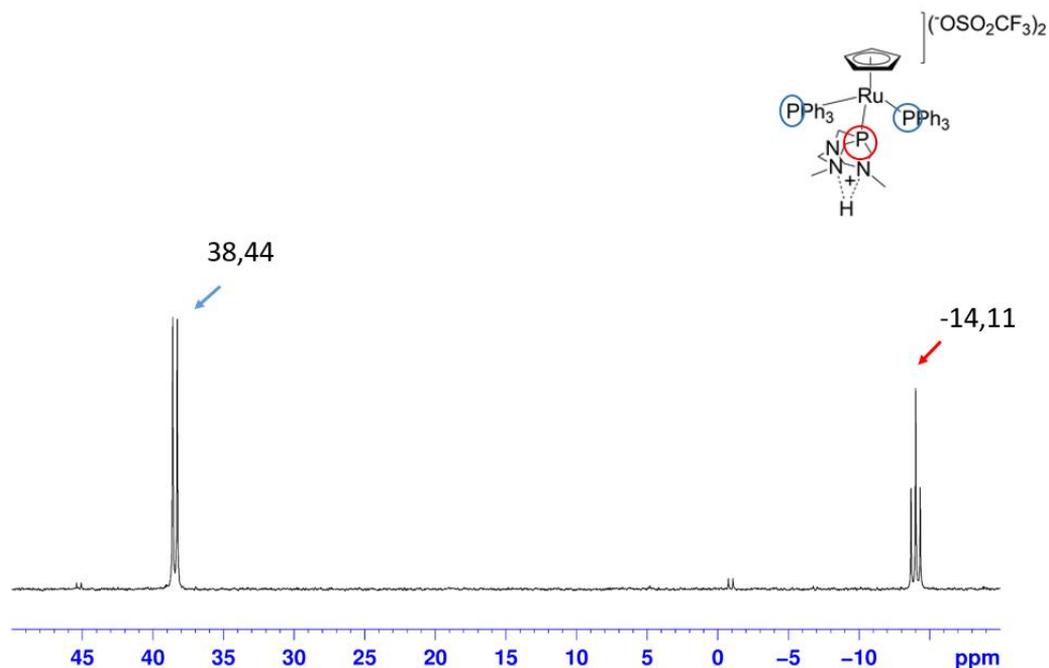


Figura 21. Espectro <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} RMN de **1** en CDCl<sub>3</sub>, 25 °C.

Por otro lado, el espectro <sup>1</sup>H RMN nos muestra una señal única y característica de la presencia del Cp a 4,89 ppm. Del mismo modo, pueden verse un multipletes de 7,53 a 6,91 ppm que integran para 30 H y que

muestra la coordinación de las dos PPh<sub>3</sub> propias de **1**. De 4,07 a 3,23 ppm hay una secuencia de dobletes y multipletes que se corresponden con los 10 H del ligando HdmoPTA. Además, a 2,36 ppm se muestra un singlete (6H) que se identifica con los protones de los grupos metilos de los NCH<sub>3</sub>. Por último, se observa un multiplete a 1,22 ppm (1H) correspondiente al protón puente existente entre los dos átomos de N del HdmoPTA.

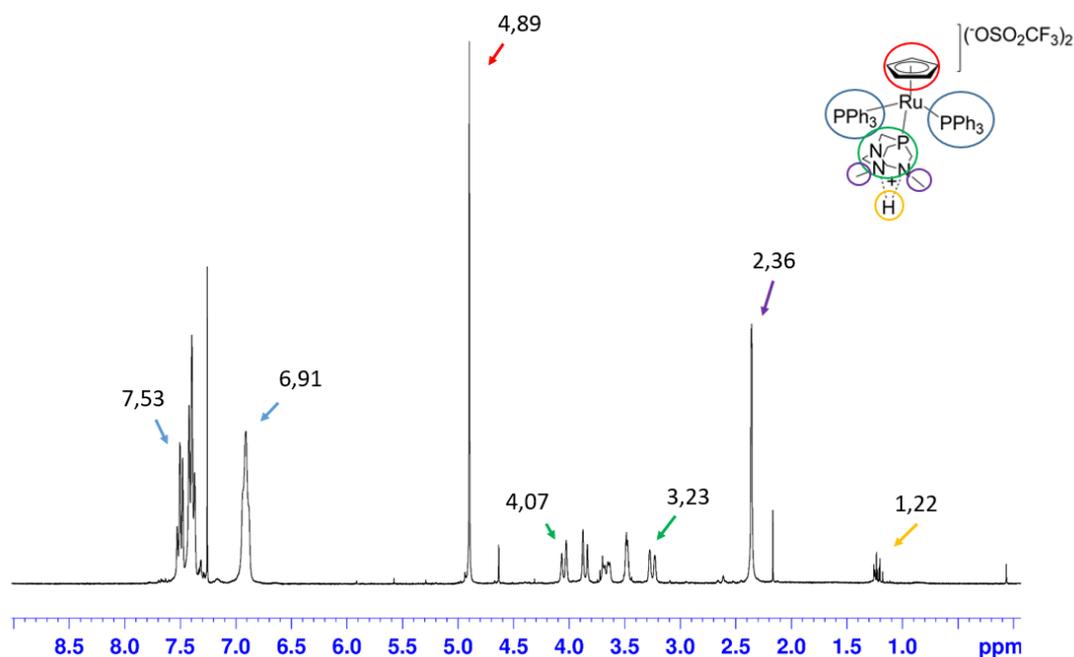


Figura 22. Espectro <sup>1</sup>H RMN de **1** en CDCl<sub>3</sub>, 25 °C.

Finalmente, el espectro <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-2D COSY RMN se midió con el propósito de mostrar la existencia del protón puente entre los átomos de N. En el espectro, se observa claramente el acoplamiento del multiplete correspondiente a dicho protón con las señales identificadas para el dmPTA, lo cual muestra que esta señal no es residual y confirma la existencia de dicho protón.

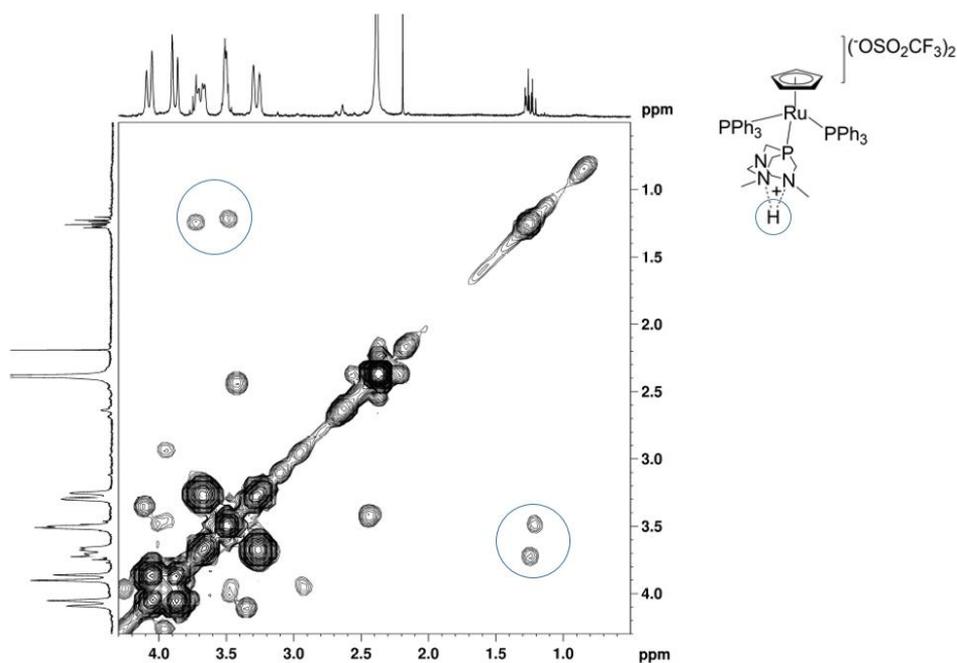


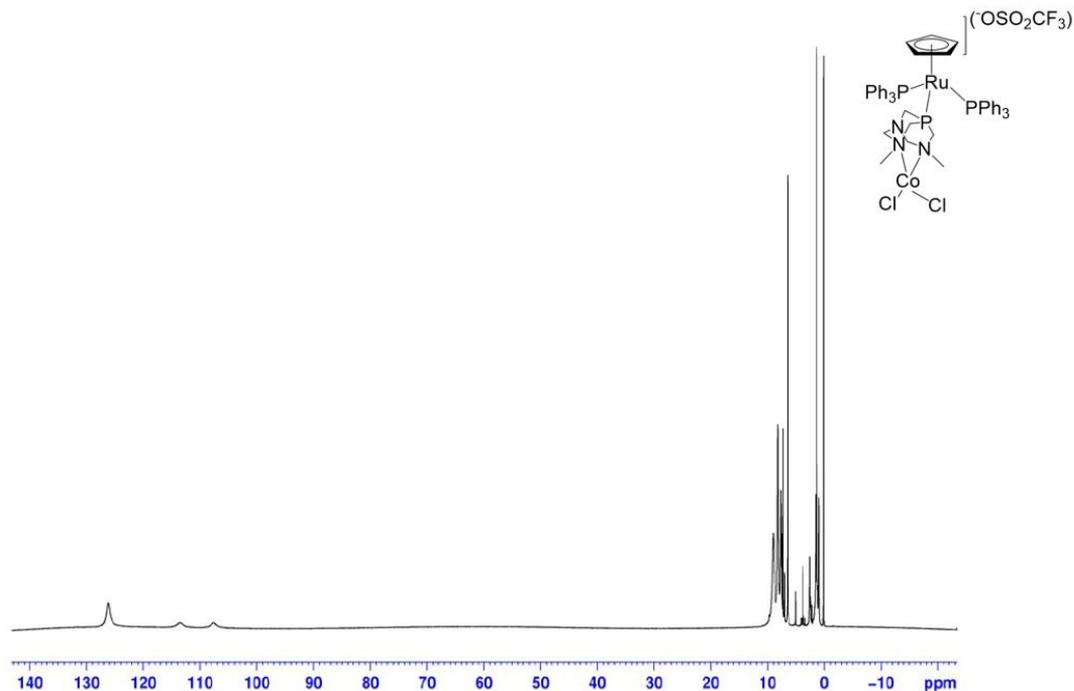
Figura 23. Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY RMN de **1** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

Con los resultados mostrados para **1**, los precedentes obtenidos hasta el momento,<sup>49</sup> y sabiendo que los metales son capaces de dotar a los complejos de características particulares, se decidió que el siguiente paso era sintetizar el primer complejo bimetálico.

El metal escogido para esta segunda síntesis fue el cobalto: este metal es un micro elemento importante en el metabolismo de la metionina en los seres humanos, también es un componente de la vitamina B<sub>12</sub> y además interviene en las síntesis de hemoglobina.

<sup>49</sup> A. Mena, P. Lorenzo, V. Passarelli, A. Romerosa, M. Serrano Ruiz. Dalton Trans., **2011**, 40, 3237.

## 6. Resultados y discusión.



**Figura 24.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN de **3** en  $\text{CDCl}_3$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

Debido al ensanchamiento y desplazamiento de las señales causado por el paramagnetismo característico del  $\text{Co(II)}$  (Figura 24), las señales del espectro  $^1\text{H}$  RMN no pudieron identificarse correctamente.

No obstante, en el espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN se muestra la existencia de una especie única en la que la señal correspondiente al ligando dmoPTA (211.35 ppm) se ha desplazado hacia campos más bajos con respecto al compuesto de partida **1** (-14,11 ppm). Esto se corresponde con la coordinación del átomo metálico de  $\text{Co}$  con el ligando, ya que la presencia del paramagnetismo en los complejos produce este tipo de desplazamientos químicos.

## 6. Resultados y discusión.

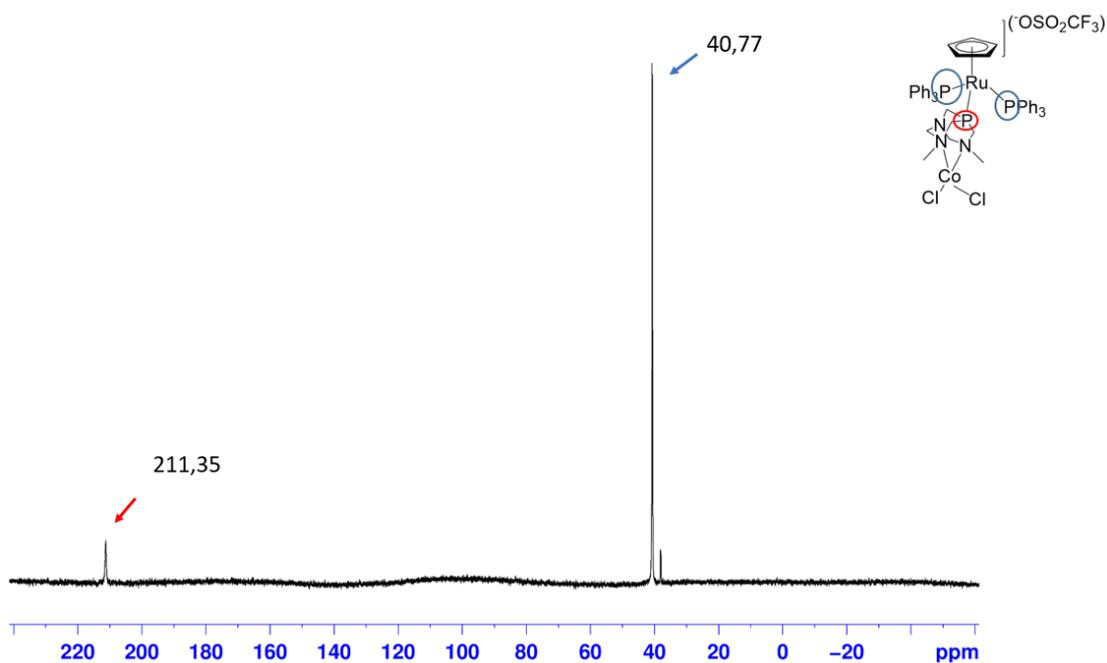


Figura 25. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **3** en  $\text{CDCl}_3$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

Por otro lado, las señales del espectro  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  RMN tampoco pudieron identificarse en su totalidad; aunque sí se pudo asignar las señales de las  $\text{PPh}_3$  aromáticas entre  $141,32\text{ ppm}$  –  $127,71\text{ ppm}$ , y del Cp a  $91,03\text{ ppm}$ .

## 6. Resultados y discusión.

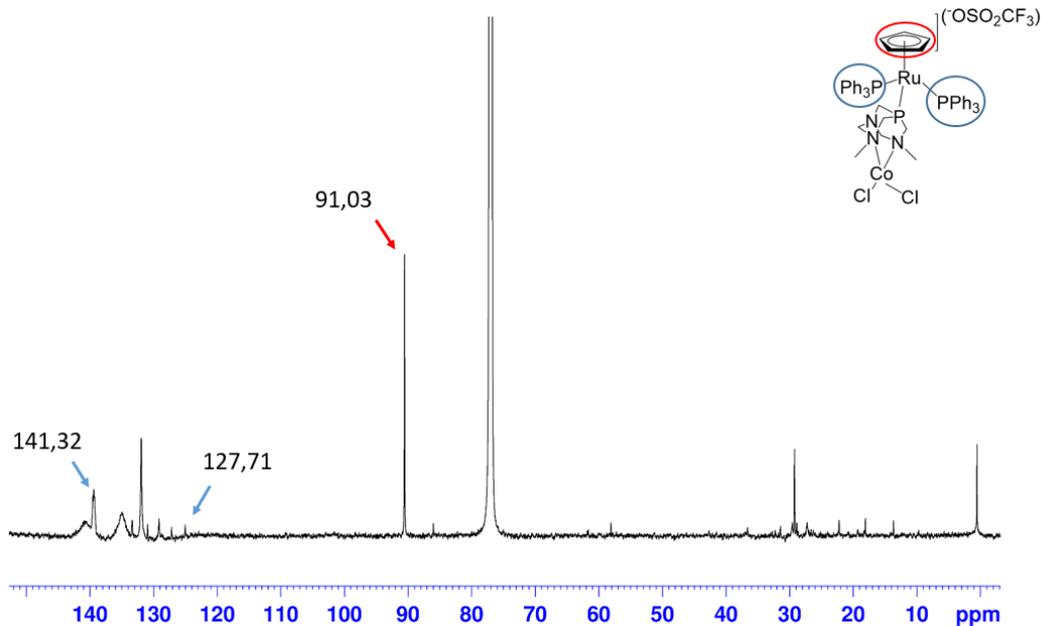


Figura 26. Espectro  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  RMN de **3** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

Finalmente, los resultados obtenidos para el complejo **3** nos hizo plantearnos si el uso de un metal distinto y más afín al cuerpo humano podría mejorar su actividad antitumoral. Así que, para el siguiente estudio, se utilizó como segundo metal el Zn, un oligoelemento imprescindible en algunos sistemas biológicos y que, a diferencia del Co, tiene propiedades diamagnéticas.

Para ello, primero se aisló y caracterizó el complejo monometálico  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{dmoPTA-1}\kappa\text{P})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$  (**2**). Su caracterización mediante IR, análisis elemental y RMN corroboran que la estructura del complejo está constituida por un átomo de Ru coordinado en una geometría pseudo-octaédrica en silla de piano con un  $\eta^5\text{-Cp}$ , dos  $\text{PPh}_3$  y un dmoPTA desprotonado.

El espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN medido en  $\text{CDCl}_3$  nos permitió observar la especie **2** aislada:

## 6. Resultados y discusión.

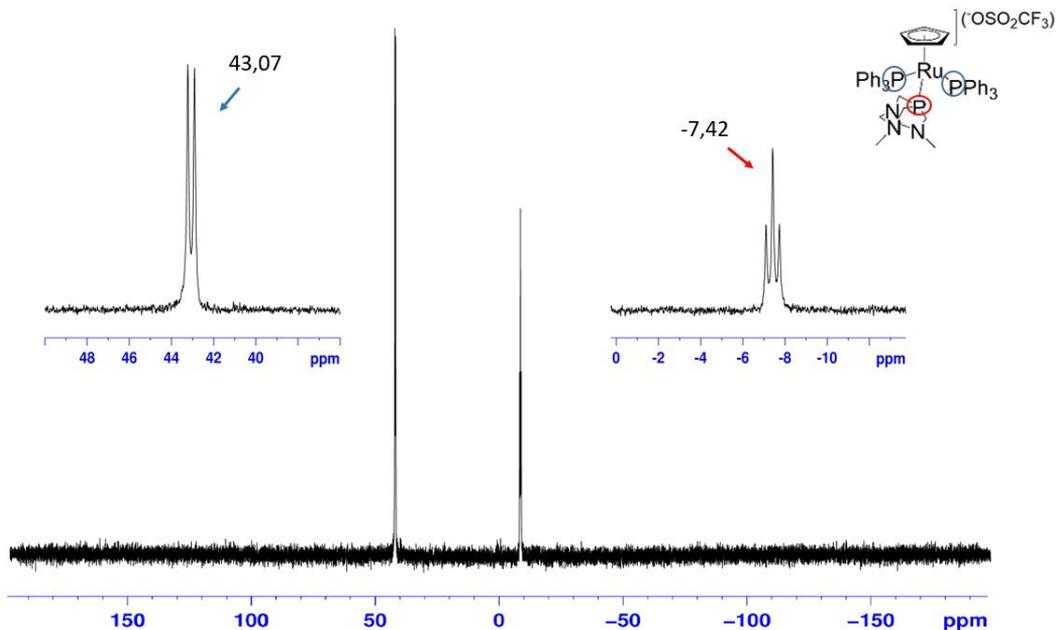


Figura 27. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **2** en  $\text{CDCl}_3$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

Este espectro nos muestra la presencia de un doblete a  $43,07\text{ ppm}$  ( $^2J_{\text{PP}} = 38,24\text{ Hz}$ ) que se corresponde con las  $\text{PPh}_3$ ; y de un triplete a  $-7,42\text{ ppm}$  se corresponde con el dmoPTA. La comparación de estas señales con las obtenidas en el espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN para el complejo **1** ( $\delta = 38,44\text{ ppm}$   $\text{PPh}_3$ ;  $-13,94\text{ ppm}$  dmoPTA), muestra que las señales están significativamente desplazadas hacia campos más bajos a pesar de que las constantes de acoplamiento sean similares ( $^2J_{\text{PP}} = 39,4\text{ Hz}$ ).

El espectro  $^1\text{H}$  RMN muestra el claro efecto de apantallamiento producido por la desprotonación del ligando dmoPTA: el doble singlete que aparecía en el espectro  $^1\text{H}$  RMN del complejo **1** a  $2,35$  y  $2,36\text{ ppm}$  para los metilos de los  $\text{N-CH}_3$  ahora aparecen como un singlete ancho a  $2,04\text{ ppm}$ .

## 6. Resultados y discusión.

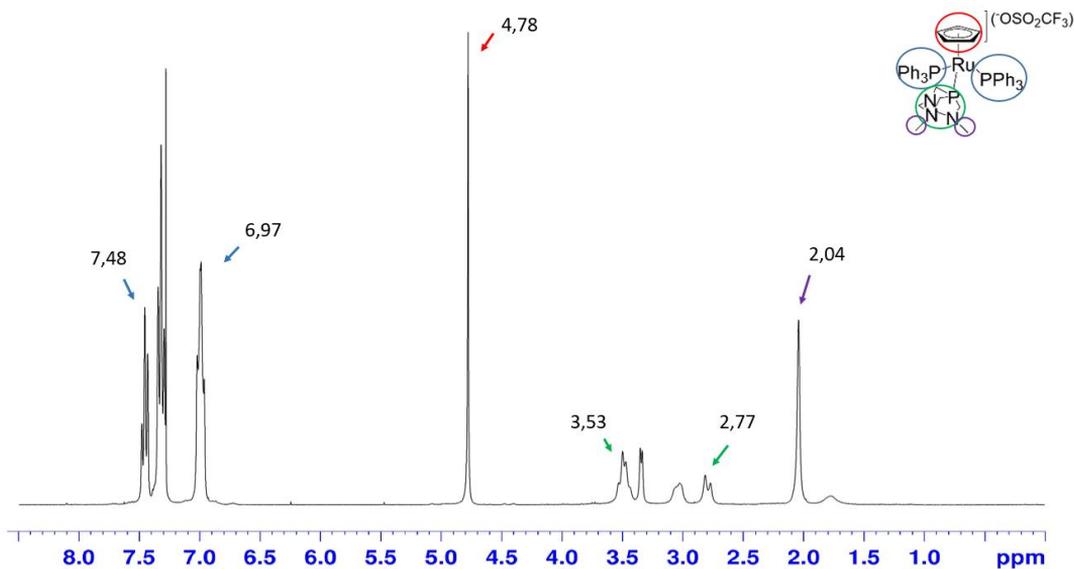


Figura 28. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de **2** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

El resto de las señales pudieron identificarse correctamente con la estructura planteada: entre 2,77 y 3,35 ppm se observa un multiplete (6H) correspondiente a los protones del  $\text{PCH}_2$ ; entre 3,47 y 3,53 ppm se observa otro multiplete (4H) que se asigna a los protones del  $\text{NCH}_2\text{N}$ . El Cp se muestra con un singlete característico que integra para 5H a 4,78 ppm. Finalmente, las señales aromáticas de las  $\text{PPh}_3$  se encuentran a 6,97 – 7,03; 7,28 – 7,35 y 7,44 – 7,48 ppm.

Sin embargo, el espectro  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  RMN es muy similar al medido para el complejo **1**: el grupo  $\text{NCH}_3$  muestra señales a 43,90 y 44,01 ppm para **2**, mientras que para **1** son a 43,35 y 43,41 ppm; el Cp muestra una señal a 85,15 ppm en **2** y 85,51 ppm en **1**.

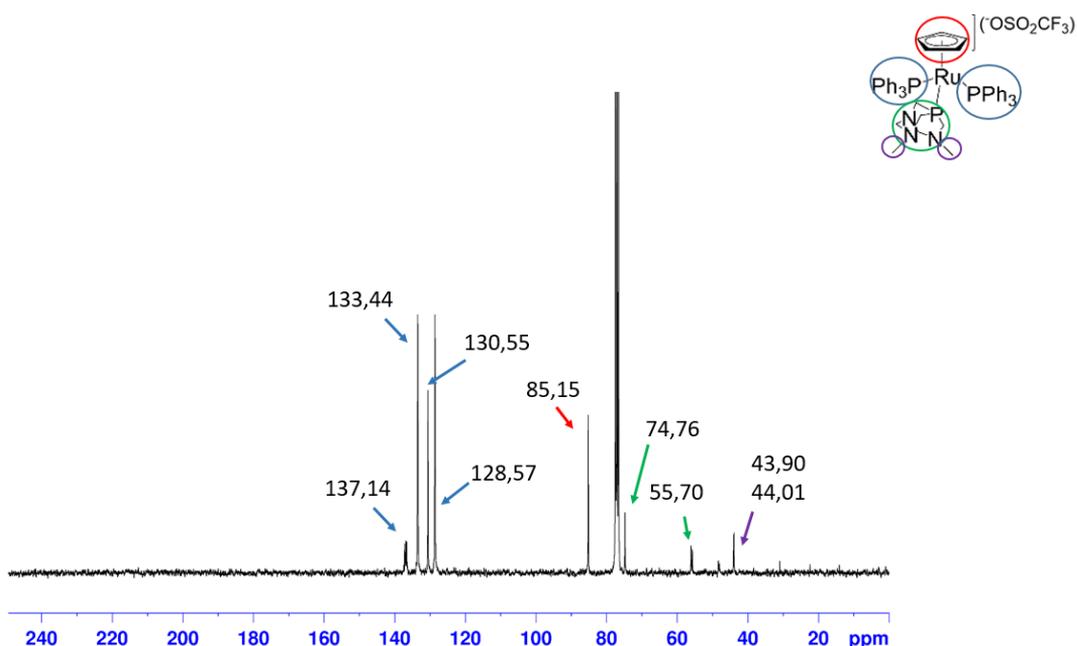


Figura 29. Espectro  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  RMN de **2** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

Del mismo modo, el resto de las señales fueron asignadas de acuerdo a la estructura planteada: a 55,70 ppm se observa un doblete correspondiente a  $\text{PCH}_2\text{NCH}_3$ , a 74,76 se muestra un singlete que se corresponde con  $\text{CH}_2\text{N}$ . Por último, las señales de los aromáticos se encuentran como un multiplete entre 128,57 ppm y 137,14 ppm.

El espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY RMN se realizó con la finalidad de intentar asignar indudablemente las señales de protón, ya que algunas de ellas podrían estar solapadas y, por lo tanto, enmascaradas. El espectro confirmó la estructura propuesta del complejo ya que el número de señales observadas corresponde al número de protones esperado del mismo. Este resultado se corroboró finalmente mediante un experimento  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-editado, con el que se pudo asignar sin género de dudas los protones correspondientes a los grupos metilo.

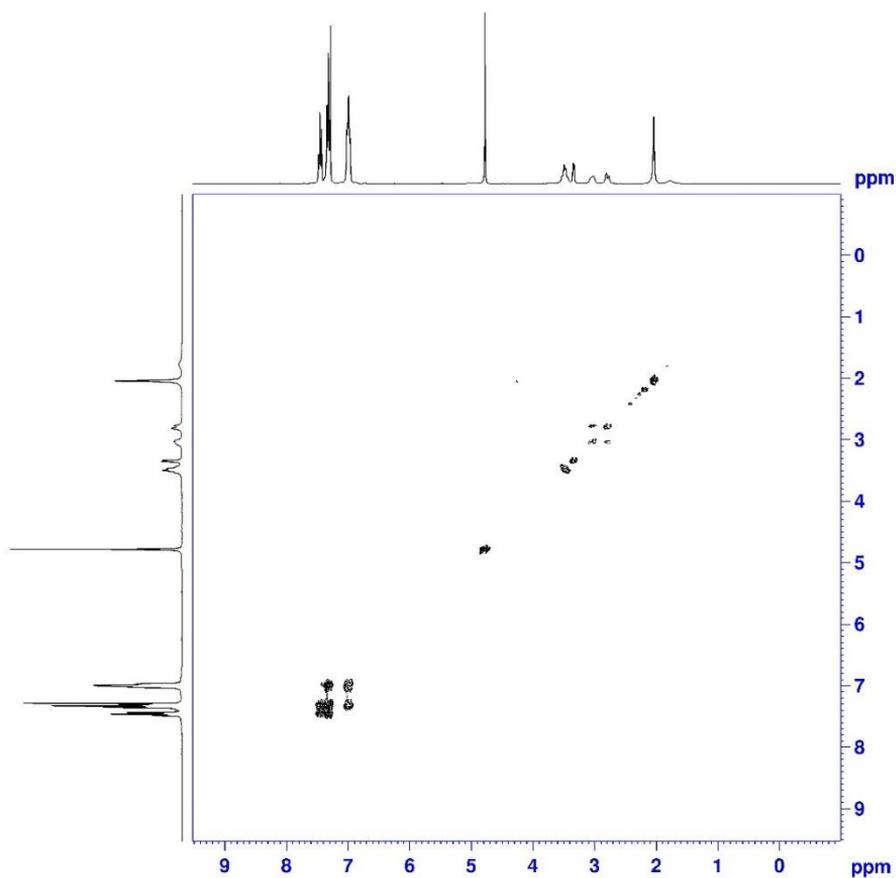


Figura 30. Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY RMN de **2** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

En el  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-editado RMN los grupos metilo aparecen como un singlete ancho a 2,04 ppm, siendo esta anchura mayor de la esperada para el complejo. Sin embargo, el espectro no muestra la existencia de señales enmascaradas bajo la señal de los metilos.

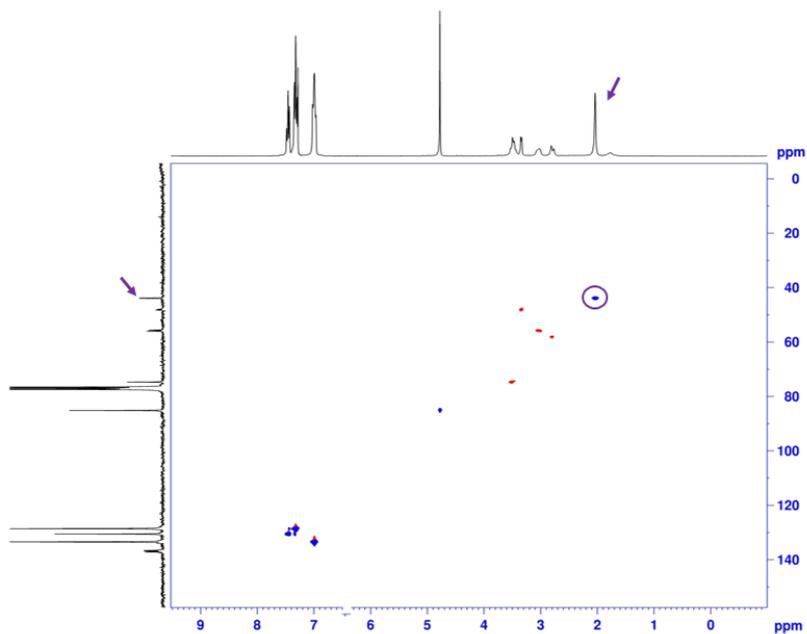


Figura 31. Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-editado RMN de **2** en  $\text{CDCl}_3$ , 25°C.

Una vez se sintetizó y caracterizó el complejo **2**, se procedió a la síntesis y caracterización de **4**:

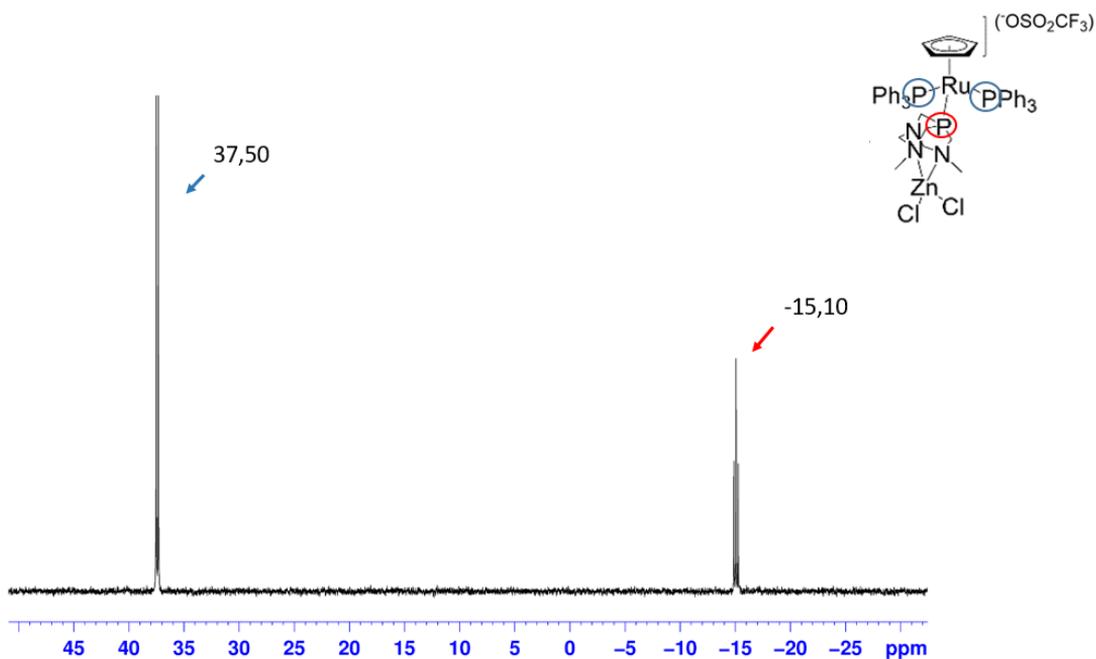


Figura 32. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **4** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

El espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN (Figura 32) nos muestra dos únicas señales pertenecientes al complejo aislado: a -15,10 ppm se muestra el triplete asignado al dmpTA, mientras que a 37,50 ppm hay un doblete asignado a los átomos de P de las  $\text{PPh}_3$ .

Las señales del espectro  $^1\text{H}$  RMN para el complejo **4** (Figura 33) pudieron identificarse en su totalidad de acuerdo a la estructura planteada. A 2,16 y 2,15 ppm (3H, 3H) se observan dos singletes anchos correspondientes a los protones  $\text{NCH}_3$  que muestran que los metilos son químicamente diferentes; a 2,97 ppm y 3,60 ppm (6H) están las señales asignadas para  $\text{NCH}_2\text{N}$ ; la señal característica del Cp se muestra como un singlete que integra para 5 H a 4,94 ppm; y finalmente, las señales de las  $\text{PPh}_3$  aromáticas se encuentran como multipletes anchos entre 6,93 y 7,53 ppm.

## 6. Resultados y discusión.

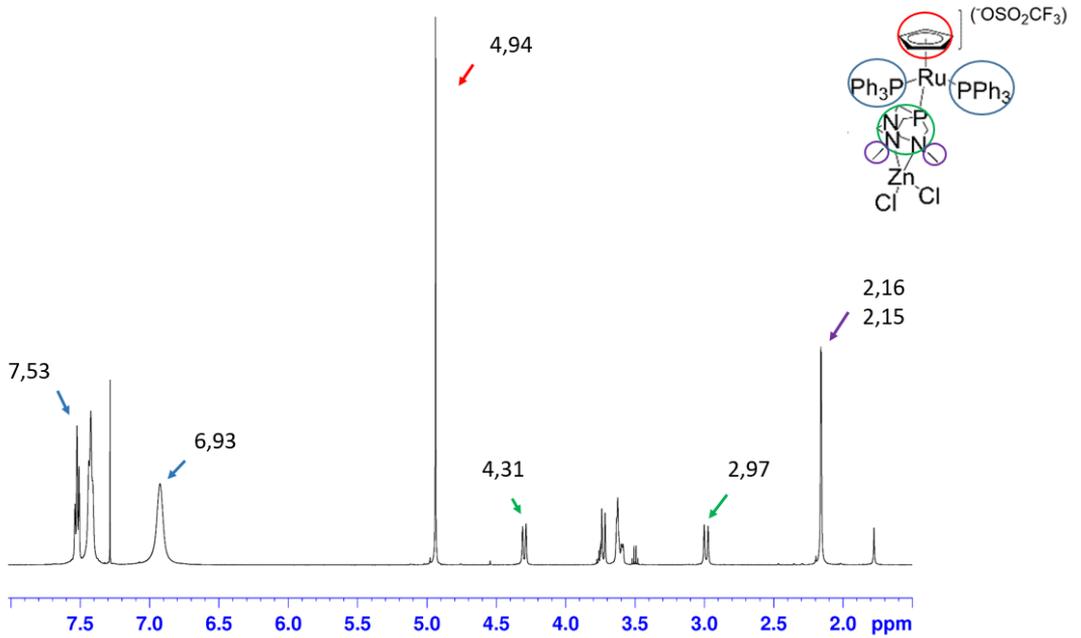


Figura 33. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de **4** en  $\text{CDCl}_3$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

Estas señales pudieron asignarse con la ayuda de los espectros bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY RMN (Figura 34),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  HMBC RMN (Figura 35) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  HSQC RMN (Figura 36).

## 6. Resultados y discusión.

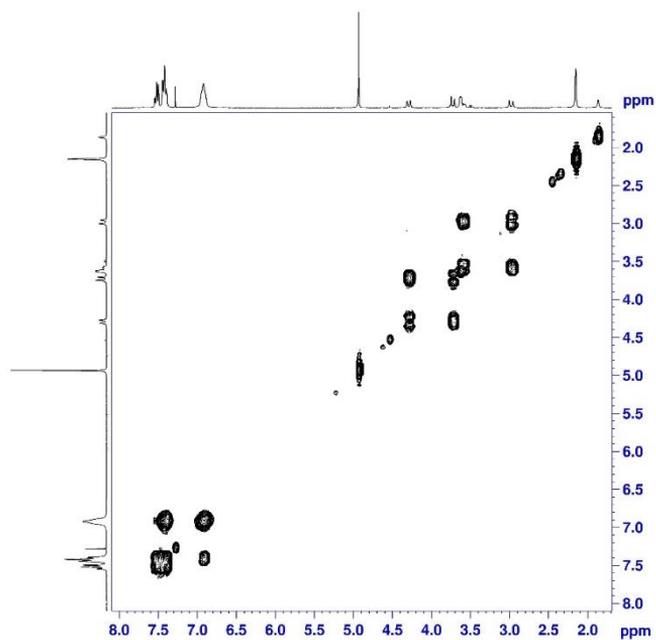


Figura 34. Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY RMN de **4** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

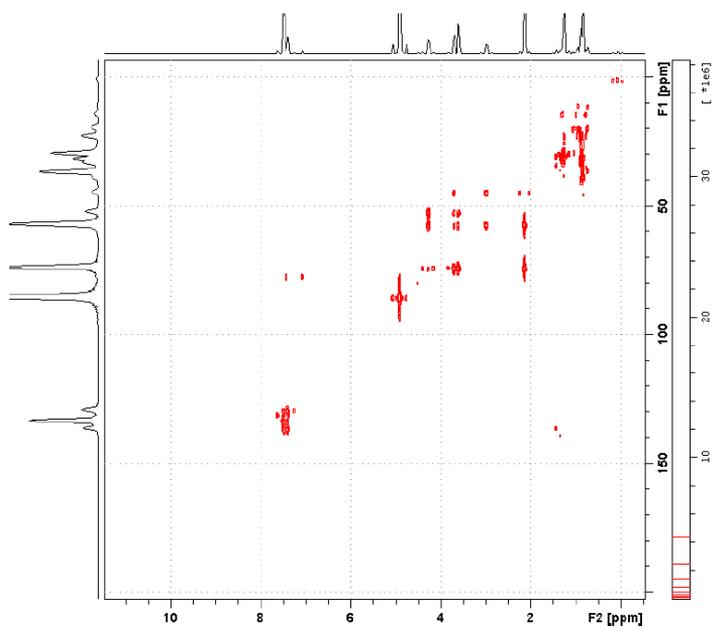


Figura 35. Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBSC RMN de **4** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

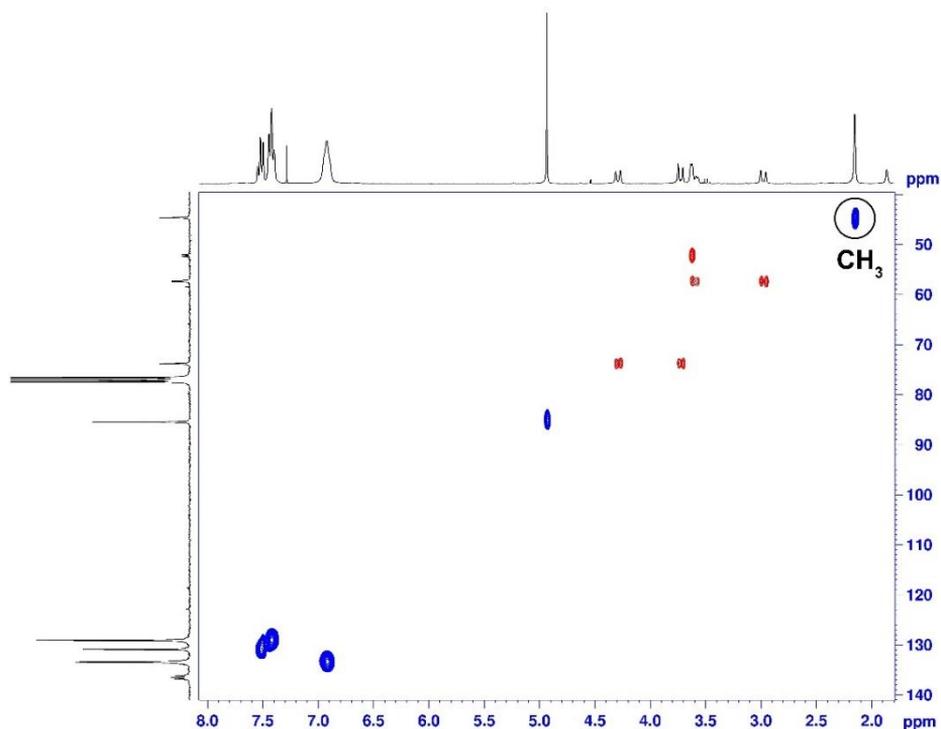


Figura 36. Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC RMN de **4** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

El espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  HSQC RMN, nos muestra claramente que las señales anchas de los singletes a 2,15 ppm y 2,16 ppm se corresponden únicamente con las señales de los metilos unidos a los átomos de N.

También pudimos asignar todas las señales del espectro  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  RMN (Figura 37) de acuerdo a la estructura planteada. Los singletes a 44,67 ppm y 44,72 ppm se corresponden con los  $\text{NCH}_3$ ; además, a 52,39 ppm se observa un doblete que se corresponde con el  $\text{PCH}_2\text{NCH}_3$ ; y el singlete a 73,85 ppm se asignó a  $\text{CH}_2\text{N}$ . Finalmente, la señal a 85,48 ppm es un singlete propio del Cp; y las señales a 129,12; 130,95; 133,46 y 136,48 ppm se corresponden con las  $\text{PPh}_3$  aromáticas.

## 6. Resultados y discusión.

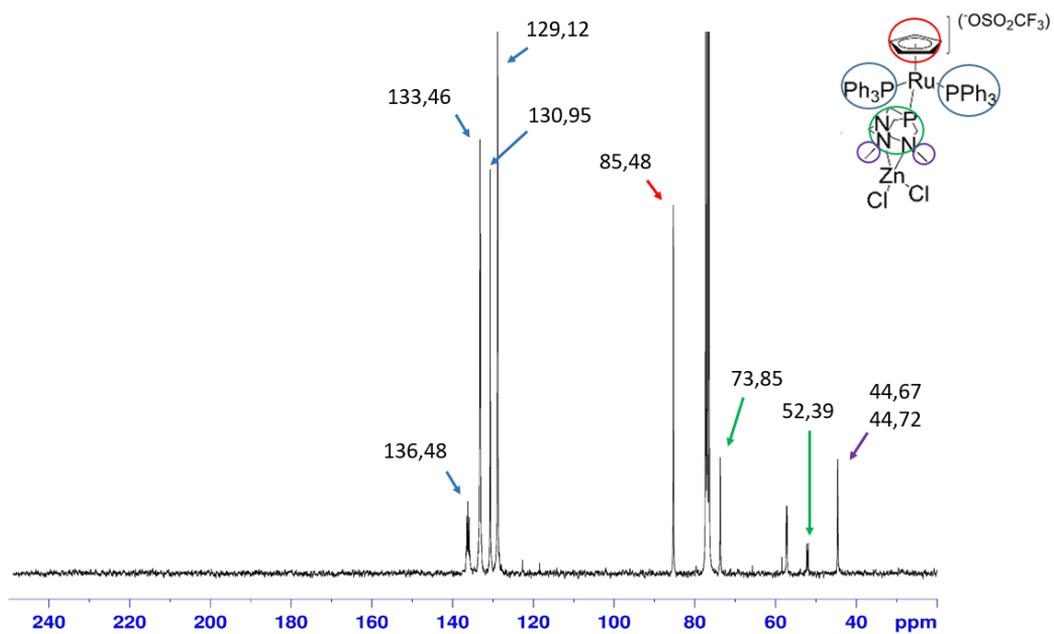


Figura 37. Espectro  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  RMN de **4** en  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C.

## 6.2. Difracción de Rayos-X.

De la síntesis de los tres nuevos complejos se pudieron obtener cristales de tamaño apropiado para medir su estructura cristalina mediante Difracción de Rayos-X.

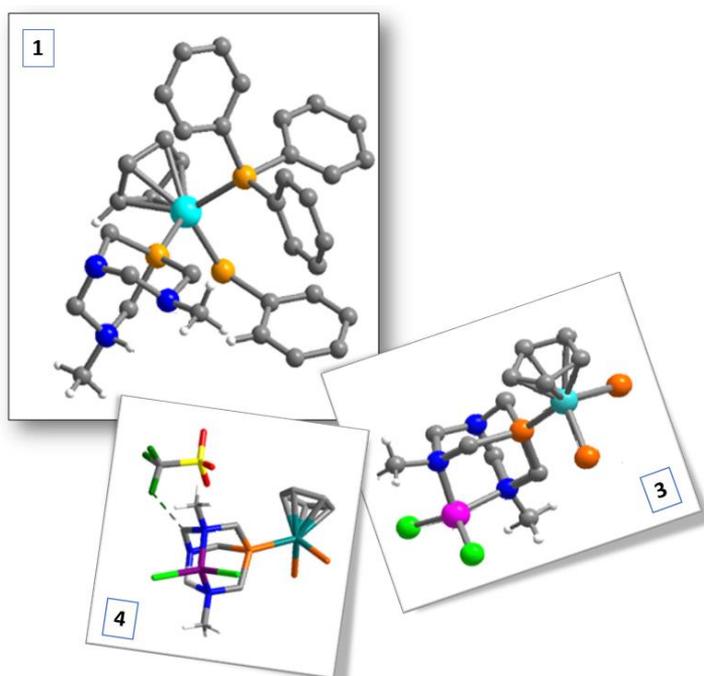


Figura 38. Estructuras moleculares obtenidas de los complejos **1**, **3** y **4**.

Los estudios cristalográficos de **1** confirman una coordinación pseudo-octaédrica distorsionada alrededor del Ru(II), constituida por un  $\eta^5$ -Cp, dos PPh<sub>3</sub> y un HdmOPTA unido mediante el átomo de P. Además, la presencia de interacciones C-H/ $\pi$  entre los grupos aromáticos contribuyen a la estabilización de la estructura.

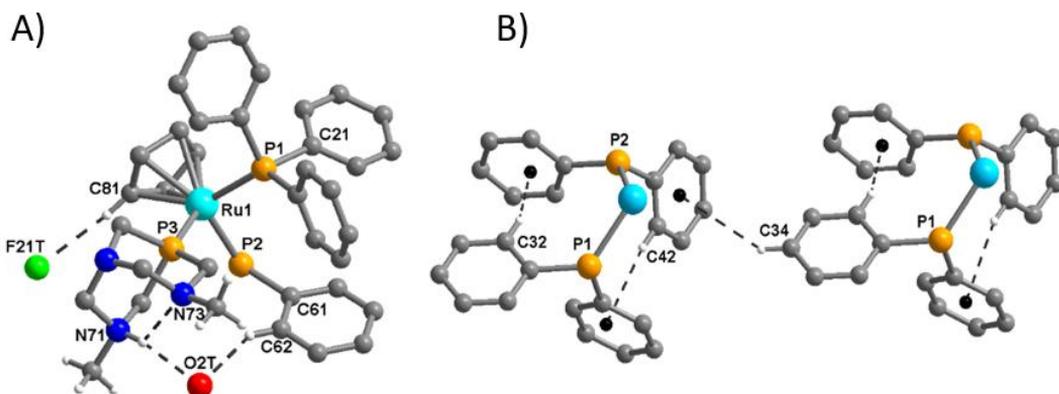


Figura 39. Para el complejo 1: A) Estructura cristalina con sus átomos numerados. B) Interacciones C-H/ $\pi$ : dcentroide-a-C32-H32 = 3,183(5); dcentroide-a-C34-H34 = 4,039(5) y dcentroide-a-C42-H42 = 3,470(5).

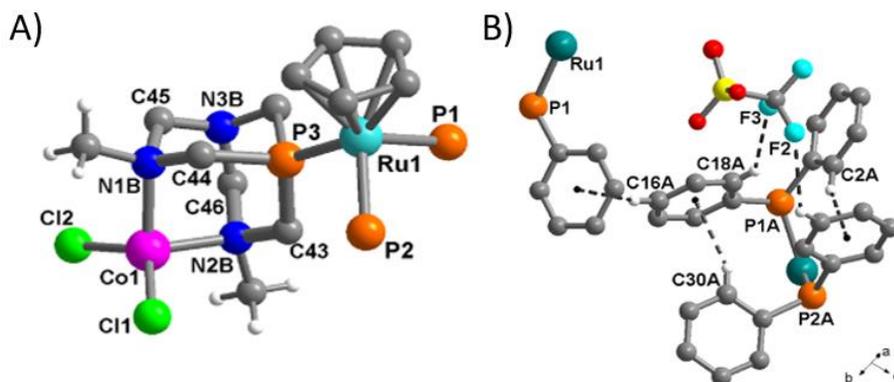


Figura 40. Para el complejo 3: A) Estructura cristalina con sus átomos numerados. B) Interacciones C-H/ $\pi$ : dcentroide-a-C-H comprendidas entre: 3,311(3) Å y 3,463(4) Å.

De los estudios cristalográficos de **3** se observa una estructura constituida por dos complejos catiónicos bimetálicos  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2-\mu\text{-dmoPTA-}1\kappa\text{P:}2\kappa^2\text{N,N}'\text{-CoCl}_2]^+$ , dos aniones  $\text{OTf}^-$  y dos moléculas de  $0,25 \text{ H}_2\text{O}$  desordenadas. La distribución de ligandos entorno al Ru es muy similar a las estructuras Ru-HdmoPTA estudiadas previamente;<sup>50-57</sup> sin embargo, el enlace  $\text{Ru}_{\text{dmoPTA}}\text{-P}$  de **3** es ligeramente mayor (2,370(9) Å), que

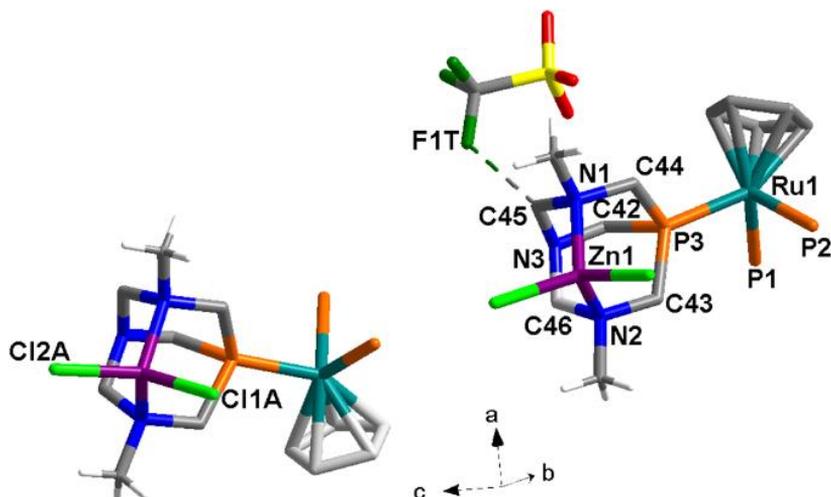
<sup>50</sup> Z. Mendoza, P. Lorenzo, M. Serrano, E. Martín, J. M. Padrón, F. Scalambra, A. Romerosa, *Inorg. Chem.*, **2016**, 55, 7820-7822.

para **1** (3,208(1) Å) y significativamente mayor que **1'** (2,2767(3) Å). Las distancias Ru<sub>PPh<sub>3</sub></sub>-P de **1** (valor medio = 2,33777 Å) son similares para una de las moléculas (2,378(4) Å, 2,370(9) Å) pero significativamente distintas para la otra (2,2911(9) Å, 2,3438(8) Å). Por otro lado, el ángulo formado entre los átomos P1-Ru1-P3 en el complejo **3** (96,58(4)°) es más corto que en **1** (92,77(3)°). Además, el ángulo formado entre los átomos P2-Ru1-P3 de **3** es el ángulo más grande (99,73°), coincidiendo con los ángulos de la serie de complejos bimetalicos de tipo [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)dmoPTA-MCl<sub>2</sub>] (M = Ni, Zn) (96,8°) y [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)dmoPTA-M(acac-κ<sup>2</sup>O,O')<sub>2</sub>] (M = Co, Ni, Zn) (99,0°). Finalmente, el ángulo formado por Cl3-Co1-Cl2 en el complejo **3** (126,7(1)Å) está dentro del rango de los ángulos encontrados para los complejos [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)dmoPTA-MCl<sub>2</sub>] (M = Ni (129,4(3)°, Zn (121,8(6)°), aunque no pudo ser comparado con el correspondiente complejo de Co(II) porque no ha sido caracterizado.<sup>58</sup>

Para el resto de la estructura no se encontraron diferencias significativas respecto a otros complejos de partida basados en Ru(II)-dmoPTA-Cp.

Análogamente a lo observado en **1**, la presencia de interacciones C-H/π entre los grupos aromáticos contribuyen a la estabilización de la estructura. No obstante, otro tipo de interacciones intermoleculares débiles entre los protones de la PPh<sub>3</sub> y el F del contra ión triflato (C18A-H18A...F3 = 3,458(4), C23A-H23A...F2 de 3,259(4)) fueron observadas.

La estructura cristalina del complejo **4** mostró una unidad asimétrica de dos aniones de triflato (OTf) y dos cationes enantioméricos.



**Figura 41.** Par enantiomérico de **4** que muestra la conformación de pseudo-silla del complejo.

El anillo del Cp es generalmente plano con una separación más larga del plano general-Cp (0,0047 Å) mayor que para el complejo **3**. Por otro lado, la distancia entre el centroide del Cp y el átomo de Ru (1,894 Å) es casi equivalente a la distancia encontrada para **1** y **3** (de 1,886 Å a 1,893 Å) y es similar a la encontrada en otros complejos de Ru-Cp (de 1,836 Å a 1,893 Å).<sup>51</sup> El ángulo existente entre el plano del Cp-centroide y el plano constituido por los átomos P1-Ru1-P2 es de 46,6(1)° lo cual es virtualmente idéntico al observado en el complejo **3** (46,9(9)°), pero aproximadamente 1,3° menor que el encontrado para el complejo **1**.<sup>68-52</sup> Si comparamos estos valores con los encontrados en los complejos [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-MQ] (M = Co, Ni, Zn; Q = acac, Cl<sub>2</sub>) vemos que son relativamente menores, ya que se encuentran en un rango de 53,7(2) - 56,85(0)°.<sup>46b</sup> Los ángulos diedros de los átomos del dmoPTA varían de 52,4(5)-51,6(3) a 51,8(4)-52,7(4)°; estos valores concuerdan con

<sup>51</sup> B. Gonzalez, P. Lorenzo, P. Gili, A. Romerosa, M. Serrano, J. Organomet. Chem. **2009**, 694, 2029–2036.

<sup>52</sup> Z. Mendoza, P. Lorenzo, F. Scalambra, J. M. Padron, A. Romerosa, Dalton Trans. **2017**, 46, 8009–8012.

aquellos encontrados para los complejos  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-}1\kappa\text{P:}2\kappa^2\text{N,N}'\text{-MCl}_2]$  ( $\text{M} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Zn}$ ) de  $121,8(4)^\circ$ .<sup>46a</sup>

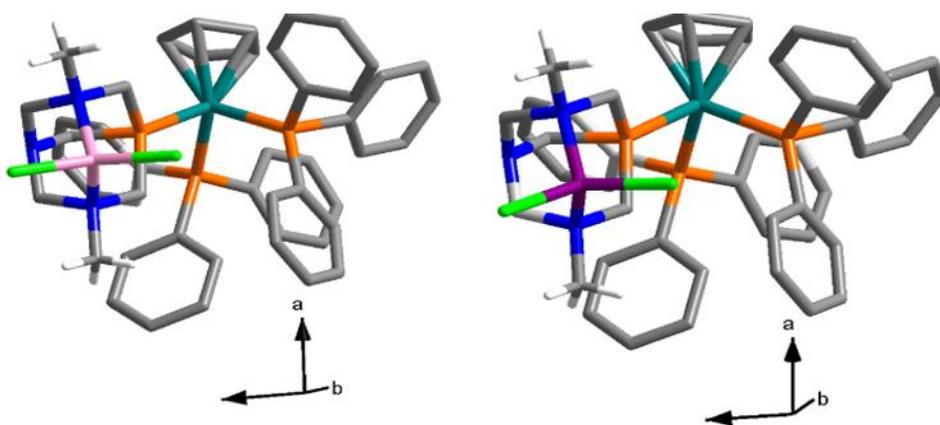


Figura 42. Estructuras comparativas y enantioméricas de los complejos **3** y **4**.

La disposición del ligando dmoPTA deja a los grupos  $\text{CH}_3$  en un entorno químico totalmente diferente: mientras que uno de ellos está localizado frente al Cp, el otro se encuentra cerca del grupo aromático  $\text{PPh}_3$ . Además, del mismo modo que para los complejos **1** y **3**, el complejo **4** presenta interacciones débiles intermoleculares entre las moléculas [ $\text{C36-H36}\cdots\text{Cl2} = 3,586(7)$ ,  $\text{H36}\cdots\text{Cl2} = 2,804(2)$  Å]. Las interacciones C-H/ $\pi$  entre el centroide aromático y el grupo fenil-C-H adyacente son mayores en **4** (de  $3,366(5)$  Å a  $3,566(6)$  Å) que en **1** y **3** (rango entre  $3,183(5)$  Å y  $3,470(5)$  Å).

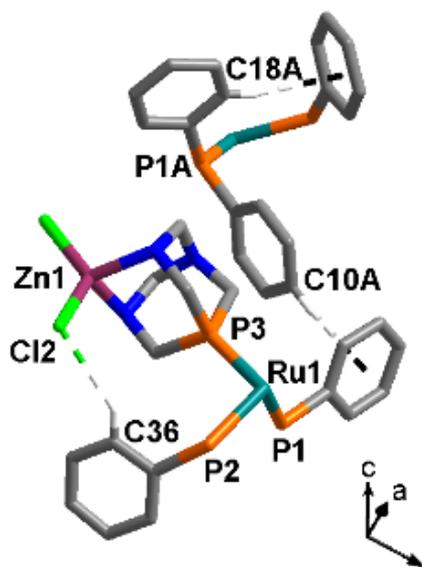


Figura 43. Estructura de 4 mostrando interacciones débiles más significativas.

### 6.3. Ensayos biológicos.

La actividad biológica de los nuevos complejos se estudió en un panel de distintas líneas celulares tumorales. En la [Tabla 1](#) se muestra los resultados obtenidos para estos ensayos:

Cell line (origin)							
Entry	A549 (lung)	HBL-100 (breast)	HeLa (cervix)	SW1573 (lung)	T-47D (breast)	WiDr (colon)	BJ-hTert (fibroblasts)
<b>1'</b>	-	-	2,6 (0,2)	1,5 (0,1)	1,9 (0,5)	1,7 (0,4)	-
<b>1</b>	0,29 (0,09)	0,21 (0,04)	0,17 (0,04)	0,20 (0,02)	0,25 (0,04)	0,20 (0,03)	-
<b>2</b>	0,14 (0,02)	0,32 (0,03)	0,19 (0,01)	0,19 (0,05)	0,33 (0,01)	0,27 (0,03)	0,35 (0,02)
<b>3</b>	0,062 (0,019)	0,088 (0,008)	0,084 (0,022)	0,054 (0,013)	0,210 (0,05)	0,065 (0,010)	-
<b>4</b>	0,036 (0,019)	0,072 (0,008)	0,051 (0,022)	0,030 (0,013)	0,083 (0,05)	0,054 (0,010)	0,23 (0,02)
<b>cisplatin</b>	4,9 (0,2)	1,9 (0,2)	1,8 (0,5)	2,7 (0,4)	17 (3,3)	23 (4,3)	14 (2,4)

**Tabla 1.** Valores comparativos de  $GI_{50}$  ( $\mu M$ ) de los nuevos complejos respecto a **1'** y al cisplatino en líneas celulares tumorales humanas.

De forma general, los valores de  $GI_{50}$  para **1** están comprendidos entre 0,17 - 0,29  $\mu M$ , lo cual es significativamente menor que los valores obtenidos para **1'** y el cisplatino. Las diferencias más significativas encontradas entre **1** y el cisplatino se encuentran en la línea celular T-47D (cáncer de pecho) y WiDr (cáncer de colon), siendo esta última de especial interés debido a que podría ser una alternativa a la resistencia que se desarrolla en tratamientos con cisplatino.

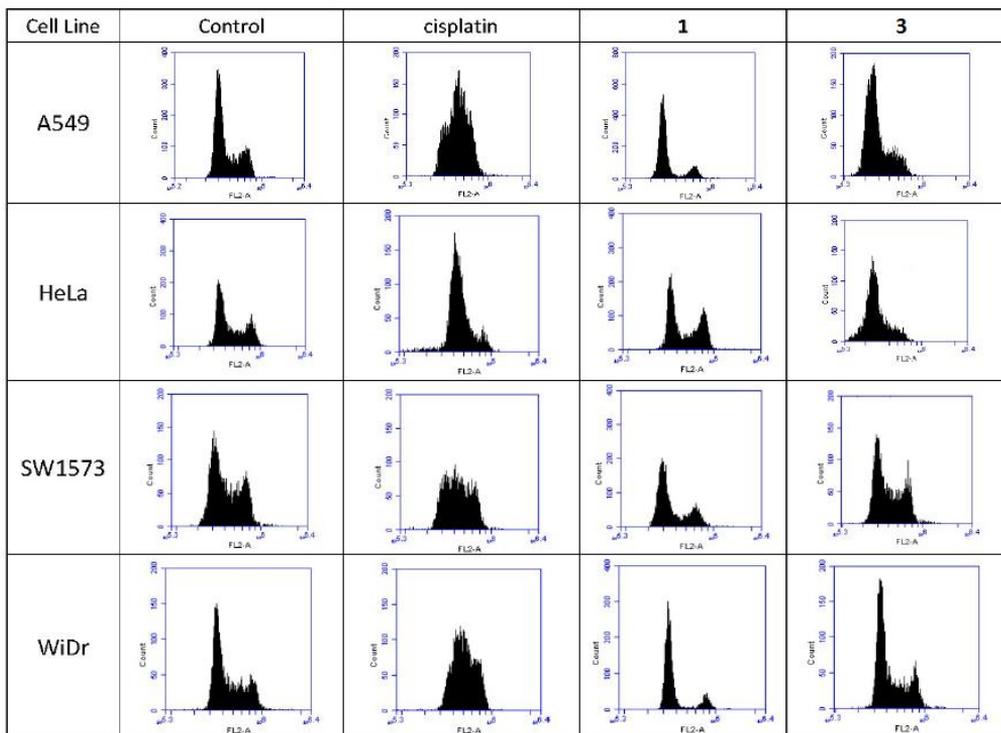
En un principio, podríamos pensar que la presencia del  $Cl^-$  lábil es fundamental en la actividad de estos complejos debido al mecanismo de

acción del cisplatino. Sin embargo, estos resultados sugieren un aumento en la actividad biológica del compuesto **1** carente de Cl al ser comparado con **1'**. La principal diferencia estructural entre ambos es la presencia de una PPh<sub>3</sub> en lugar del ligando Cl<sup>-</sup>, aunque esto no implica que la presencia del ligando aromático asegure la actividad biológica del complejo.

Por otro lado, al comparar los resultados del complejo **3** respecto del **1**, se observa una mejoría en la actividad antitumoral en 5 de las 6 líneas celulares tumorales. Además, se realizaron estudios biológicos con CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O para confirmar su inactividad y corroborar que el origen de la actividad antitumoral es del complejo bimetálico objeto de estudio.

Finalmente, los complejos **2** y **4** fueron ensayados frente a líneas celulares sanas (BJ-hTert) con el objetivo de estudiar su selectividad. Se observó que el complejo **2** muestra una actividad antitumoral similar al complejo de partida **1**, por lo que la existencia del protón puente o su desprotonación no influye en la actividad antitumoral. Tal y como esperábamos, la actividad del Ru-Zn (**4**) es de entre 1,2 y 2,5 veces mayor que para el complejo Ru-Co (**2**), y mucho mayor (de entre 26 y 426 veces) que el cisplatino. Además, hay que recalcar que la actividad biológica de **4** es de 3 a 8 veces mayor en líneas celulares tumorales que en la línea celular sana estudiada, lo cual sugiere que presenta una elevada selectividad frente a células cancerígenas. Por el contrario, el complejo **2** no mostró selectividad alguna.

Los resultados favorables obtenidos de la actividad antitumoral de estos complejos nos llevaron a preguntarnos si el mecanismo de acción era similar al del cisplatino. Por ello, se realizaron ensayos mediante citometría de flujo de los complejos **1** y **3** con el objetivo de ver en qué fase de del ciclo celular tenía lugar la acumulación de los complejos.



**Tabla 2.** Histograma representativo de líneas celulares sin tratar (Control) y células tratadas con **1** (0,5  $\mu$ M), **3** (0,1  $\mu$ M) y cisplatino ( $\mu$ M) durante 24h.

Los resultados obtenidos ([Tabla 2](#)) muestran que, mientras que el cisplatino se acumula durante la fase S en A549, SW1573 y WiDr, los complejos **1** y **3** se acumulan principalmente durante la fase G1. Por otro lado, para la línea celular de HeLa, el cisplatino tiende a acumularse durante la fase G1, mientras que **1** se acumula en la fase G2/M. Esto es una clara evidencia de que el mecanismo de acción del cisplatino difiere del de **1**.

Por tanto, los resultados de las medidas del ciclo celular junto con los ensayos realizados previamente para **1**,<sup>53</sup> nos muestran que el mecanismo de acción de **3** es muy similar a **1** y distinto del cisplatino; lo cual nos permite sospechar que esta nueva familia de complejos (2ª generación, [Esquema1](#)) no da lugar a la muerte celular mediante algún

<sup>53</sup> C. Ríos, L. G. León, A. Mena, E. Pérez, P. Lorenzo, A. Romerosa, J. M. Padrón. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4568-4571.

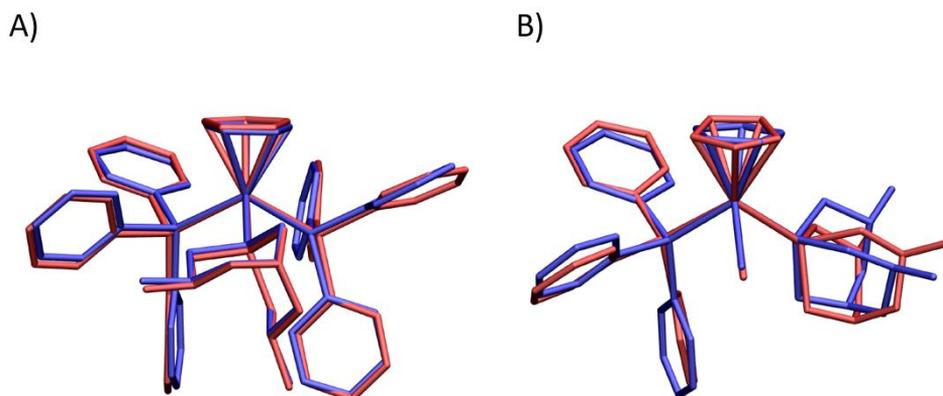
proceso que implique al ADN de la célula. Por lo tanto, parece que esta segunda generación de compuestos tiene un mecanismo de acción diferente al de la primera generación previamente sintetizados (1ª generación, Figuras 12 y 13). No obstante, aún quedan muchas dudas por resolver que sólo podrán ser respondidas con un estudio más detallado del mecanismo y la síntesis de nuevos derivados de ambas familias de complejos.

#### **6.4. Ensayos complementarios.**

##### **6.4.1. Estudios teóricos mediante DFT (Teoría del Funcional de la Densidad) para el complejo 1.**

La diferencia de actividad antitumoral existente entre los complejos **1** y **1'** nos hizo preguntarnos si la carga di-positiva del complejo **1** era determinante en estos resultados quizás debido a una mejor interacción con la membrana celular por su carga negativa. Para ello, se hicieron modelos estructurales mediante teoría del funcional de la densidad (DFT) y se estudió la distribución de carga en los fenilos de **1** y **1'**.

El estudio de DFT compara los enlaces de los modelos teóricos con los obtenidos de las estructuras cristalinas de los complejos **1** y **1'**, mostrándonos que la mayor diferencia en la distancia de enlace entre ambos reside en el enlace Ru-P. Así, para el complejo **1** se observó que la distancia de enlace Ru1-P1 tiene un valor mayor en +10,5% respecto a la misma distancia de enlace medida en la estructura cristalina. Por otro lado, para el complejo **1'** la distancia de enlace Ru1'-P1' era mayor en +8,7% respecto a la encontrada en su estructura cristalina.



**Figura 44.** Comparativa entre el modelo teórico optimizado (rojo) y la estructura cristalina (azul) para: A) complejo **1**; y B) complejo **1'**.

Los resultados obtenidos indican que no existe una diferencia significativa en la distribución de densidad de carga entre **1** y **1'**, por lo que no se puede atribuir a la diferencia de actividad antitumoral de ambos complejos.

#### 6.4.2. Medidas de estabilidad para el complejo **3**.

Al realizar las primeras medidas de RMN del complejo **3**, nos dimos cuenta de que la sal  $\text{CoCl}_2$  se liberaba con facilidad de la esfera de coordinación. Por este motivo, decidimos llevar a cabo una serie de ensayos y estudios de estabilidad con el objetivo de entender mejor la química de este complejo.

El espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN medido a los 10 minutos, muestra la liberación de la unidad  $\{\text{CoCl}_2\}$  para dar como producto el complejo desprotonado  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{dmoPTA}-1\kappa\text{P})]^+$  (**2**) y el complejo  $[\text{Co}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2]$ .<sup>54</sup> La señal del ligando dmoPTA inicialmente a 211,35 ppm experimenta un desplazamiento hacia campos más altos (-6,94 ppm).

<sup>54</sup> B. Matijević, I. J. Zsigrai, M. Vraneš, S. B. Gadžurić, J. of Molecular Liquids, **2010**, 154, 82.

## 6. Resultados y discusión.

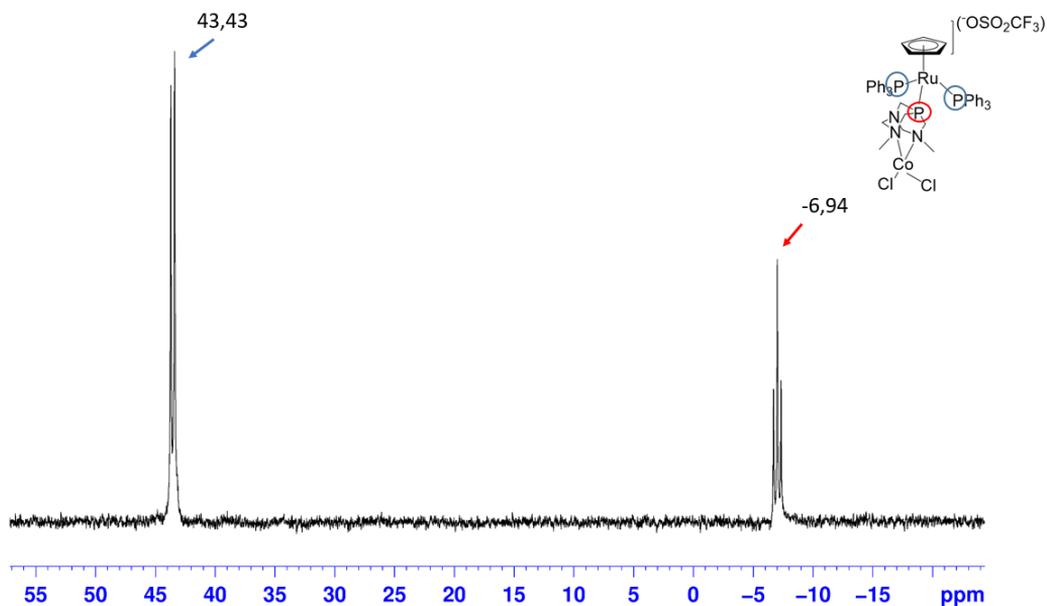


Figura 45. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **3** en DMSO- $d_6$ , bajo  $\text{N}_2$  y 25 °C.

La liberación de la sal de cobalto nos hizo plantearnos si la actividad biológica medida provenía realmente de **3** o si, por el contrario, procedía de **2** o de la sal de  $\text{CoCl}_2$ . Sin embargo, los resultados obtenidos de los ensayos biológicos de la sal de cobalto y del complejo **2** sugieren que la elevada actividad antitumoral no se debe ni al complejo desprotonado ni a la sal de cobalto correspondiente, sino al complejo bimetalico estudiado.

También hay que tener en cuenta que el protocolo general con el que se realizan los ensayos con los que se evalúa la actividad antiproliferativa frente a células vivas requieren la disolución inicial de los complejos en una mínima cantidad de DMSO. La disolución obtenida es rápidamente diluida con un volumen elevado de medio de cultivo. De esta forma, se consigue la disolución de la mayoría de compuestos químicos en el medio en que proliferan las células, evitando la mayoría de las veces la descomposición o transformación del compuesto que se ensaya. Como se ha visto, el  $\{\text{CoCl}_2\}$  es susceptible de coordinarse con el DMSO, dando lugar a complejos que podría poseer actividad antiproliferativa. Por ello, se

estudió tanto la actividad del complejo Ru-Co como aquella de  $\text{CoCl}_2$  en las mismas condiciones de ensayo. La estabilidad de **3** fue evaluada tanto en  $\text{DMSO-d}_6$  como en una disolución de  $\text{DMSO-d}_6$  a la que inmediatamente se le adicionó medio de cultivo. De este modo, se pudo estudiar de la forma más aproximada posible el comportamiento del complejo en un medio muy similar al utilizado en los ensayos biológicos.

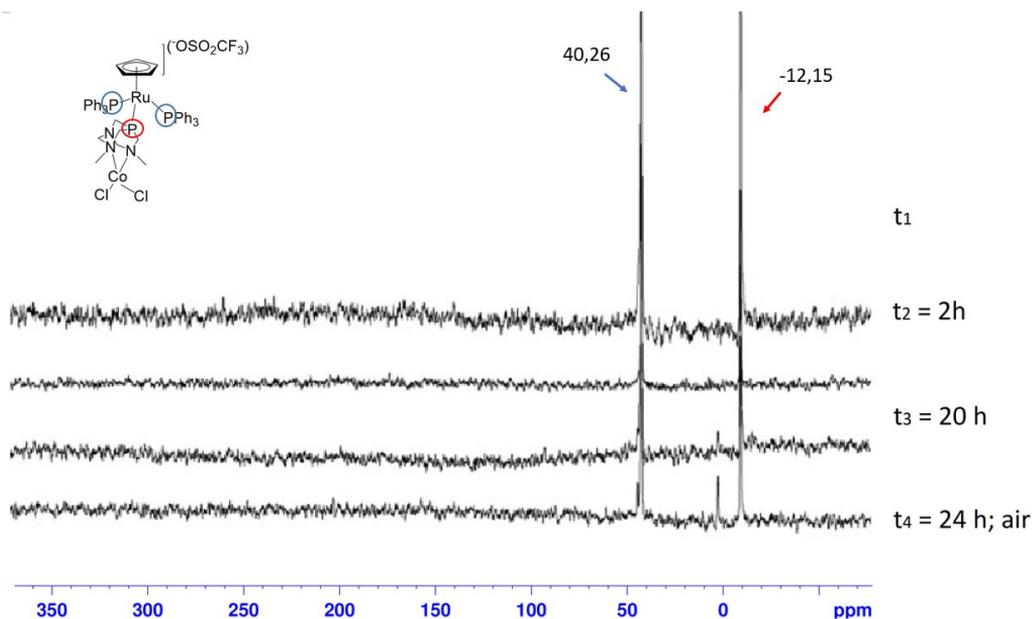


Figura 46. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **3** en  $\text{DMSO-d}_6$ , bajo  $\text{N}_2$  y  $25^\circ\text{C}$ .

Los resultados obtenidos fueron similares en ambos ensayos. Inicialmente, se observa que el complejo **3** libera lentamente una unidad  $\{\text{CoCl}_2\}$  hasta que empieza a liberar también una  $\text{PPh}_3$ . El ligando  $\text{PPh}_3$  se libera tan lentamente que tras 24 h de estudio solo un 5% del mismo fue observado mediante  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR. La presencia de aire en la disolución no tuvo un efecto significativo en la descomposición del complejo. Sin embargo, se observó cómo aumentaba la velocidad de dicha descomposición de forma similar en ambas reacciones al calentar los tubos a  $40^\circ\text{C}$ .

Con estos resultados, podemos deducir que **3** en una mezcla  $\text{DMSO}/$ medio de cultivo no libera la unidad  $\{\text{CoCl}_2\}$  de forma instantánea,

sino lentamente, por lo que el complejo no se descompondrá significativamente cuando se evalúe su actividad antiproliferativa mediante el protocolo general.

También quisimos comprobar si la presencia de  $\text{Cl}^-$  en el medio podía sustituir una de las  $\text{PPh}_3$  de **3** y formar así alguno de los complejos obtenidos anteriormente. Para ello, en un matraz con **3** previamente disuelto en 10 mL de DMSO y al que inmediatamente se adicionó 50 mL de agua, se añaden 5 equivalentes de NaCl. La disolución resultante se dejó agitando a temperatura ambiente durante toda la noche y al día siguiente se llevó a sequedad. El sólido obtenido se midió por RMN y mostró unas señales características de uno de los complejos sintetizados por nosotros anteriormente: el  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)(\text{HdmoPTA})-\kappa\text{P}]^+$ .<sup>57</sup> Por último, de la misma reacción se obtuvieron cristales apropiados para ser medidos mediante difracción de rayos-X y que terminaron de confirmar la estructura sugerida por el espectro de RMN, por lo que se muestra que el complejo  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)(\text{HdmoPTA})-\kappa\text{P}]^+$  se puede formar fácilmente en presencia de un exceso de  $\text{Cl}^-$ .

Se estudió la estabilidad de **3** en  $\text{CDCl}_3$ , ya que es en este disolvente en el cual se caracteriza el complejo además de un medio lipofílico. El espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN muestra la lenta liberación del ligando  $\text{PPh}_3$  y la posterior liberación de la unidad  $\{\text{CoCl}_2\}$ . Además, se observa que estas reacciones se aceleran cuando el tubo se calienta a 40 °C. Finalmente, tras 3 días se puede observar que el complejo **3** aún está presente en la reacción junto a las especies  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{dmoPTA}-\kappa\text{P})]^+$ ,  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)(\text{dmoPTA}-\kappa\text{P})]$  y  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)-\mu\text{-dmoPTA-}1\kappa\text{P:}2\kappa^2\text{N,N}'\text{-CoCl}_2]$ .

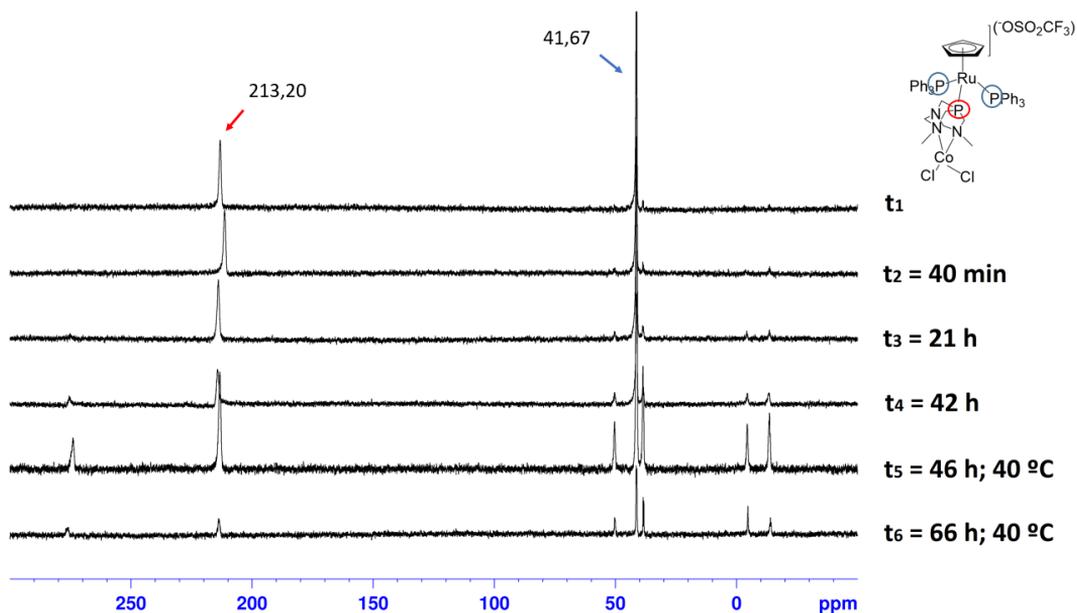


Figura 47. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **3** en  $\text{CDCl}_3$  frente al tiempo.

El intercambio del ligando  $\text{PPh}_3$  por un  $\text{Cl}^-$  ocurre en una proporción menor que en la liberación del  $\text{CoCl}_2$  al exponer el complejo en medio de cultivo, por lo que podemos asumir que este tipo de reacción ocurrirá en el interior celular. Al exponer **3** en un medio lipofílico como el  $\text{CDCl}_3$  se observa que este mismo intercambio de ligandos ocurre más rápidamente, así que es fácil asumir que cualquiera de los subproductos formados en disolución sea el responsable de la actividad antitumoral estudiada en **3**.

Para concretar el papel que tiene **3** en el medio celular, sería necesario un estudio más profundo tanto de la cinética de reacción del complejo como de su comportamiento en un entorno biológico.

#### 6.4.3. Estudios de estabilidad para el complejo **4**.

Para poder estudiar el comportamiento del complejo **4** en disolución, se procedió a realizar una serie de ensayos en distintos disolventes. Con esto, pretendíamos esclarecer la reactividad del complejo en medios

similares a los existentes durante los ensayos biológicos y así poder determinar la especie activa.

El estudio de estabilidad del complejo **4** en DMSO con medio de cultivo mostró resultados muy similares a los obtenidos para el complejo **3**: no se observó variación alguna las primeras 21 h a temperatura ambiente. Sin embargo, al calentar el tubo a 40 °C se empieza a apreciar la liberación de una pequeña proporción de PPh<sub>3</sub> en el medio.

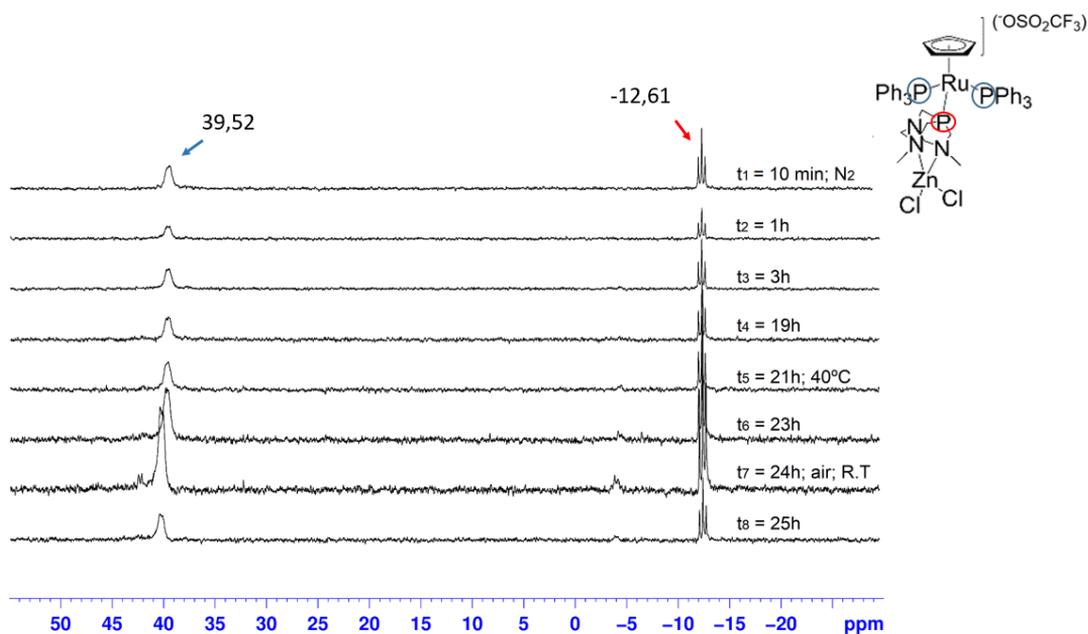


Figura 48. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **4** en DMSO- $d_6$ /medio celular frente al tiempo.

Este estudio se realizó primero a 25 °C y luego a 40 °C, y posteriormente se observó el comportamiento del complejo bajo N<sub>2</sub> y al aire.

Inicialmente se observan las señales características de **4** (dmpTA a -14.47 ppm; PPh<sub>3</sub> a 37,95 ppm), pero tras 2 h de estudio bajo N<sub>2</sub> y a temperatura ambiente, comenzaron a aparecer dos dobletes nuevos en el espectro en una proporción de aproximadamente 5%. Estas nuevas señales muestran un desplazamiento idéntico al encontrado para el complejo  $[\text{RuClCp}(\text{dmpTA}-\kappa\text{P})(\text{PPh}_3)]^{n+}$ , en un proceso de protonación /

desprotonación.<sup>44</sup> La formación de este complejo implica el intercambio del ligando  $\text{PPh}_3$  por un  $\text{Cl}^-$  en **4**, aunque el singlete característico de la  $\text{PPh}_3$  libre no se aprecia en el espectro. Tras tres días de estudio, la proporción de las señales permanecían estables así que el tubo se enfrió a  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  y se insufló aire mediante una jeringa durante 5 minutos. El espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN resultante y medido a temperatura ambiente mostró un singlete ancho que se correspondía con la señal característica de  $\text{O}=\text{PPh}_3$ . Las señales y la proporción entre ellas permanecieron inalterables incluso cuando la temperatura se elevó a  $40\text{ }^\circ\text{C}$ . Se podría decir, por tanto, que el complejo **4** en  $\text{CDCl}_3$  es más estable que el complejo **3** en las mismas condiciones.

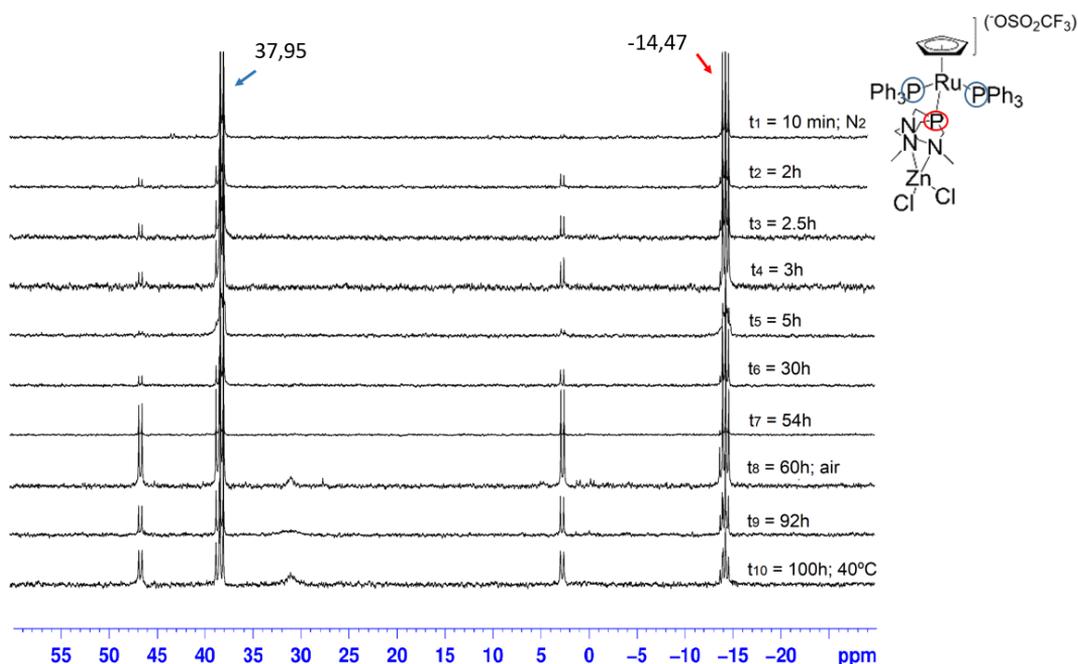


Figura 49. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **4** en  $\text{CDCl}_3$  frente al tiempo.

El estudio de **4** en un DMSO se realizó con el mismo propósito que para **3**. El espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN mostró una rápida liberación de la unidad  $\{\text{ZnCl}_2\}$  para dar como producto el complejo **2**; además, se observa también la liberación del ligando  $\text{PPh}_3$ , el cual ha sido intercambiado por una molécula de  $\text{Cl}^-$ . Esta liberación de la  $\text{PPh}_3$  también da como resultado

la formación de los complejos  $[\text{RuCpCl}(\text{dmoPTA-}\kappa\text{P})(\text{PPh}_3)]^{n+}$  ( $n = 0, 1$ ) y  $[\text{RuCpCl}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N}'\text{-ZnCl}_2]$  mediante un intercambio con  $\text{Cl}^-$ . Estas señales son fácilmente reconocibles al insuflar aire a la disolución mediante una jeringa. Tras tres días de estudios no se observaron más cambios en las señales.

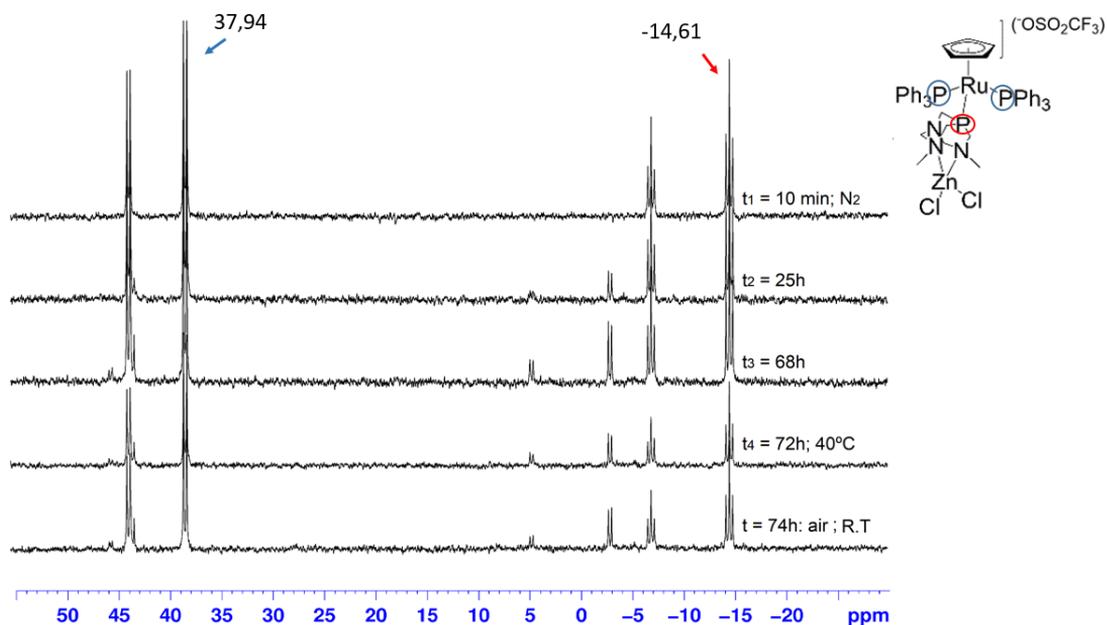
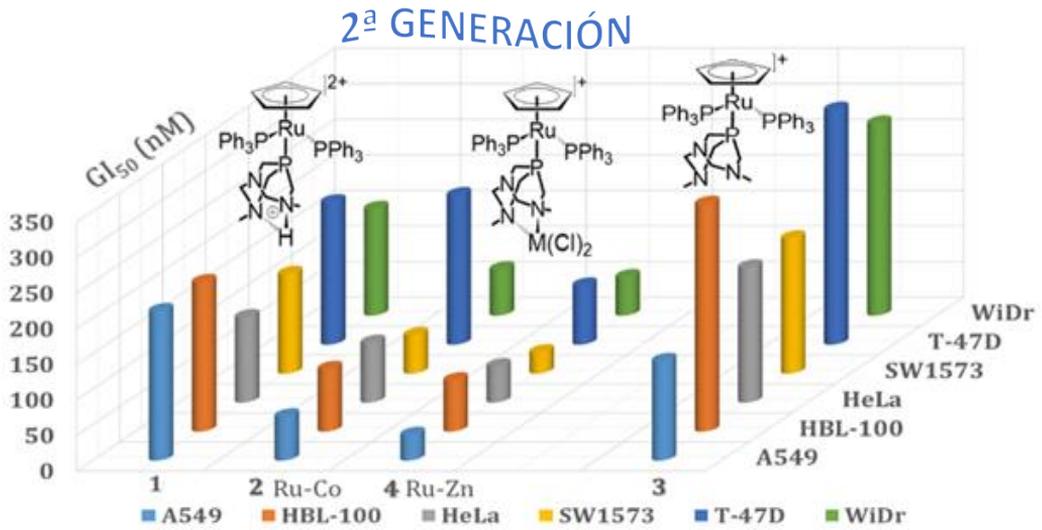


Figura 50. Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN de **4** en  $\text{DMSO-d}_6$  frente al tiempo.

En las medidas de estabilidad en  $\text{DMSO-d}_6$  se aprecia una mayor estabilidad del complejo **4** en relación al **3**. Asimismo, en las condiciones de reacción  $\text{DMSO-d}_6$ /medio celular, el complejo **4** muestra una significativa estabilidad durante el tiempo necesario para realizar los estudios de actividad antiproliferativa ( $\sim 48$  h). Es interesante destacar que existe una clara relación entre la mayor estabilidad del complejo **4**, su actividad antiproliferativa y su mejor selectividad, que es significativamente mejor que la observada para **3** y la de los complejos en los que se descompone; todo ello pese a la inactividad del  $\text{ZnCl}_2$ . No obstante, habría que hacer un extenso estudio para determinar el

mecanismo de acción en la célula y llegar a comprender las razones reales que determinan su clara excelente actividad (Figura 51).



**Figura 51.** Valores de GI<sub>50</sub> (nM) para los complejos organometálicos de rutenio de segunda generación contra líneas de células de tumores sólidos humanos A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.



# 7. Conclusiones /conclusions





## Conclusiones.

1. De acuerdo con los objetivos planteados, se han sintetizado los complejos de segunda generación  $[\text{RuCp}(\text{HdmoPTA})(\text{PPh}_3)]^{2+}$  y  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N}'\text{-M}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$ ;  $\text{M}^{\text{II}} = \text{Co}, \text{Zn}$ , con diferente balance lipofílico / lipofóbico respecto a los complejos  $[\text{RuClCp}(\text{HdmoPTA})(\text{PPh}_3)]^+$  y  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N}'\text{-M}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$ ;  $\text{M}^{\text{II}} = \text{Ni}, \text{Zn}$  de la primera generación.
2. Los ensayos antiproliferativos de **1** muestran una actividad superior a la de su complejo análogo  $[\text{RuClCp}(\text{HdmPTA})(\text{PPh}_3)](\text{SO}_3\text{CF}_3)$  (**1'**).
3. Los estudios realizados mediante citometría de flujo muestran que mientras que el cisplatino se acumula durante la fase S en A549, SW1573 y WiDr, el complejo **1** se acumula principalmente durante la fase G1. Por otro lado, para la línea celular de HeLa, el cisplatino tiende a acumularse durante la fase G1, mientras que **1** se acumula en la fase G2/M. Esto nos permite deducir que el mecanismo de acción del cisplatino difiere de aquella observada para el complejo **1**.
4. Los estudios teóricos realizados mediante DFT muestran que no hay una diferencia significativa en la distribución de carga entre los complejos **1** y **1'**, por lo que podemos sugerir que la diferencia de actividad antitumoral no es debida a posibles diferencias electrónicas y por lo tanto coordinativas en ambos complejos.
5. La desprotonación de **1** permitió la síntesis y caracterización del complejo monometálico  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{dmoPTA-1}\kappa\text{P})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$  (**2**); y la síntesis y caracterización de las especies bis-metálicas de fórmula general  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N}'\text{-MCl}_2](\text{OTf})$  [ $\text{M} = \text{Co}$  (**3**);  $\text{Zn}$  (**4**)].

6. Los estudios de solubilidad y estabilidad muestran que **2**, **3** y **4** son muy solubles en disolventes orgánicos como el  $\text{CHCl}_3$  o DMSO, y apenas solubles en agua. La estabilidad de estos complejos es suficientemente larga en el tiempo como para considerar que son las especies activas en los estudios de actividad biológica.
7. Los ensayos biológicos de **2** mostraron una actividad muy similar a **1**, lo que nos lleva a concluir que la presencia o ausencia del protón entre los  $\text{NCH}_3$  del ligando dmoPTA no es determinante en el mecanismo de acción del complejo.
8. Los ensayos biológicos de los complejos bimetálicos **3** (RuCo) y **4** (RuZn) muestran una actividad significativamente superior a los complejos **1** y **2**. A su vez, el complejo **4** tiene mejor actividad que **2** y **3**, probablemente por su mayor estabilidad en disolución. Esto nos permite suponer que, debido a una descomposición más lenta una mayor cantidad de complejo podría acceder al interior celular.
9. El estudio de la actividad antitumoral de las sales de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{ZnCl}_2$ , siguiendo el mismo protocolo usado para los complejos sintetizados, mostró que dichas especies son inactivas frente a las líneas tumorales estudiadas. Esto nos permite concluir que la actividad antitumoral se debe únicamente a los complejos sintetizados o a los derivados de los mismos en el medio celular.
10. En cualquier caso, los valores de  $\text{GI}_{50}$  obtenidos para **2**, **3** y **4** fueron siempre mejores que los del cisplatino.

## Conclusions.

1. According to the stated objectives, complexes of the second generation have been synthesized ( $[\text{RuCp}(\text{HdmoPTA})(\text{PPh}_3)]^{2+}$  and  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N}'\text{-M}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$ ;  $\text{M}^{\text{II}} = \text{Co}, \text{Zn}$ ) with different lipophilic/lipophobic balance when compared to the first generation complexes ( $[\text{RuClCp}(\text{HdmoPTA})(\text{PPh}_3)]^+$  and  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N}'\text{-M}^{\text{II}}\text{Cl}_2]$ ;  $\text{M}^{\text{II}} = \text{Ni}, \text{Zn}$ ).
2. The antiproliferative assays of **1** show an enhanced activity to that observed from its sibling complex  $[\text{RuClCp}(\text{HdmPTA})(\text{PPh}_3)](\text{SO}_3\text{CF}_3)$  (**1'**).
3. Studies performed by flow cytometry show that while cisplatin accumulates during the S phase in A549, SW1573 and WiDr lines, complex **1** accumulates mainly during the G1 phase. On the other hand, for the HeLa cell line, cisplatin tends to accumulate during the G1 phase, while **1** accumulates in the G2 / M phase. This allows us to deduce that the mechanism of action of **1** differs from that for cisplatin.
4. The theoretical studies performed by DFT showed that there is no significant difference in the charge distribution between **1** and **1'**. Therefore, it could be deduced that the difference in antiproliferative activity is not influenced by the electronic distribution in the complex.
5. Deprotonation of **1** allowed the synthesis and characterization of the monometallic complex  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{dmoPTA-1}\kappa\text{P})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$  (**2**); and the synthesis and characterization of bimetallic species of general formula  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P: 2}\kappa^2\text{N, N}'\text{-MCl}_2](\text{OTf})$  [ $\text{M} = \text{Co}$  (**3**);  $\text{Zn}$  (**4**)].

6. Solubility and stability studies show that **2**, **3** and **4** are very soluble in organic solvents such as  $\text{CHCl}_3$  or DMSO, and hardly soluble in water. The stability of these complexes remains constant for a sufficient time to consider that antiproliferative activity studies can give feasible information.
7. The biological assays of **2** showed that this compound shows an activity very similar to **1**, which leads us to conclude that the presence or absence of the proton between the  $\text{NCH}_3$  of the dmoPTA ligand is not determinant in the complex mechanism of action.
8. Biological assays of bimetallic complexes **3** (RuCo) and **4** (RuZn) show an activity significantly superior to complexes **1** and **2**. In turn, complex **4** has better activity than **2** and **3** probably because it is more stable in solution. These results suggest that due to its slower decomposition it is the complex which accesses into the cell, being the responsible of the large antiproliferative activity observed.
9. The salts  $\text{ZnCl}_2$  and  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  resulted inactive species against the studied tumor cell lines. This allows us to conclude that the observed antiproliferative activity for **3** and **4** is solely due to the synthesized complexes or to their derivatives formed in the culture cell medium.
10. In any case, the antiproliferative activity of the synthesized complexes were always superior to those measured for cisplatin.





# 8. Anexo I

---



## 8.1. Publicaciones:

### **8.1.1. Synthesis and Antiproliferative Activity of [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)](OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (HdmoPTA = 3,7-H-3,7-Dimethyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo[3.3.1]nonane).**

Zenaida Mendoza, Pablo Lorenzo-Luis, Manuel Serrano-Ruiz, Elva Martín-Batista, José M. Padrón, Franco Scalambra, y Antonio Romerosa.

Area de Química Inorgánica, Departamento Química, Facultad de Ciencias, Universidad de La Laguna,

Area de Química Inorgánica-CIESOL, Departamento de Física y Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Almería.

BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias, Universidad de La Laguna.



## Synthesis and Antiproliferative Activity of [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)](OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (HdmoPTA = 3,7-*H*-3,7-Dimethyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo[3.3.1]nonane)

Zenaida Mendoza,<sup>†</sup> Pablo Lorenzo-Luis,<sup>†</sup> Manuel Serrano-Ruiz,<sup>‡</sup> Elva Martín-Batista,<sup>§</sup> José M. Padrón,<sup>§</sup> Franco Scalambra,<sup>‡</sup> and Antonio Romerosa<sup>\*‡</sup>

<sup>†</sup>Sección de Química Inorgánica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de La Laguna, C/Astrofísico Francisco Sánchez 3, La Laguna 38200, Tenerife, Spain

<sup>‡</sup>Área de Química Inorgánica-CIESOL, Facultad de Ciencias, Universidad de Almería, Almería 04120, Spain

<sup>§</sup>BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias, Universidad de La Laguna, C/Astrofísico Francisco Sánchez 2, La Laguna 38200, Tenerife, Spain

### Supporting Information

**ABSTRACT:** The complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)](OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**2**; HdmoPTA = 3,7-*H*-3,7-dimethyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo[3.3.1]nonane) was synthesized and characterized. Its crystal structure was determined by single-crystal X-ray diffraction. The complex showed a more potent antiproliferative activity than cisplatin against a representative panel of human cancer cells.

Cancer is one of the plagues of our time that does not have a general and totally effective cure. The earliest studies by Rosenberg in 1965 on the antiproliferative activity of cisplatin and its FDA approval as a chemotherapeutic agent in 1979 led to this compound being one of the most clinically useful anticancer drugs.<sup>1</sup> Nevertheless, cisplatin is not active against all cancer forms and displays several undesirable side effects such as toxicity.<sup>2</sup> Many attempts are being focused on obtaining new valuable anticancer drugs that are effective, less toxic, and better tolerated.<sup>3</sup> The early experiments (1980s) with Ru-complexes showed that these compounds are active against HeLa with less toxicity than cisplatin.<sup>4</sup> Since these initial findings, new anticancer ruthenium-based therapeutic Ru-agents (Figure 1) have been obtained.<sup>3,5,6</sup>

In the past, we have been engaged in the synthesis of arene-ruthenium complexes [RuCpX(L)(L')]<sup>n+</sup> [X = Cl; L = PPh<sub>3</sub>; L' = 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) and *N*-methyl-1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (mPTA)], which showed good water solubility and active cytotoxic properties particularly on cisplatin-resistant cells.<sup>7</sup> The outcome of those studies pointed out that the same basic structure with new PTA derivatives could provide more active anticancer agents.

With this aim, the ruthenium complex [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)](OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**1**), containing the new PTA derivative 3,7-*H*-3,7-dimethyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo[3.3.1]nonane (HdmoPTA), was obtained.<sup>8</sup>

Complex **1** was identified as an antiproliferative compound against a panel of representative human solid tumor cell lines (Table 1). Nevertheless, the antiproliferative properties of this complex were found to be clearly different from those of their parent complexes.<sup>9</sup>

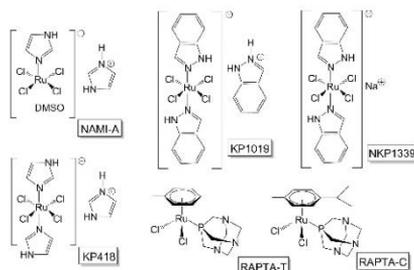


Figure 1. Some known ruthenium complexes with significant anticancer and antimetastatic activity.

Table 1. GI<sub>50</sub> Values of Complexes **1** and **2** and Cisplatin against Human Solid Tumor Cells Lines<sup>a</sup>

	cell line (origin)				
	A549 (lung)	HeLa (cervix)	SW1573 (lung)	T-47D (breast)	WiDr (colon)
<b>1</b>		2.6 (±0.2)	1.5 (±0.1)	1.9 (±0.5)	1.7 (±0.4)
<b>2</b>	0.29 (±0.09)	0.17 (±0.04)	0.20 (±0.02)	0.25 (±0.04)	0.20 (±0.03)
cisplatin	4.9 (±0.2)	1.8 (±0.5)	2.7 (±0.4)	17 (±3.3)	23 (±4.3)

<sup>a</sup>Values are given in micromolar and are the means of at least three experiments (±standard deviation).

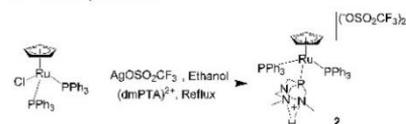
Substitution of the proton in HdmoPTA by a metal provided the bis-heterometal complexes [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>-N,N'-MCl<sub>2</sub>] (M = Co, Ni, Zn),<sup>10a</sup> which showed antiproliferative activity similar to that of **1**.<sup>9</sup> This fact suggested that the biological activity of these complexes could implicate exchange of the chlorine bonded to the ruthenium, as observed for platinum complexes.<sup>4</sup> To investigate this possibility, the

Received: June 6, 2016

Published: July 27, 2016

parent complex  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{HdmoPTA})](\text{OSO}_2\text{CF}_3)_2$  (**2**), which does not contain chlorine bonded to the metal, was synthesized (see S1) by the reaction of  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)_2]$  with  $\text{Ag}(\text{OSO}_2\text{CF}_3)$  and  $\text{dmPTA}(\text{OSO}_2\text{CF}_3)_2$  ( $\text{dmPTA} = N,N'$ -dimethyl-1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane; Scheme 1).<sup>8</sup>

Scheme 1. Synthesis of **2**



Complex **2** is soluble in organic solvents such as chloroform, acetone, methanol, and dimethyl sulfoxide (DMSO) and mostly insoluble in water [ $S_{25,\text{H}_2\text{O}} = 0.2 \text{ mg/cm}^3$ ]. The complex remains unaltered in DMSO and DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  solutions under air for more than 2 h at both room temperature and 38 °C. Its  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) displays a characteristic  $\eta^5\text{-Cp}$  singlet at 4.90 ppm, which is shifted to low field with respect to its corresponding singlet in **1** (4.56 ppm) in acetone- $d_6$ . Two contiguous broad singlets are due to both HdmoPTA- $\text{NCH}_3$  groups at 2.35 and 2.36 ppm (6 H), which resemble those of the  $\text{NCH}_3$  groups in **1** (2.49 ppm).<sup>8</sup> Finally, the multiplet at 1.25 ppm (1 H) corresponds to the H atom shared between both  $\text{N}_{\text{CH}_3}$  atoms (Figure S1).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR in  $\text{CDCl}_3$  shows a doublet at 38.44 ppm and a triplet at  $-13.94$  ppm due to two  $\text{PPh}_3$  and one HdmoPTA coordinated by the P atom in spite of the fact that those chemical shifts are quite different from those in complex **1** (46.13 and  $-1.80$  ppm) in acetone- $d_6$ .

The crystal structure of **2** was determined by single-crystal X-ray diffraction and is shown in Figure 2 (Table S1). The

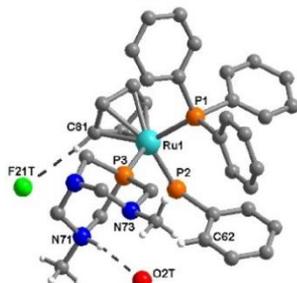


Figure 2. Perspective drawing of **2** with atom numbering. Dashed lines for  $\text{N73}\cdots\text{H71}$  [2.178(4) Å] and  $\text{O2T}\cdots\text{H62}$  [2.578(4) Å] were omitted.

crystallographic study confirmed that the coordination sphere of the Ru atom is a distorted pseudooctahedron constituted of a  $\eta^5\text{-Cp}$ , two  $\text{PPh}_3$ , and a HdmoPTA bonded by the P atom. The bond distances being similar to those found in parent Cp piano-stool complexes.<sup>8,10,11</sup>

Furthermore, O2T is located at 2.814(6) Å from N71, a bond length that supports the hydrogen-bonding interaction  $\text{N71}\cdots\text{H71}\cdots\text{O2T}$ . Likewise, the crystal-packing diagram is strength-

ened by another weak intermolecular and the  $\text{C}-\text{H}/\pi$  interactions<sup>12</sup> (Figure S5).

The antiproliferative activity of **2** was studied in a panel of representative human solid tumor cell lines.<sup>13</sup> The results expressed as  $\text{GI}_{50}$  are given in Table 1. Overall, the  $\text{GI}_{50}$  values of **2** against all cell lines were in the range 0.17–0.29  $\mu\text{M}$ , which are significantly lower than those for cisplatin and complex **1**. Significant differences between the antiproliferative activity of **2** and cisplatin were observed for T-47D (ca. 70:1) and WiDr ( $>100:1$ ) cells, which are more cisplatin-resistant.<sup>9</sup>

To the best of our knowledge, the antiproliferative activity of **2** against human solid tumor cell lines is among the largest known.<sup>14</sup>

The main structural difference between **1** and **2** is the presence of one or two  $\text{PPh}_3$  groups, respectively. Enhancement of the biological activity due to the addition of  $\text{PPh}_3$  ligands has been reported for other ruthenium complexes.<sup>15</sup> This result is consistent with the reported findings for **1** and **2** and with our previous observations of the parent PTA and HPTA complexes,<sup>10b</sup> which resulted inactive ( $\text{GI}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) in all cell lines (unpublished results). Noteworthy, the presence of  $\text{PPh}_3$  groups is not always enough to ensure an antiproliferative effect. Solubility of the complexes also plays a crucial role. Precursor  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)_2]$  is insoluble under the NCI protocol requirements and therefore could not be tested.<sup>13</sup>

Next, we examined the cell cycle phase distribution by flow cytometry<sup>13</sup> to determine whether cell growth inhibition caused by compound **2** involved cell cycle changes (Figure 3 and Table S6). Contrary to cisplatin, which induces accumulation in the S phase of A549, SW1573, and WiDr cells, we found that the ruthenium complex **2** produced accumulation at the G1 phase.

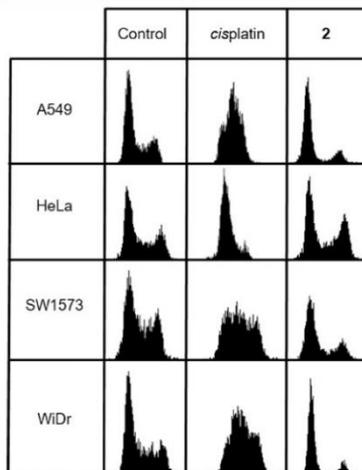


Figure 3. Histogram of untreated cells (C) and cells treated (drug dose in  $\mu\text{M}$ ) for 24 h with cisplatin (CDDP) and complex **2**. Cells were exposed to cisplatin at 10  $\mu\text{M}$  (A549, HeLa, and SW1573) or 20  $\mu\text{M}$  (WiDr) and to complex **2** at 0.5  $\mu\text{M}$ .

However, in HeLa cells, cisplatin is known to induce accumulation at the G1 phase.<sup>16</sup> Interestingly, compound **2** produced an increase of the G2/M compartment in HeLa. These results clearly indicate that the mechanism of action of the new compound differs from that of cisplatin.

Liu and Sadler<sup>17</sup> have shown that the insertion of a coordinated aromatic ligand able to intercalate into DNA provides some metal complexes with a dual mode of binding, which exhibit stronger cytotoxicity toward cancer cells than the nonintercalating counterparts.<sup>18</sup> Cell cycle experiments, together with our previous finding for complex **1**,<sup>9</sup> allow us to discard DNA as the main biological target for compound **2**. It has been described that ruthenium compounds might directly interfere with proteins.<sup>14b</sup> At present, this extent has not been confirmed for complex **2**.

Another point to study is the role of the positively charged complex, which might be essential to force interaction with the negatively charged cell membrane. Complexes **1** and **2** were modeled by density functional theory (DFT).<sup>19,20</sup> The largest bond distance differences with respect to those in the crystal structures were found for Ru–P bonds: +8.7% for Ru1–P1 in **1** and +10.5% for Ru1–P2 in **2**.

The charge distributions on the phenyl rings of **1** and **2** do not differ significantly. Therefore, the electronic distributions in both complexes are similar and could not justify the large antiproliferative activity differences between them. Nevertheless, the separation between both almost parallel (Figure S4) phenyl rings C21–C26 and C61–C66 (Figure S5) could be involved in the exceptional antiproliferative activity of **2**.<sup>21</sup> Nonetheless, other possible mechanisms have been identified for ruthenium complexes,<sup>14</sup> and therefore further studies outside the scope of this work will be necessary to depict the mechanism of action of **2**.

In conclusion, complex **2** displays antiproliferative activity much higher than those of most of the known platinum drugs and ruthenium complexes. Experimental and theoretical studies are in progress to determine the specific mechanism of action of complex **2** against cancer cells as well as the synthesis of parent ruthenium complexes containing HdmoPTA.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b01207.

Experimental procedures, NMR, growth inhibition assays, selected X-ray crystallographic data of **2**, DFT details for **1** and **2**, and histogram of human solid tumor cells (PDF) X-ray crystallographic data of complex **2** (CCDC 1465060) (CIF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: romerosa@ual.es.

### Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

European Commission FEDER, Projects CTQ2015-67384-R (MINECO) and P09-FQM-5402 (Junta de Andalucía), PAI group FQM-317 and COST Action CM1302 (WG1, WG2). M.S.-R. thanks Excellence Project P09-FQM-5402 for a postdoctoral contract, F.S. to the U. of Almería for a predoctoral grant, and J.M.P. the EU Research Potential (FP7-REGPOT-2012-CT2012-31637-IMBRAIN).

## ■ REFERENCES

- (1) Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R. *Dalton Trans.* **2010**, 39, 8113–8127.
- (2) Wang, X.; Guo, Z. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 202–224.
- (3) Spreckelmeyer, S.; Orvig, C.; Casini, A. *Molecules* **2014**, *19*, 15584–15610.
- (4) Clarke, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 69–93.
- (5) (a) Ang, W. H.; Daldini, E.; Sclaro, C.; Scopelliti, R.; Juillerat-Jeannerat, L.; Dyson, P. J. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9006–9013. (b) Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3–25.
- (6) Allardyce, C. S.; Dorcier, A.; Sclaro, C.; Dyson, P. J. *Appl. Organomet. Chem.* **2005**, *19*, 1–10.
- (7) (a) Akbayeva, D. N.; Gonsalvi, L.; Oberhauser, W.; Peruzzini, M.; Vizza, F.; Brüggeller, P.; Romero, A.; Sava, G.; Bergamo, A. *Chem. Commun.* **2003**, 264–265. (b) Romero, A.; Campos-Malpartida, T.; Lidrissi, C.; Saoud, M.; Serrano-Ruiz, M.; Peruzzini, M.; Garrido-Cárdenas, J. A.; García-Maroto, F. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 1289–1298.
- (8) Mena-Cruz, A.; Lorenzo-Luis, P.; Romero, A.; Saoud, M.; Serrano-Ruiz, M. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6120–6128.
- (9) Ríos-Luci, C.; León, L. G.; Mena-Cruz, A.; Pérez-Roth, E.; Lorenzo-Luis, P.; Romero, A.; Padrón, J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4568–4571.
- (10) (a) Serrano-Ruiz, M.; Aguilera-Sáez, L. M.; Lorenzo-Luis, P.; Padrón, J. M.; Romero, A. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 11212–11219. (b) Serrano-Ruiz, M.; Lorenzo-Luis, P.; Romero, A.; Mena-Cruz, A. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 7622–7630.
- (11) Sapunov, V. N.; Mereiter, K.; Schmid, R.; Kirchner, K. *J. Organomet. Chem.* **1997**, *530*, 105–115.
- (12) Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210–1250.
- (13) Nieto, D.; Bruña, S.; González-Vadillo, A. M.; Perles, J.; Carrillo-Hemosilla, F.; Antiñolo, A.; Padrón, J. M.; Plata, G. B.; Cuadrado, I. *Organometallics* **2015**, *34*, 5407–5417.
- (14) (a) Wani, W. A.; Prashar, S.; Shreez, S.; Gómez-Ruiz, S. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *312*, 67–98. (b) Furrer, J.; Süß-Fink, G. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *309*, 36–50.
- (15) Côte-Real, L.; Robalo, M. P.; Marques, F.; Nogueira, G.; Avelilla, F.; Silva, T. J. L.; Santos, F. C.; Tomaz, A. I.; Garcia, M. H.; Valente, A. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *150*, 148–159.
- (16) Larasati, Y. A.; Putri, D. D. P.; Utomo, R. Y.; Hermawan, A.; Meiyanto, E. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2014**, *4*, 14–19.
- (17) Liu, H.-K.; Sadler, P. J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 349–359.
- (18) Bugarcic, T.; Nováková, O.; Zerzánková, L.; Vrána, O.; Kašpárková, J.; Habtemariam, A.; Parsons, S.; Sadler, P. J.; Brabec, V. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5310–5319.
- (19) (a) Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern quantum chemistry*; Dover Publications Inc.: Mineola, NY, 1996. (b) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1372–1377.
- (20) Valiev, M.; Bylaska, E. J.; Govind, N.; Kowalski, K.; Straatsma, T. P.; Van Dam, H. J. J.; Wang, D.; Nieplocha, J.; Apra, E.; Windus, T. L.; de Jong, W. A. *Comput. Phys. Commun.* **2010**, *181*, 1477–1489.
- (21) Hall, J. P.; Beer, H.; Buchner, K.; Cardin, D. J.; Cardin, C. J. *Organometallics* **2015**, *34*, 2481–2486.



**8.1.2. Enhancement of the antiproliferative activity of [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dmoPTA-1κP)]<sup>+</sup> via its coordination to one {CoCl<sub>2</sub>} unit: synthesis, crystal structure and properties of [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-CoCl<sub>2</sub>](OTf)·0.25H<sub>2</sub>O.**

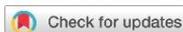
Zenaida Mendoza, Pablo Lorenzo-Luis, Franco Scalambra, José M. Padrón, y Antonio Romerosa.

Area de Química Inorgánica, Departamento Química, Facultad de Ciencias, Universidad de La Laguna,

Area de Química Inorgánica-CIESOL, Departamento de Física y Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Almería.

BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias, Universidad de La Laguna.





Cite this: DOI: 10.1039/c7dt01741c

Received 12th May 2017,  
Accepted 31st May 2017

DOI: 10.1039/c7dt01741c

rsc.li/dalton

## Enhancement of the antiproliferative activity of [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dmoPTA-1κP)]<sup>+</sup> via its coordination to one {CoCl<sub>2</sub>} unit: synthesis, crystal structure and properties of [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-CoCl<sub>2</sub>](OTf)·0.25H<sub>2</sub>O<sup>†</sup>

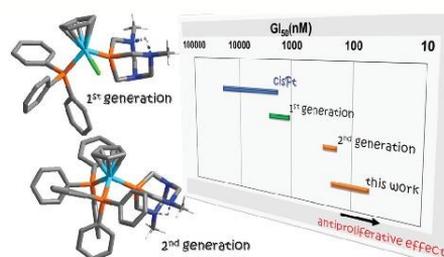
Zenaïda Mendoza,<sup>a</sup> Pablo Lorenzo-Luis,<sup>b</sup> Franco Scalambra,<sup>b</sup> José M. Padrón<sup>c</sup> and Antonio Romerosa<sup>b,\*</sup>

**Synthesis, characterization and the antiproliferative activity of a new bimetallic complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-CoCl<sub>2</sub>](OTf)·0.25H<sub>2</sub>O are described. The stability of the complex was studied under air and N<sub>2</sub> atmospheres and in CDCl<sub>3</sub>, DMSO, water and the cell culture medium, at room temperature and 40 °C. The complex showed an enhanced antiproliferative activity (up to six-fold) when compared with its parent complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)]<sup>2+</sup> against human lung, cervix, breast, and colon solid tumor cell lines.**

The biological activity of a metal complex depends on its components, metals and ligands, but also on its behaviour in a cellular medium, as shown by the intense research targeted since 1965 to understand how the first found antiproliferative active complex, cisplatin,<sup>1</sup> acts. Despite this long passage of time, this complex continues to be in medical use although it has adverse effects on patients and its activity remains unknown.<sup>2</sup> Replacing platinum is mandatory to obtain less toxic and low-cost metal complexes but active against cancers.<sup>3</sup> Organometallic complexes have shown interesting antiproliferative activity.<sup>4</sup> In particular, {Ru-η<sup>6</sup>-arene}-complexes incorporating aqua-soluble phosphines have attracted considerable interest due to their hydrophilic phosphane coligands and the possibility of the inclusion of labile groups prone to be substituted.<sup>5</sup> Nowadays, the study of the mechanism of action of these complexes is in progress as it has been proved that it

proceeds through a different path than that known for platinum complexes.<sup>1–6</sup>

Recently, we had observed that the ruthenium complex [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)(HdmoPTA)]<sup>+</sup>, containing the ligand HdmoPTA<sup>+</sup> (HdmoPTA = 3,7-*H*-3,7-dimethyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo [3.3.1]nonane),<sup>7</sup> (the so-called 1<sup>st</sup> generation, Fig. 1) showed one of the strongest abilities to inhibit the proliferation of human cancer cell lines *in vitro*.<sup>8</sup> Notably, this complex exhibits an excellent antiproliferative profile against the colon cancer cell line WiDr (GI<sub>50</sub> = 1.7 μM), which is known to exhibit a high resistance to cisplatin exposure. Our early results have demonstrated that the ligand (HdmoPTA)<sup>+</sup> is able to coordinate with both P and N<sub>CH<sub>3</sub></sub> atoms,<sup>7</sup> giving rise to bis-heterometallic complexes with different antiproliferative activities. They showed GI<sub>50</sub> values in the range of 0.8–6.5 μM, which are comparable to those obtained for the standard anti-cancer drug cisplatin.<sup>8,9</sup> A step ahead in the synthesis of more active antiproliferative complexes was obtained by exchanging the Cl by a PPh<sub>3</sub> in [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)(HdmoPTA)]<sup>+</sup>, leading to a



**Fig. 1** Antiproliferative activity of cisplatin, 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> generation HdmoPTA-Ru and the complex presented in this work against human solid tumour cell lines A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T47D and WiDr, indicated as a range.

<sup>a</sup>Inorganic Chemistry Section, Chemistry Department, Faculty of Science, University of La Laguna, 38071 La Laguna, Tenerife, Spain. E-mail: plorenzo@ull.es

<sup>b</sup>Area de Química Inorgánica-CIESOL, Facultad de Ciencias, Universidad de Almería, Almería, Spain. E-mail: romerosa@ua.es

<sup>c</sup>BioLab, Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" (IUBO-AG), Universidad de La Laguna, C/Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Spain. E-mail: jmpadron@ull.es

<sup>†</sup> Electronic supplementary information (ESI) available: Synthesis, <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR characterisation and growth cell cycle (PDF), CCDC 1545888. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c7dt01741c

**Table 1**  $GI_{50}$  values ( $\mu\text{M}$ ) of complexes **1-2OTf**<sup>a</sup>, **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O**<sup>b</sup> and cisplatin against several human solid tumor cell lines

Cell line (origin)	A549 (lung)	HBL-100 (breast)	HeLa (cervix)	SW1573 (lung)	T-47D (breast)	WiDr (colon)
<b>1</b>	0.29 (0.09)	0.21 (0.04)	0.17 (0.04)	0.20 (0.02)	0.25 (0.04)	0.20 (0.03)
<b>2</b>	0.062 (0.019)	0.088 (0.008)	0.084 (0.022)	0.054 (0.013)	0.21 (0.05)	0.065 (0.010)
cisPt	4.9 (0.2)	1.9 (0.2)	1.8 (0.5)	2.7 (0.4)	17 (3.3)	23 (4.3)

<sup>a</sup> From ref. 1. <sup>b</sup> Means of at least three experiments.

new complex  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{HdmoPTA})]^{2+}$  (**1**) (the so-called 2<sup>nd</sup> generation, Fig. 1). The antiproliferative activity of **1-2OTf** against human lung, cervix, breast, and colon solid tumor cell lines ( $GI_{50} = 0.17\text{--}0.29\ \mu\text{M}$ , Table 1) was much higher than that observed for  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)(\text{HdmoPTA})]^+$  but also for the known platinum drugs and the ruthenium complexes described until now.<sup>1</sup>

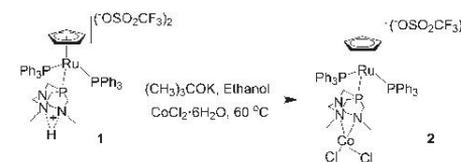
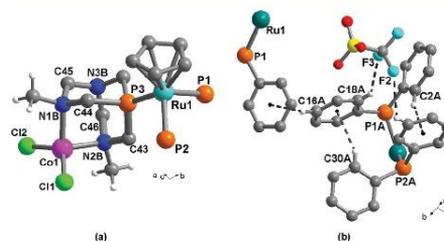
Altogether, the obtained results suggested that our next step should be targeted to the synthesis of bis-heterometallic complexes by coordination of a metal unit to  $\text{dmoPTA-N}_{\text{CH}_3}$  atoms of **1**, expecting that the resulting bis-metallic complex shows an enlarged activity than the starting complex and previous complexes,  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)(\text{HdmoPTA})]^+$  and  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)_2\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-MQ}]$  (M = Co, Ni, Zn; Q = acac, Cl<sub>2</sub>).<sup>9,9</sup> Herein we report the synthesis, spectroscopic characterization and X-ray crystal structure of the Ru-Co complex  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-CoCl}_2](\text{OTf})_2\cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$  (**2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O**), and its antiproliferative activity against a panel of human cell lines.

The synthesis of **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** (Scheme 1) was achieved by the deprotonation of  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{HdmoPTA})](\text{OTf})_2$  (**1-2OTf**) with potassium *tert*-butoxide and further reaction with  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

Single crystals, good enough for their analysis, by single crystal X-ray diffraction were obtained by evaporating at room temperature under nitrogen from an EtOH solution of **2** (ESI<sup>†</sup>). Complex **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** was found to be sparingly soluble in water ( $S_{25\ ^\circ\text{C},\text{H}_2\text{O}} < 0.5\ \text{mg mL}^{-1}$ ) but soluble in a range of organic solvents such as chloroform ( $S_{25\ ^\circ\text{C},\text{CHCl}_3} > 97.3\ \text{mg mL}^{-1}$ ). Its <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR (CDCl<sub>3</sub>) shows a multiplet at 211.35 ppm and a doublet at 40.77 ppm, far away from the chemical shift observed in **1-2OTf** ( $\Delta\delta (2_{\text{dmoPTA}} - 1_{\text{HdmoPTA}}) = 172.75\ \text{ppm}$ ;  $\Delta\delta (2_{\text{PPh}_3} - 1_{\text{PPh}_3}) = 54.86\ \text{ppm}$ ), as a consequence of the paramagnetism of the Co(II) coordinates to the  $\text{dmoPTA-N}_{\text{CH}_3}$ . A similar behavior was observed for the parent

bimetallic complexes  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)_2\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-Co}^{\text{II}}\text{Q}]$  (Q = acac, Cl<sub>2</sub>).<sup>9,10</sup> The <sup>1</sup>H NMR signals were not possible to assign undoubtedly except for <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR signals for aromatics (141.32–127.71 ppm) and Cp (91.03 ppm, which is shifted 5.54 ppm to that found in **1**).

The determination of the crystal structure (see the ESI<sup>†</sup> for the data) of this complex provided the final support to its Ru-Co bimetallic character. The crystal structure is shown in Fig. 2, and the selected crystallographic parameters, bonds and angles are respectively displayed in Tables S1, S2 and S3.<sup>†</sup> The asymmetric unit of **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** is constituted of two bi-metallic cationic complexes  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-CoCl}_2]^+$ , two OTf anions and two disordered 0.25 water molecules. The distribution of ligands around rutheniums (Fig. 2a) in both complex molecules is basically the same as those found for previous structures containing HdmoPTA-Ru.<sup>1,7</sup> The coordination  $\text{P}_{\text{dmoPTA}}\text{-Ru}$  distance is found to be 2.370(9) Å, which is slightly shorter than that in **1** (2.3208(1) Å)<sup>1</sup> but greater than that found for  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)(\text{HdmoPTA})]$  (2.2767(3) Å).<sup>7</sup> The  $\text{P}_{\text{PPh}_3}\text{-Ru}$  distances are similar in one of the molecules (2.378(4) Å, 2.370(9) Å), which are similar to those in **1** (average value: 2.3777 Å), but significantly different from the other one (2.2911(9) Å, 2.3438(8) Å). Interestingly, the P1–Ru1–P3 angle in **2** is shorter than that in **1** (92.77(3)<sup>o</sup> versus 96.58(4)<sup>o</sup>) but **2** shows the largest angle (P2–Ru1–P3 = 99.73(3)<sup>o</sup>). This angle is also larger than those in bis-metallic complexes  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{dmoPTA-MCl}_2]$  (M = Ni, Zn) (av. 96.8<sup>o</sup>)<sup>9</sup> and  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{dmoPTA-M}(\text{acac-}\kappa^2\text{O},\text{O}')_2]$  (M = Co, Ni, Zn) (av. 99.0<sup>o</sup>).<sup>10</sup> Additionally, the angle Cl3–Co1–Cl2 in **2**

**Scheme 1** Synthesis of **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O**.**Fig. 2** A ball and stick perspective drawing of **2** (a). Dashed lines represent the selected intermolecular interactions (b). For the sake of clarity most of the hydrogen atoms and the dashed lines C23A–H23A...F2 are omitted.

is found to be 126.7(10)°, which is in the range of those found in complexes [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>dmoPTA-MCl<sub>2</sub>] [M = Ni (129.4(3)°), Zn (121.8(6)°)], and unfortunately the respective complex with M = Co(II) has not been structurally characterized yet.<sup>9</sup> No significant differences were found in the rest of the bond distances and angles with respect to parent dmoPTA-cyclopentadienyl Ru(II) complexes. The crystal packing diagram (Fig. 2b) shows weak intermolecular interactions among the molecules (C18A–H18A...F3 = 3.458(4), C23A–H23A...F2 = 3.259(4) Å) and C–H/π interactions between the aromatic centroid and the adjacent phenyl–C–H groups (centroid-to-C–H distances from 3.311(3) Å to 3.463(4) Å), which probably provide an additional stabilization of the structure of the complex.<sup>1</sup>

The antiproliferative activity tests of **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** using the standard protocol (see the ESI†) on six humans' solid tumour cell lines together with those for **1-2OTf** and cisplatin, which were also tested at the same time for the sake of comparison, are shown in Table 1.

Complex **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** showed an enhanced antiproliferative activity in five of the six cell lines tested with respect to **1-2OTf** and much better activity than cisplatin. In addition, the salt CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O was tested, confirming that it is inactive against cell lines checked. Next, we studied the effect of complex **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** on the cell cycle of the same panel of tumour cell lines (Fig. S8†). Similarly to that observed for complex **1-2OTf**,<sup>1</sup> the exposure of studied cell lines to **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** produces the accumulation of cells in the G<sub>1</sub> compartment of the cell cycle. From this result we anticipate that both complexes show a similar mechanism of action against the studied cell lines.

Complex **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** in DMSO-d<sub>6</sub> at room temperature releases the {CoCl<sub>2</sub>} unit in 10 min, which is transformed in the [Co(DMSO)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] complex,<sup>11</sup> to provide the neutral deprotonated complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dmoPTA)]<sup>+</sup>. In contrast, the addition of DMSO and a quick further addition of water or the cell culture medium avoid the fast elimination of the {CoCl<sub>2</sub>} unit. Therefore, the protocol to study the antiproliferative activity of **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** does not produce a fast decomposition of the compound. The evolution of a similar solution at room temperature and 40 °C showed that the complete release of the {CoCl<sub>2</sub>} unit was achieved after 2 hours. Furthermore, an additional reaction was observed: the elimination of one PPh<sub>3</sub> molecule. This reaction is so slow that after 24 h at room temperature and 16 h at 40 °C only a 5% of the phosphine was eliminated. When a similar reaction was performed but containing 5 eq. of NaCl, one of the PPh<sub>3</sub> molecules in **2** was exchanged by Cl<sup>-</sup>, giving rise to the stoichiometric production of the complex [RuClCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA)]<sup>+</sup>.<sup>7</sup> However, in a lipophilic environment the behavior of **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** was shown to be different. In a CDCl<sub>3</sub> solution, the complex first releases a PPh<sub>3</sub> molecule and further the {CoCl<sub>2</sub>} unit, indicating that its stability is quite dependent on the environment.

In summary, the obtained results indicate that the coordination of a {CoCl<sub>2</sub>} unit to **1-HdmoPTA-N<sub>CH</sub>** atoms leads to a new bis-metallic complex with enhanced antiproliferative activity than the starting complex **1-2OTf**, which was one of the

most active anticancer agents known until now. The NMR studies targeted to know how stable is the complex **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** in the cell culture medium, pointing out that the Co-unit is released slowly but at the moment there is no evidence to know if this reaction is significantly occurring before **2** goes into the cancer cell. In any case the CoCl<sub>2</sub> salt was found to be inactive against the studied cancer cells.<sup>12</sup> This result supports that this salt outside the cell could not be responsible for the enhanced activity of **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O**, but inside the cell it could act as an antiproliferative agent and/or synergize the activity of other compounds. If this is correct, complex **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** acts as a “Trojan horse” to introduce the {CoCl<sub>2</sub>} unit into the cell. It is important to stress that cobalt is an essential microelement in the human body, playing an important physiological role in the metabolism of iron, synthesis of hemoglobin, methionine metabolism and as a component of vitamin B<sub>12</sub>.<sup>13</sup> The exchange of one of the PPh<sub>3</sub> bonded to the metal by a ligand in the solution was also observed. This reaction occurs with a rate lower than the previously indicated release of the {CoCl<sub>2</sub>} unit in the cell culture medium. It is reasonable to assume that this reaction should occur in the cell. This reaction was observed to be the fastest one when the complex was dissolved in a lipophilic solvent such as CDCl<sub>3</sub>. Therefore, not only **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** but also products formed by its decomposition could be really responsible for its very high antiproliferative activity. However, it is evident that the combination of the metal units containing Ru and Co in **2** leads to a significant enhancement of the antiproliferative activity of both metal units.

More detailed kinetic studies and biological experiments would be necessary to establish the exact role of all possible products derived from **2-OTf-0.25H<sub>2</sub>O** and to understand how this compound shows a very high antiproliferative activity, better than most of the known metal complexes.<sup>14</sup> Additionally, new bis-metallic Ru–M complexes are being synthesized to know whether metals different from Co also produce similar active antiproliferative compounds. Our findings open the possibility to develop new organometallic drugs that can rely on selecting metals and ligands to modulate the pharmacological properties of the final drug.

Thanks are due to the European Commission FEDER program for co-financing the project CTQ2015-67384-R (MINECO), the Junta de Andalucía PAI-research group FQM-317 and the COST Action CM1302 (WG1, WG2). Z. M. is grateful to the University of La Laguna (ULL) for a predoctoral grant. Thanks are given also to D. Bowron (ISIS-STFC, U.K.) for corrections and suggestions.

## Notes and references

- Z. Mendoza, P. Lorenzo-Luis, M. Serrano-Ruiz, E. Martín-Batista, J. M. Padrón, F. Scalambra and A. Romerosa, *Inorg. Chem.*, 2016, **55**, 7820, and references therein.
- C. R. Munteanu and K. Suntharalingam, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 13796.

- 3 I. Chakraborty, S. J. Carrington, G. Roseman and P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, 2017, **56**, 1534.
- 4 (a) A. M. Pizarro, A. Habtemariam and P. J. Sadler, *Top. Organomet. Chem.*, 2010, **32**, 21; (b) A. Casini, C. G. Hartinger, A. A. Nazarov and P. J. Dyson, *Top. Organomet. Chem.*, 2010, **32**, 57; (c) G. Süß-Fink, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 1673.
- 5 (a) D. N. Akbayeva, L. Gonslavi, W. Oberhauser, M. Peruzzini, F. Vizza, P. Brüggeller, A. Romerosa, G. Sava and A. Bergamo, *Chem. Commun.*, 2003, 264; (b) A. Romerosa, T. Campos-Malpartida, C. Lidrissi, M. Saoud, M. Serrano-Ruiz, J. A. Garrido-Cárdenas and F. García-Moroto, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 1289.
- 6 F. A. Egbewande, L. E. H. Paul, B. Therrien and J. Furrer, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, **7**, 1174.
- 7 A. Mena-Cruz, P. Lorenzo-Luis, A. Romerosa, M. Saoud and M. Serrano-Ruiz, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 6120.
- 8 C. Ríos-Luci, L. G. León, A. Mena-Cruz, E. Pérez-Roth, P. Lorenzo-Luis, A. Romerosa and J. M. Padrón, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 4568.
- 9 M. Serrano-Ruiz, L. M. Aguilera-Sáez, P. Lorenzo-Luis, J. M. Padrón and A. Romerosa, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 11212.
- 10 (a) A. Mena-Cruz, P. Lorenzo-Luis, A. Romerosa and M. Serrano-Ruiz, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 2246; (b) A. Mena-Cruz, P. Lorenzo-Luis, V. Passarelli, A. Romerosa and M. Serrano-Ruiz, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 3237.
- 11 B. Matijević, I. J. Zsigrai, M. Vraneš and S. B. Gadžurić, *J. Mol. Liq.*, 2010, **154**, 82.
- 12 The antiproliferative activity of the CoCl<sub>2</sub> salt was studied by the same growth inhibition assays used with the complexes **1**, **2** and cisPt.
- 13 L. Prashanth, K. K. Kattapagari, R. T. Chitturi, V. R. R. Baddam and L. K. Prasad, *J. NTR Univ. Health Sci.*, 2015, **4**(2), 75.
- 14 (a) W. A. Wani, S. Prashar, S. Shreaz and S. Gómez-Ruiz, *Coord. Chem. Rev.*, 2016, **312**, 67; (b) J. Furrer and G. Süß-Fink, *Coord. Chem. Rev.*, 2016, **309**, 36; (c) S. K. Singh and D. S. Pandey, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 1819; (d) L. Côte-Real, M. P. Robalo, F. Marques, G. Nogueira, F. Avecilla, T. J. L. Silva, F. C. Santos, A. I. Tomaz, M. H. Garcia and A. Valente, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **150**, 148; (e) T. Völker and E. Meggers, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2015, **25**, 48; (f) E. K. Martin, N. Pagano, M. E. Sherlock, K. Harms and E. Meggers, *Inorg. Chim. Acta*, 2014, **423**, 530.

**8.1.3. One Step Up in Antiproliferative Activity: The Ru-Zn Complex  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2-\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N}'\text{-ZnCl}_2](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ .**

Zenaida Mendoza, Pablo Lorenzo-Luis, Franco Scalambra, José M. Padrón, y Antonio Romerosa.

Area de Química Inorgánica, Departamento Química, Facultad de Ciencias, Universidad de La Laguna,

Area de Química Inorgánica-CIESOL, Departamento de Física y Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Almería.

BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias, Universidad de La Laguna.

**Seleccionado por la Editorial como:**

➤ **Full Paper VIP**

➤ **Cover Feature**



**Antiproliferation** | *Very Important Paper*

**One Step Up in Antiproliferative Activity: The Ru-Zn Complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-ZnCl<sub>2</sub>](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)**

 Zenaida Mendoza,<sup>[a]</sup> Pablo Lorenzo-Luis,<sup>[a]</sup> Franco Scalambra,<sup>[b]</sup> José M. Padrón,<sup>[c]</sup> and Antonio Romerosa<sup>\*[b]</sup>

**Abstract:** The synthesis, characterization and antiproliferative activity of the bimetallic Ru-Zn complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-ZnCl<sub>2</sub>](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (**4**) and the monometallic Ru complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dmoPTA-1κP)](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (**5**) are presented. Against human lung, cervix, breast, and colon solid tumor cell lines, complex **4** showed an enhanced antiproliferative activity (GI<sub>50</sub> = 30–83 nM) when compared to its parent complex

[RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA-1κP)](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (**2**). Additionally, it was significantly more active against the breast cancer cell line T-47D than its sibling cobalt complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-CoCl<sub>2</sub>](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (**3**). When evaluated against non-tumor human cell line BJ-Htert, complex **4** was 3–8 times less active, indicating a large selectivity for tumor cells, while compound **5** was not selective.

**Introduction**

Ruthenium(II)-based complexes have emerged as promising antitumor and antimetastatic agents with potential uses in platinum(II)-resistant tumors. In fact, some of them have shown broad diversity, in terms of activity, toxicity, and mechanisms of action due to a combination of chemical and biological properties.<sup>[1]</sup> Nevertheless, the platinum(II) complexes with antiproliferative properties show a similar ligand exchange kinetic than ruthenium(II)-anticancer drugs, which is crucial for displaying a significant anticancer activity.<sup>[2]</sup>

Stabilized Ru<sup>II</sup> complexes containing adequate ligands display the suitable redox and ligand-exchange properties needed to react with cancer cells. An accurate choice of the ligands coordinate to the metal could provide a selective antiproliferative activity of the formed complexes, killing the cancer cells selectively.<sup>[3,4]</sup> Additionally, the ligands are also useful for providing the optimal solubility for the complex both in water, the main component of living organism, and organic systems, such as the membrane cells. The hydrophilic/hydrophobic balance of

a specie determines the in vivo behaviour and efficient under physiological conditions.<sup>[3b,4]</sup> The first report on the use of a water-soluble phosphine as ligand in developing anticancer ruthenium complexes dates back to 2011, when Dyson et al., prepared a family of organometallic ruthenium compounds containing the hydrophilic phosphine 1,3,5-triaza-7-phosphadamantane (PTA), which displayed significant anticancer activity towards different cancer cell lines, and particularly against platinum resistant cancer cells.<sup>[4b–4d]</sup> Hydrolysis and the loss of one or more ligands are important processes in the mechanism of action of these water soluble ruthenium drugs due to increasing the number of potential targetable molecules.<sup>[1d,3–5]</sup> We have been interested in this field for years, firstly synthesizing and studying the family of water-soluble ruthenium complexes [RuCpX(L<sup>1</sup>)(L<sup>2</sup>)<sup>n+</sup>] (X = Cl; L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> = PPh<sub>3</sub>, PTA, mPTA, mTPPMS).<sup>[6]</sup> Later on we studied also the effect on the antiproliferative activity of the bis-*N*-methylated PTA *N,N'*-dimethyl-1,3,5-triaza-7-phosphadamantane (dmPTA) and its derivative 3,7-H-3,7-dimethyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo[3.3.1]nonane (HdmoPTA).<sup>[7–10]</sup> This last ligand can be easily deprotonated and the resulting neutral 3,7-dimethyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo[3.3.1]nonane (dmoPTA) is able to coordinate metals through the soft P and the two hard N<sub>CH3</sub> atoms, behaving in the latter case as a chelate.<sup>[11]</sup> The antiproliferative activity of the complex [RuCpCl(PPh<sub>3</sub>)(HdmoPTA-1κP)](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (**1**) (the so-called 1<sup>st</sup> generation) against colon cancer cells was significant better (GI<sub>50</sub> = 1.7 μM) than that showed by cisplatin, that is currently used in anticancer therapy.<sup>[8]</sup> The substitution of the chloride in **1** by one PPh<sub>3</sub> led to complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(HdmoPTA-1κP)](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (**2**) (the so-called first member of the 2<sup>nd</sup> generation), which is more soluble in organic solvent, showing a substantial enhancement of the antiproliferative activity with respect to the starting complex **1**.<sup>[12]</sup> Elimination of the HdmoPTA-proton in **1** and further reaction with CoCl<sub>2</sub> provided the Ru-Co complex [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-

[a] Departamento de Química-Sección Química Inorgánica, Universidad de La Laguna (LL), 38206 La Laguna, Spain  
E-mail: zeni\_reni7@hotmail.com  
plorenzo@ull.es

[b] Área de Química Inorgánica-CIESOL. Universidad de Almería, Carretera Sacramento s/n, Almería, Spain  
E-mail: fs649@inlumine.ual.es  
romerosa@ual.es  
http://virtual.ual.es/webual/jsp/investigacion/nuevo/plnicio.jsp?tid\_grupo=FQM317&idroma=es

[c] BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González" (IUBO-AG), Universidad de La Laguna, C/Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Spain  
E-mail: jmpadron@ull.es

Supporting information and ORCID(s) from the author(s) for this article are available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/ejic.201800857>.

$\text{CoCl}_2(\text{CF}_3\text{SO}_3)$  (**3**) (the second member of the 2<sup>nd</sup> generation), which showed a significant better antiproliferative activity than **1** (Figure 1), despite  $\text{Co}^{\text{II}}$  is not particularly known for its antimetastatic properties.<sup>[13]</sup> The fact that the  $\text{CoCl}_2$  is not an antiproliferative agent and that the antimetastatic activity of the Ru-Co complex is clearly and significantly better than the monometallic Ru starting complex led us to propose that complex **3** acts as a “Trojan Horse” that introduce both metals into the cell. To obtain a new example of this family of bimetallic complexes with possibly better antiproliferative activity but also amenable to be studied in dissolution by NMR, a diamagnetic metal should be coordinated to the dmoPTA- $\text{N}_{\text{CH}_3}$  atoms.

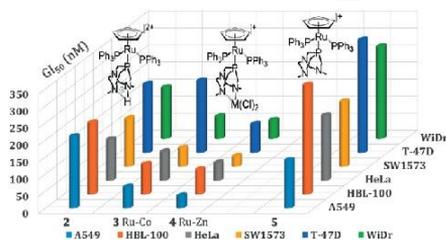
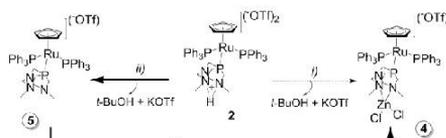


Figure 1. GI50 values (nm) for the 2nd generation ruthenium organometallic complexes against human solid tumor cell lines A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D and WiDr.

The heterometal selected was the diamagnetic  $\text{Zn}^{\text{II}}$  that is an important component of some biological systems [i.e. as cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase (SOD)].<sup>[14]</sup>

## Results and Discussion

The Ru-Zn complex was initially synthesized by a procedure similar to that used for **3**,<sup>[13]</sup> by reaction of **2** with one equivalent of potassium *tert*-butoxide (*t*BuOK) and further with one equivalent of  $\text{ZnCl}_2$  in EtOH (Scheme 1, path *l*). This synthetic procedure is very sensitive to reaction conditions and a new one more robust is needed to obtain enough product to be studied. Pure deprotonated complex  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{dmoPTA-1}\kappa\text{P})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$  (**5**) was synthesized by reaction of **2** with 1.1 equiv. of *t*BuOK in THF (Scheme 1, path *ii*). The complex **5** is practically insoluble in water ( $S_{25}^{\text{°C}} = 0.5$  mg/mL) while it is significant soluble in a variety of organic solvents such as  $\text{CHCl}_3$ , THF, etc. This complex is stable in solution and solid state under  $\text{N}_2$  for months but under air some evidences of



Scheme 1. Synthesis of **4** and **5**; path *ii*: *t*BuOK/EtOH/ $\text{ZnCl}_2$ , room temp.; *ii*: *t*BuOK/THF, room temp. and *iii*: EtOH/ $\text{ZnCl}_2$ , r.t.

decomposition ( $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR) are observed after one month in solid state and two days dissolved in  $\text{CHCl}_3$ . Reaction of **5** with  $\text{ZnCl}_2$  in EtOH is a robust method to obtain the Ru-Zn complex (Scheme 1, path *iii*). The product was characterized by elemental analysis, IR and NMR spectroscopy as the expected bimetallic Ru-Zn complex  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-ZnCl}_2](\text{CF}_3\text{SO}_3)$  (**4**).

The  $^1\text{H}$  NMR of **4** was assigned by using  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (see Figures S1–S6). The signals and chemical shift are those expected for the proposed complex composition in which the most interesting feature is the presence of two broad singlets, very close in chemical shift (2.15; 2.16 ppm), that could only be assigned to the  $\text{N}_{\text{CH}_3}$  groups. This shows that the methyl groups are chemically different. In contrast, the  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR shows only a broad signal ascribable to both  $\text{N}_{\text{CH}_3}$ . Finally, the  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR only showed the existence of one unique specie with phosphorus in dissolution with the expected signal pattern for the complex: a doublet for the  $\text{PPh}_3$  ligand at  $\delta = 37.39$  ppm and a triplet at  $-15.10$  ppm due to the dmoPTA ( $^2J_{\text{PP}} = 39.2$  Hz). Both signals arise at similar chemical shift than those for starting complex **2** (38.44;  $-13.94$  ppm) with similar coupling constant (39.4 Hz).<sup>[12]</sup> The single-crystal X-ray diffraction structure of **4** showed that the asymmetric unit contains two OTf anions and two enantiomeric cationic Ru-Zn complexes (Figure 2, Table S1). The complex units are formed by the combination of the deprotonated moiety  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2(\text{dmoPTA-1}\kappa\text{P})]^+$ , which is similar to that in the starting complex, and one  $\{\text{ZnCl}_2\}$  moiety chelated to the  $\text{N}_{\text{CH}_3}$  atoms. The coordination sphere of the ruthenium atom displays a piano-stool geometry constituted by a  $\eta^5$ -Cp, two  $\text{PPh}_3$  and a dmoPTA unit by its P atom (Figure 2). The Cp-ring is essentially planar with the larger separation from the overall-plan-Cp of only 0.0047 Å (C38) somewhat shorter than that in (0.0089 Å, C84) and **3** (0.0079 Å, C39).<sup>[12,13]</sup> The Ru–Cp<sub>centroid</sub> distance (1.894 Å) is almost equivalent to that found for **2** and **3** (1.886 to 1.893 Å), and is similar to those found in other  $[\text{RuCp}]$  complexes (from 1.836 to 1.929 Å; mean 1.893 Å).<sup>[15]</sup> The angle between the Cp-centroid plane and the P1–Ru1–P2 plane was found to be 46.6(1) $^\circ$ , which is virtually identical to that observed in **3** [46.9(9) $^\circ$ ] but ca. 1.3 $^\circ$  smaller than those found for **2**.<sup>[12,13]</sup>

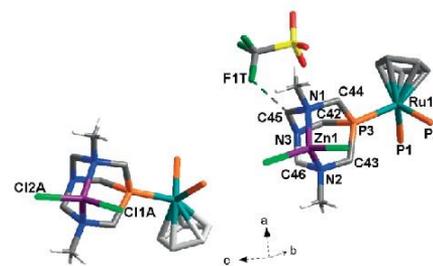


Figure 2. Perspective view and atom numbering selection of **4**, showing the two six-membered rings around the metal with a pseudo-chair conformation, which form enantiomeric pairs. Dashed lines represent the selected intermolecular interaction.

These values are considerably shorter than that found for complexes  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-MQ}]$  ( $\text{M} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Zn}, \text{Q} = \text{acac}, \text{Cl}_2$ ), which are in the range 53.7(2)–56.85(0) $^\circ$  (average: 55.2 $^\circ$ ).<sup>[11b,11c]</sup> The dihedral angles between the dmoPTA atoms vary from 52.4(5)–51.6(3) to 51.8(4)–52.7(4) $^\circ$  in agreement with those observed in related complexes  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-MCl}_2]$  ( $\text{M} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Zn}$ ) moiety (52.2(1)–54.9(2) $^\circ$  (average: 53.6 $^\circ$ )).<sup>[11a]</sup> The  $\text{Cl1-Zn1-Cl2}$  angle is 121.3(8) $^\circ$ , which is close to that found in parent complex  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-ZnCl}_2]$  [121.8(4) $^\circ$ ].<sup>[11a]</sup> The triflate is located (Figure 2) between the C45 and F1T atoms [C45–H45B...F1T = 3.192(6) Å, H45B...F1T = 2.488(4) Å].<sup>[12,13,15]</sup>

The structural core of **4** displays a remarkable similarity to that of **3**,<sup>[13]</sup> especially if one takes into consideration their  $\text{CH}_3$  groups (Figure 3). In fact, the disposition of the dmoPTA ligand lays the methyl groups in different chemical environment: one of them is located in front of the Cp and the other one is near to the aromatic rings. The crystal packing diagram (Figure 4) shows weak intermolecular interactions among the molecules [C36–H36...Cl2 = 3.586(7), H36...Cl2 = 2.804(2) Å] and C–H/ $\pi$  interactions among adjacent phenyl–C–H groups and aromatic centroids [centroid-to–C–H distances from 3.366(5) to 3.566(6) Å], which were found larger than those found for **2** and **3** [range from 3.183(5) to 3.470(5) Å].<sup>[12,13]</sup>

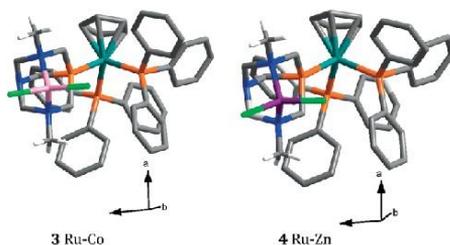


Figure 3. Equivalent enantiomeric molecules in **3** and **4**.

Complex **5** was characterized by elemental analysis, IR spectroscopy and NMR, supporting that the complex is constituted by a Ru atom coordinated with a piano-stool geometry to a  $\eta^5$ -Cp, two  $\text{PPh}_3$  and one deprotonated dmoPTA by the P atom. The  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR shows a doublet at  $\delta = 43.07$  ppm ( $^2J_{\text{PP}} = 38.24$  Hz) due to the  $\text{PPh}_3$  and a triplet at  $-7.42$  ppm corresponding to the dmoPTA, which are significantly shifted to down field respecting the protonated parent complex **2** ( $\delta =$

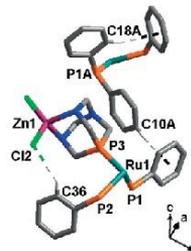


Figure 4. Perspective view and atom numbering selection of **4**, showing the significant weak interactions.

38.44 ppm  $\text{PPh}_3$ ;  $-13.94$  ppm dmoPTA) but the coupling constant is similar (39.4 Hz). The  $^1\text{H}$  NMR also shows the clear effect produced by the deprotonation, being the  $\text{NCH}_3$  protons more shielded than in the protonated complex (a broad singlet at  $\delta = 2.04$  ppm for **5**; two broad singlets at  $\delta = 2.35$  and 2.36 ppm for **2**) but also the Cp, which is far from the deprotonation site, is shifted to upper field ( $\delta = 4.78$  ppm for **5**; 4.90 for **2**). In contrast, the  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR is similar for both complexes [for example: 43.90 ppm, 44.01 ppm (**5**  $\text{NCH}_3$ ); 43.35 ppm, 43.41 ppm (**2**  $\text{NCH}_3$ ); 85.15 ppm (**5** Cp); 85.51 ppm (**2** Cp)].

The antiproliferative activity of **4** and **5** was studied by the standard protocol (see SI) on six human solid tumor cell lines together with those for **2** and **3**<sup>[12,13]</sup> and cisplatin; which were also tested for the sake of comparison (Table 1). In order to look for selectivity, we tested also compounds **4** and **5** against the non-tumor human cell line BJ-hTert.

Complex **5** showed a similar antiproliferative activity than the starting complex **2** and therefore the protonation/deprotonation of the of the complex unit  $\{[\text{RuCpCl}(\text{PPh}_3)(\text{dmoPTA-1}\kappa\text{P})]^+\}$  does not have a significant influence on its biological activity. In clear contrast and as expected, the new Ru-Zn (**4**) displays a better activity (1.2–2.5 times) than the sibling Ru-Co (**3**) and much better (26–426 times) than cisplatin. It is important to point out that complex **4** showed to be 3–8 times more active against the tumor cell lines than against the tested non-tumor cell line, indicating its large selectivity vs. tumor cells. In contrast, complex **5** resulted non selective.

Complex **4** was found to be very stable, more than the Ru-Co complex **3**, in the time needed for the antiproliferative experiments (i.e. 48 h) in a mixture of  $[\text{D}_6]\text{DMSO}/\text{cell-culture-medium}$ . A very small (less than 3%) release of  $\text{PPh}_3$  was ob-

Table 1.  $\text{GI}_{50}$  values ( $\mu\text{M}$ ) of **2**, **3**, **4** and **5** and cisplatin against a representative human solid tumor and, **4** and **5** vs. a non-tumor cell line.<sup>[15]</sup>

Entry	Cell line (origin)	HBL-100 (breast)	HeLa (cervix)	SW1573 (lung)	T-47D (breast)	WiDr (colon)	BJ-hTert (fibroblasts)
<b>2</b> <sup>[a]</sup>	A549 (lung)	0.21 (0.04)	0.17 (0.04)	0.20 (0.02)	0.25 (0.04)	0.20 (0.03)	
<b>3</b> <sup>[a]</sup>		0.062 (0.019)	0.088 (0.008)	0.054 (0.013)	0.210 (0.05)	0.065 (0.010)	
<b>4</b>		0.072 (0.008)	0.051 (0.022)	0.030 (0.013)	0.083 (0.05)	0.054 (0.010)	0.23 (0.02)
<b>5</b>		0.32 (0.03)	0.19 (0.01)	0.19 (0.05)	0.33 (0.01)	0.27 (0.03)	0.35 (0.02)
cisplatin		1.9 (0.2)	1.8 (0.5)	2.7 (0.4)	17 (3.3)	23 (4.3)	14 (2.4)

[a] Taken from refs.<sup>[12,13]</sup> [b] Mean of the least two independent experiments. Standard deviation in parentheses.

served after one day which remained unvaried during one additional day. Similar experiments made in  $\text{CDCl}_3$  and  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  showed that complex **4** is significantly more stable than complex **3** in these solvents. The dissolution of **4** in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  led to the partial release of  $[\text{ZnCl}_2]$ , giving rise to the complex **5**. The reaction was not completed after 25 h and some small amount (< 5%) of released  $\text{PPh}_3$  and complexes  $\{[\text{RuCpCl}(\text{PPh}_3)(\text{dmoPTA-1}\kappa\text{P})]\}^+$ ,<sup>[10]</sup> and  $[\text{RuCpCl}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-ZnCl}_2]$ <sup>[11a]</sup> were observed. After 74 h under air at 40 °C, the largest signals observed by  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR were still those of **4** (see SI).

Complex **4** in  $\text{CDCl}_3$  slowly releases a  $\text{PPh}_3$  to give the complex  $[\text{RuCpCl}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N'-ZnCl}_2]$ <sup>[11a]</sup> and the starting complex **2** (see SI), products that are obtained also with crystalline **4** and distillate dry  $\text{CDCl}_3$ , which needs one chloride and one proton to occur that can only be provided by the solvent. There are references for the abstraction of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{H}^+$  from  $\text{CHCl}_3$  and other chlorinated solvents by organometallic complexes,<sup>[16]</sup> nevertheless more experiments are needed before ensuring how proceed the transformation of **4** in  $\text{CDCl}_3$  proceeds.

## Conclusions

The most important conclusions are: the Ru-Zn complex **4** in solution transforms slowly and its antiproliferative activity is significantly better than those for the complexes formed by its decomposition and that for the parent Ru-Co complex **3**. Therefore, the observed larger antiproliferative activity for **4** is due to its composition as bimetallic complex and the adequate combination of metals. The biological evaluation of  $\text{ZnCl}_2$  revealed that it is not active in any of the studied cell lines. Zinc is an essential microelement in the human body and therefore, less toxic to humans than non-essential metals like platinum. It plays an important physiological role in the protein, nucleic acid as well as in the control of gene transcription, in fact is defined as an "essential trace element". Therefore, its properties as antioxidant, and its role in cancer prevention require the understanding of the complex activity-toxicity relationship.<sup>[11a,5a,17]</sup> Additionally, while compound **5** resulted not selective the complex **4** showed to be 3–8 times less active against a non-tumor cell line.

Works are in progress to synthesize new bimetallic Ru-M complexes containing biologically active metals and ligands and studies targeted to understand the antiproliferative action mechanism of these family of heterobimetallic complexes.

## Experimental Section

**Materials and Instruments:** All chemicals were reagent grade and, unless otherwise stated, were used and received by commercial suppliers. Likewise, all reactions were carried out in a pure argon atmosphere using standard Schlenk-tube techniques with freshly distilled and oxygen-free solvents. The complex  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{-}(\text{HdmoPTA-1}\kappa\text{P})][\text{CF}_3\text{SO}_3]\text{-0.25H}_2\text{O}$  (**2**) was synthesized using the method reported by us.<sup>[12]</sup> Elemental analysis (C,H,N) were performed on a Fisons Instruments EA 1108 elemental analyzer. Infrared spectra (KBr, Aldrich) were measured with a Thermo Nicolet

Avatar 300FT-IR spectrometer.  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  and  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra were recorded on a Bruker DRX300 and 500 spectrometers. Peak positions are relative to tetramethylsilane and were calibrated against the residual solvent resonance ( $^1\text{H}$ ) or the deuterated solvent multiplet ( $^{13}\text{C}$ ).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  spectra were recorded on the same instrument operating at 121.49 and 282.40 MHz, respectively. Chemical shifts for  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR were measured relative to external 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , it was measured with downfield values taken as positive. All NMR spectra were obtained at 25 °C.

### **[RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-μ-dmoPTA-1κP:2κ<sup>2</sup>N,N'-ZnCl<sub>2</sub>](OTf) (4):**

a) Potassium *tert*-butoxide (0.020 g, 0.178 mmol) was added into a solution of **2** (0.104 g, 0.090 mmol), which was synthesized as indicated in ref 12, in EtOH (10 mL) (Scheme 1). After 15 min at room temp. finely grounded solid  $\text{ZnCl}_2$  (0.0133 g, 0.098 mmol) was added. The resulting yellow solution was kept for 30 min at room temperature and then reduced to 5 mL under reduced pressure. The resulting yellow solid was recrystallized from EtOH/diethyl ether (1:1), providing yellow microcrystals that were filtered and air dried. b) Complex **5** (0.100 g, 0.096 mmol) was dissolved into EtOH (5 mL) and then finely grounded solid  $\text{ZnCl}_2$  (0.0133 g, 0.098 mmol) was added at room temperature (Scheme 1). After 30 min 5 mL of Et<sub>2</sub>O was added into the resulting yellow solution and the mixture stirred for 5 min. The precipitated yellow powder was filtered, washed with Et<sub>2</sub>O (2 × 2 mL) and dried under vacuum. Crystals yield: a) 0.049 g, 47.4%; b) 0.069 g, 62.54%.  $S_{25}^{\text{C,CHCl}_3} > 62.5$  mg/mL,  $S_{25}^{\text{C,H}_2\text{O}} < 0.5$  mg/mL,  $S_{25}^{\text{C,EtOH}} = 10.8$  mg/mL.  $\text{C}_{49}\text{H}_{51}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{P}_3\text{RuS}_2\text{Zn}$  (1149.3 g mol<sup>-1</sup>): calcd. C 51.21, H 4.47, N 3.65; found C 51.08, H 4.32, N 3.68. IR (KBr):  $\nu_{(\text{C-H})}$  3071, 3057;  $\nu_{(\text{C-H})}$  2961, 2915, 2861;  $\delta\text{a}_{(\text{C-H})}$  1434 (m);  $\nu_{(\text{OTf})}$  1274, 1252, 1170, 1158;  $\nu_{(\text{C-N})}$  1029 (m), 1071 (m);  $\delta\text{oop}_{(\text{C-H})}$  757 (m), 745 (m);  $\delta\text{oop}_{(\text{C-Car})}$  690 (s) cm<sup>-1</sup>.  $^1\text{H}$  NMR (500.13 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.16, 2.15$  (bs + bs,  $\text{NCH}_3$ , 6 H), 2.97–3.60 (m,  $\text{PCH}_2$ , 6 H), 3.63–4.31 (m,  $\text{NCH}_2\text{N}$ , 4 H), 4.94 (s, Cp, 5 H), 6.93–7.53 (bm, aromatic, 30 H) ppm.  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (125.76 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 44.67$  (s,  $\text{CH}_3\text{N}$ ), 44.72 (s,  $\text{CH}_3\text{N}$ ), 52.39 (d,  $^1J_{\text{PC}} = 25.81$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{NCH}_3$ ), 57.28 (d,  $^1J_{\text{PC}} = 11.19$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{NCH}_3$ ), 73.85 (s,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 85.48 (s, Cp), 122.2, (q,  $^1J_{\text{CF}} = 324.55$  Hz,  $\text{OSO}_2\text{CF}_3$ ), 129.12, 130.95, 133.46, 136.48 (m,  $\text{PPh}_3$ ) ppm.  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (202.46 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -15.10$  (t,  $^2J_{\text{PP}} = 39.15$  Hz,  $\text{dmPTA}$ ), 37.50 (d,  $^2J_{\text{PP}} = 39.90$  Hz,  $\text{PPh}_3$ ) ppm.

### **[RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(dmoPTA-1κP)](OTf) (5):**

Potassium *tert*-butoxide (0.0182 g, 0.162 mmol) was added into a tetrahydrofuran (30 mL) suspension of **2** (0.1777 g, 0.155 mmol) (Scheme 1). The mixture was stirred at room temperature for 15 min and the solvent removed. The yellow residue was treated with  $\text{CHCl}_3$  (10 mL) and the insoluble solid separated out by filtration and washed with  $\text{CHCl}_3$  (2 × 2 mL). The filtered dissolution together with the washing waters were evaporated under reduced pressure and the resulting solid washed with THF/diethyl ether (1:3), filtered and dried under vacuum. Yield: 0.106 g, 67.51%.  $S_{25}^{\text{C,CHCl}_3} > 15.5$  mg/mL,  $S_{25}^{\text{C,H}_2\text{O}} < 0.5$  mg/mL,  $S_{25}^{\text{C,MeOH}} > 6.3$  mg/mL.  $\text{C}_{49}\text{H}_{51}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{P}_3\text{RuS}$  (1013.00 g mol<sup>-1</sup>): calcd. C 58.10, H 5.07, N 4.15; found C 58.18, H 5.18, N 4.10. IR (KBr):  $\nu_{(\text{C-H})}$  3080, 3055;  $\nu_{(\text{C-H})}$  2970, 2931, 2890;  $\delta\text{a}_{(\text{C-H})}$  1435 (m);  $\nu_{(\text{OTf})}$  1280, 1257, 1222, 1157;  $\nu_{(\text{C-N})}$  1029 (m), 1859 (m);  $\delta\text{oop}_{(\text{C-H})}$  752 (m), 698 (m);  $\delta\text{oop}_{(\text{C-Car})}$  690 (s) cm<sup>-1</sup>.  $^1\text{H}$  NMR (500.13 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.04$  (br. s,  $\text{NCH}_3$ , 6 H), 2.77–3.35 (m,  $\text{PCH}_2$ , 6 H), 3.47–3.53 (m,  $\text{NCH}_2\text{N}$ , 4 H), 4.78 (s, Cp, 5 H), 6.97–7.03, 7.28–7.35, 7.44–7.48 (bm, aromatic, 12 H, 12 H, 6 H) ppm.  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (125.76 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 43.90, 44.01$  (s + s,  $\text{CH}_3\text{N}$ ), 55.70 (d,  $^1J_{\text{PC}} = 28.3$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{NCH}_3$ ), 74.76 (s,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 85.15 (s, Cp), 128.57–137.14 (m, aromatic) ppm.  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (202.46 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -7.42$  (t,  $^2J_{\text{PP}} = 38.24$  Hz,  $\text{dmoPTA}$ ), 43.23 (d,  $^2J_{\text{PP}} = 38.24$  Hz,  $\text{PPh}_3$ ) ppm.

**Single Crystal X-ray Crystallography of Complex 4:** A single crystal with suitable dimensions ( $0.03 \times 0.021 \times 0.017$ ) was mounted on a glass fiber with cyanoacrylate at room temperature. Data collection was performed on a Bruker APEX-II CCD diffractometer in the range  $0.952 \leq 2\theta \leq 26.372$ . Data were collected at 100 K using graphite-monochromatized Mo- $K_{\alpha}$  ( $\lambda = 0.71073$ ) in the range  $-13 \leq h \leq 9$ ,  $-26 \leq k \leq 26$ ,  $-25 \leq l \leq 27$ . The structure was determined by direct methods and refined by least-squares procedures on  $F^2$  (SHELX-XL) using Olex2 package.<sup>[18,19]</sup> The final geometrical calculations, the graphical manipulations and the analysis of H-bond network and other crystallographic calculations were carried out with Olex2 package.<sup>[19]</sup> The hydrogen atoms were located at the calculated positions. The chloride ligand (Cl3) was found to be disordered and refined anisotropically. One of the OTf anion of the asymmetric unit is found disordered. Crystal data and data collection details are given in Table S1.

CCDC 1839217 (for 4) contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre.

**Growth Inhibition Assays:** The human solid tumor cell lines A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D and WiDr were used in this study. The human fibroblast (non-tumor) cell line BJ-Htert was used to study compound selectivity. These cell lines were a kind gift from Prof. G. J. Peters (VU Medical Center, Amsterdam, Netherlands). Cells were maintained in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks in RPMI 1640 supplemented with 5% heat inactivated fetal calf serum and 2 mM L-glutamine in a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidified air incubator. Exponentially growing cells were trypsinized and re-suspended in antibiotic containing medium (100 units of penicillin G and 0.1 mg of streptomycin per mL). Single cell suspensions displaying > 97% viability by trypan blue dye exclusion were subsequently counted. After counting, dilutions were made to give the appropriate cell densities for inoculation onto 96-well microtiter plates. Cells were inoculated in a volume of 100  $\mu$ L per well at densities of 2 500 (A549, HBL-100 and HeLa) and 5 000 (SW1573, T-47D and WiDr) cells per well, based on their doubling times. Compounds were initially dissolved in DMSO at 400 times the desired final maximum test concentration. Control cells were exposed to an equivalent concentration of DMSO (0.25% v/v, negative control). Each agent was tested in triplicate at different dilutions in the range of 1–100  $\mu$ M. The drug treatment was started on day 1 after plating. Drug incubation times were 48 h, after which time cells were precipitated with 25  $\mu$ L ice-cold TCA (50% w/v) and fixed for 60 min at 4 °C. Then the SRB assay was performed. The optical density (OD) of each well was measured at 530 nm, using BioTek's PowerWave XS Absorbance Microplate Reader. Values were corrected for background OD from wells only containing medium.

### Acknowledgments

Thanks are due to the European Commission FEDER program for co-financing the project CTQ2015-67384-R (MINECO) / the Junta de Andalucía PAI-research group FQM-317 and the COST Action CM1302 (WG1/ WG2). Z. M. is grateful to the University of La Laguna (ULL) for a predoctoral grant.

**Keywords:** Antiproliferation · Cancer · Heterometallic complexes · PTA derivatives · Ruthenium

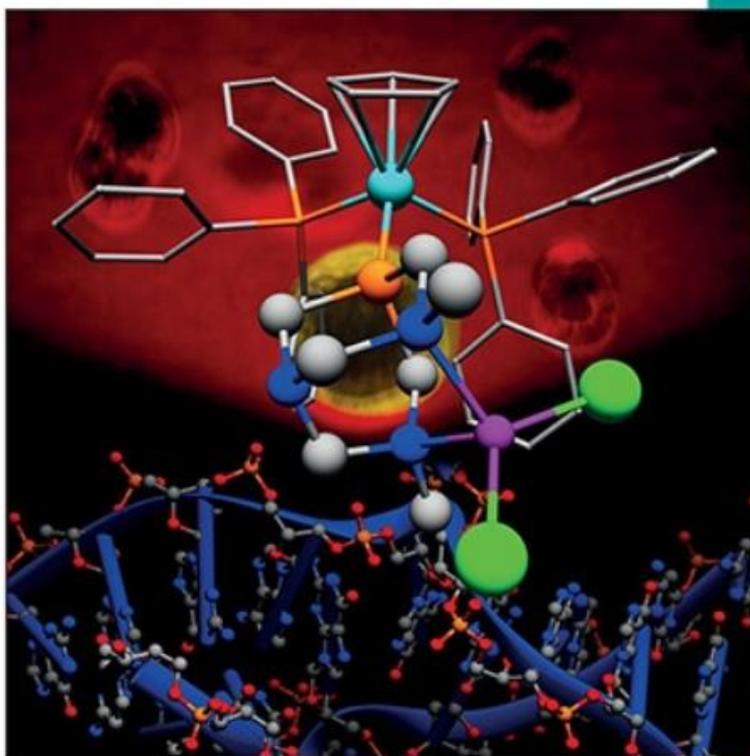
- [1] a) E. Alessio, Z. Guo, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2017, 1539–1540; b) E. Alessio, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2017, 1549–1560; c) P. Zhang, P. J. Sadler, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2017, 1541–1548; d) I. Romero-Canelón, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 12276–12291.
- [2] J. Reedijk, *Platinum Met. Rev.* **2008**, 52, 2–11.
- [3] a) F. Marchetti, R. Pettinari, C. Di Nicola, C. Pettinari, J. Palmucci, R. Scopelliti, T. Riedel, B. Therrien, A. Galindo, P. J. Dyson, *Dalton Trans.* **2018**, 47, 868–878; b) C. Gaiddon, M. Pfeffer, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2017, 1639–1654; c) S. Q. Yap, C. Fei Chin, A. H. Hong Thng, Y. Yun Pang, H. Kiat Ho, W. Han Ang, *ChemMedChem* **2017**, 12, 300–311; d) J. Palmucci, F. Marchetti, R. Pettinari, C. Pettinari, R. Scopelliti, T. Riedel, B. Therrien, A. Galindo, P. J. Dyson, *Inorg. Chem.* **2016**, 55, 11770–11781.
- [4] a) L. Cirte-Real, R. G. Teixeira, P. Girio, E. Comsa, A. Moreno, R. Nasr, H. Baubichon-Cortay, F. Aveçilla, F. Marques, M. P. Robalo, P. Mendes, J. P. P. Ramalho, M. H. Garcia, P. Falson, A. Valente, *Inorg. Chem.* **2018**, 57, 4629–4639; b) B. S. Murray, M. V. Babak, C. G. Hartinger, P. J. Dyson, *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 306, 86–114; c) W. Han Ang, A. Casini, G. Sava, P. J. Dyson, *J. Organomet. Chem.* **2011**, 696, 989–998; d) G. Süß-Fink, *Dalton Trans.* **2010**, 39, 1673–1688.
- [5] a) T. Sriskandakumar, S. Behyan, A. Habtemariam, P. J. Sadler, P. Kenne-pohl, *Inorg. Chem.* **2015**, 54, 11574–11580; b) E. M. Peña-Méndez, B. González, P. Lorenzo, A. Romero, J. Havel, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, 23, 3831–3836.
- [6] N. D. Akbayeva, L. Gonsalvi, W. Oberhauser, M. Peruzzini, F. Vizza, P. Brüggeller, A. Romero, G. Sava, A. Bergamo, *Chem. Commun.* **2003**, 264–265.
- [7] A. Romero, T. Campos-Malpartida, C. Lidrissi, M. Saoud, M. Serrano-Ruiz, J. A. Garrido-Cárdenas, F. García-Moroto, *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 1289–1298.
- [8] C. Ríos-Luci, L. G. León, A. Mena-Cruz, E. Pérez-Roth, P. Lorenzo-Luis, A. Romero, J. M. Padrón, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 4568–4571.
- [9] A. Mena-Cruz, M. Serrano-Ruiz, P. Lorenzo-Luis, A. Romero, Á. Kathó, F. Jód, L. M. Aguilera-Sáez, *J. Mol. Catal. A* **2016**, 471, 27–33.
- [10] A. Mena-Cruz, P. Lorenzo-Luis, A. Romero, M. Saoud, M. M. Serrano-Ruiz, *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 6120–6128.
- [11] a) M. Serrano-Ruiz, L. M. Aguilera-Sáez, P. Lorenzo-Luis, J. M. Padrón, A. Romero, *Dalton Trans.* **2013**, 42, 11212–11219; b) A. Mena-Cruz, P. Lorenzo-Luis, V. Passarelli, A. Romero, M. Serrano-Ruiz, *Dalton Trans.* **2011**, 40, 3237–3244; c) A. Mena-Cruz, P. Lorenzo-Luis, A. Romero, M. Serrano-Ruiz, *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 2246–2248.
- [12] Z. Mendoza, P. Lorenzo-Luis, M. Serrano-Ruiz, E. Martín-Batista, J. M. Padrón, F. Scalambra, A. Romero, *Inorg. Chem.* **2016**, 55, 7820–7822.
- [13] Z. Mendoza, P. Lorenzo-Luis, F. Scalambra, J. M. Padrón, A. Romero, *Dalton Trans.* **2017**, 46, 8009–8012.
- [14] a) S. Spreckelmeyer, C. Orvig, A. Casini, *Molecules* **2014**, 19, 15584–15610; b) M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 69–93.
- [15] B. González, P. Lorenzo-Luis, P. Gili, A. Romero, M. Serrano-Ruiz, *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 2029–2036, and references therein.
- [16] a) T. Mayer, H.-C. Böttcher, *Z. Naturforsch. B* **2013**, 68, 743–746; b) R. P. Nair, T. H. Kim, B. J. Frost, *Organometallics* **2009**, 28, 4681–4688; c) J. H. Park, J. H. Koh, J. Park, *Organometallics* **2001**, 20, 1892–1894; d) I. del Río, G. van Koten, *Organometallics* **2000**, 19, 361–364.
- [17] a) D. K. Dhawan, D. Chadha Vijayta, *Indian J. Med. Res.* **2010**, 132, 676–682; b) S. Frassinetti, G. Bronzetti, L. Caltavuturo, M. Cini, C. Della Croce, *J. Environ. Pathol. Tox.* **2006**, 25, 597–610.
- [18] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, 42, 339.
- [19] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A* **2015**, 71, 3.

Received: July 10, 2018

 **EurJIC**  
European Journal of  
Inorganic Chemistry



43/2018  
[www.eurjic.org](http://www.eurjic.org)



**Cover Feature**

*Antonio Romerosa et al.*

One Step Up in Antiproliferative Activity: The Ru-Zn Complex  
 $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2-\mu\text{-dmoPTA-}\kappa\text{P:}2\kappa^2\text{N,N'-ZnCl}_2](\text{CF}_3\text{SO}_3)$

WILEY-VCH





## 9. Anexo II

---



## 9.1. Comunicaciones a Congresos.

**Título del trabajo:** Nuevos complejos bimetálicos acuosolubles

**Autores:** Elizabeth Zenaida Mendoza Nozeman; Pablo Lorenzo Luis; Antonio Romerosa Nievas.

**Nombre del congreso:** XIX Semana Científica "Antonio González".

**Ciudad de celebración:** La Laguna, Canarias, España.

**Fecha de celebración:** 06/10/2015

**Fecha de finalización:** 09/10/2015

**Entidad organizadora:** Instituto Universitario de Biorgánica Antonio González.

**Título del trabajo:** Síntesis y caracterización del complejo bimetálico  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)\text{-}\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N}'\text{-PdCl}_2]$ .

**Autores:** Elizabeth Zenaida Mendoza Nozeman; Pablo Lorenzo Luis; Antonio Romerosa Nievas.

**Nombre del congreso:** XI Congreso de Estudiantes de la Sección de Química.

**Ciudad de celebración:** La Laguna, Canarias, España.

**Fecha de celebración:** 13/04/2015

**Fecha de finalización:** 15/04/2015

**Entidad organizadora:** Universidad de La Laguna.

**Título del trabajo:** Synthesis and Characterization of the bimetallic complex  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2-\mu\text{-dmoPTA-}1\kappa\text{P:}2\kappa^2\text{N,N}'\text{-CoCl}_2]$ .

**Autores:** Elizabeth Zenaida Mendoza Nozeman; Pablo Lorenzo Luis; Franco Scalambra; Antonio Romerosa Nievas.

**Nombre del congreso:** 2nd European conference on Smart Inorganic Polymers.

**Ciudad de celebración:** Uppsala, Stockholm, Suecia.

**Fecha de celebración:** 24/09/2015

**Fecha de finalización:** 26/09/2015

**Entidad organizadora:** Universidad de Uppsala.

**Título del trabajo:** Sythesis and characterization of  $[\text{RuCp}(\text{dmoPTA})(\text{PPh}_3)_2]^{2+}$  and the bimetallic complex  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2-\mu\text{-dmoPTA-}1\kappa\text{P:}2\kappa^2\text{N,N}'\text{-PdCl}_2]^+$ .

**Nombre del congreso:** Workshop Metales, Sol y Agua 2015.

**Autores:** Elizabeth Mendoza Nozeman; Pablo Lorenzo Luis; Antonio Romerosa Nievas.

**Ciudad de celebración:** Almería, Andalucía, España

**Fecha de celebración:** 21/05/2015

**Fecha de finalización:** 22/05/2015

**Entidad organizadora:** Universidad de Almería

**Título del trabajo:** Síntesis de nuevos complejos heterometálicos a partir de la unidad compleja  $[\text{RuCp}(\text{HdmoPTA})(\text{PPh}_3)_2]^{2+}$ .

**Autores:** Elizabeth Zenaida Mendoza Nozeman; Pablo Lorenzo Luis; Franco Scalambra; Manuel Serrano Ruiz; Antonio Romerosa Nieves.

**Nombre del congreso:** XX Semana Científica "Antonio González".

**Ciudad de celebración:** La Laguna, Canarias, España.

**Fecha de celebración:** 04/10/2016

**Fecha de finalización:** 07/10/2016

**Entidad organizadora:** Instituto Universitario de Biorgánica Antonio González.

**Título del trabajo:** Complejos de rutenio con fosfinas acuosolubles.

**Autores:** Antonio Romerosa Nieves; Zenaida Mendoza Nozeman; Franco Scalambra; Pablo Lorenzo Luis.

**Nombre del congreso:** XII Congreso de Estudiantes de la Facultad de Química.

**Ciudad de celebración:** La Laguna, Canarias, España.

**Fecha de celebración:** 11/04/2016

**Fecha de finalización:** 13/04/2016

**Entidad organizadora:** Universidad de La Laguna.

**Título del trabajo:** Polímeros heterometálicos con derivados de PTA (1,3,5-triaza-7- fosfaadamantano): una nueva familia de materiales con propiedades sorprendentes.

**Autores:** Antonio Romerosa; Manuel Serrano Ruiz; Franco Scalambra; Pablo Lorenzo Luis; Zenaida Mendoza Nozeman; Isaac de los Ríos.

**Nombre del congreso:** QIES

**Ciudad de celebración:** Málaga, Andalucía, España.

**Fecha de celebración:** 19/06/2016

**Fecha de finalización:** 22/06/2016

**Entidad organizadora:** Universidad de Málaga.

**Título del trabajo:** Synthesis characterization and antiproliferative activity of the bimetallic complexes  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2-\mu\text{-dmoPTA-}1\kappa\text{P:}2\kappa^2\text{N,N'-MCl}_2]$  (M = Ni, Co, Zn).

**Autores:** Elizabeth Zenaida Mendoza Nozeman; Franco Scalambra; Pablo Lorenzo; Manuel Serrano Ruiz; Manuel Romerosa Nievas.

**Nombre del congreso:** 3rd EUROPEAN CONFERENCE ON SMART INORGANIC POLYMERS

**Ciudad de celebración:** Málaga, Andalucía, España.

**Fecha de celebración:** 12/09/2016

**Fecha de finalización:** 14/09/2016

**Entidad organizadora:** Facultad de ciencias FCUP

**Título del trabajo** Synthesis, characterization and anticancer activity of the bimetallic complexes  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2-\mu\text{-dmoPTA-}1\kappa\text{P:}2\kappa^2\text{N,N}'\text{-MCl}_2]$  (M = Ni, Co, Zn).

**Autores:** Elizabeth Zenaida Mendoza Nozeman; Franco Scalambra; Pablo Lorenzo; Manuel Serrano Ruiz; Antonio Manuel Romerosa Nieves.

**Nombre del congreso:** 3rd European Conference on Smart Inorganic Polymers.

**Ciudad de celebración:** Oporto, Portugal.

**Fecha de celebración:** 12/09/2016

**Fecha de finalización:** 14/09/2016

**Entidad organizadora:** Facultad de ciencias FCUP

**Título del trabajo** Bimetallic complexes  $[\text{RuClCp}(\text{PPh}_3)-\mu\text{-dmoPTA-}1\kappa\text{P:}2\kappa^2\text{N,N}'\text{-ZnCl}_2]$ .

**Autores:** Elizabeth Zenaida Mendoza Nozeman; Franco Scalambra; Pablo Lorenzo; Jose Manuel Padrón; Antonio Manuel Romerosa Nieves.

**Nombre del congreso:** 4th European Conference on Smart Inorganic Polymers.

**Ciudad de celebración:** Zagreb, Croacia.

**Fecha de celebración:** 01/03/2018

**Fecha de finalización:** 03/03/2018

**Entidad organizadora:** Instituto Ruder Boskovic

**Título del trabajo** Metal complexes containing PTA and parent ligands: a rich family of compounds with remarkable properties (PTA = 1.3.5-triaza-7-phosphatricycle[3.3.1.13,7]decane).

**Autores:** Antonio Romerosa Nievas, Franco Scalambra, Belén López Sánchez, José Veiga, Andrés Alguacil, Zenaida Mendoza, Pablo Lorenzo Luis, Isaac de los Ríos.

**Nombre del congreso:** 7th EuCheMS Conference on Nitrogen Ligands.

**Ciudad de celebración:** Lisboa, Portugal.

**Fecha de celebración:** 04/09/2018

**Fecha de finalización:** 07/09/2018

**Entidad organizadora:** Universidad de Lisboa

### 9.1.2. Otros méritos.

Formar parte del comité organizador del Congreso Europeo “Workshop: Metales, Sol y Agua”.

**Ciudad de celebración:** Almería, Andalucía, España.

**Fecha de celebración:** 21/05/2015

**Fecha de finalización:** 22/05/2015

**Entidad organizadora:** Universidad de Almería.

Recibir una beca de movilidad del COST (COST Action **CM1302** for **European Network on Smart Inorganic Polymers (SIPs)**) con el objetivo de realizar una estancia de mínimo 3 meses en Lisboa, Portugal.

**Título del proyecto:** Study of the Stability and antiproliferative properties of the bimetallic complexes  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2-\mu\text{-dmoPTA-}1\kappa\text{P:}2\kappa^2\text{N,N}'\text{-MCl}_2]$  (M = Co, Zn).

**Localización:** Universidad de Lisboa, Portugal.

**Período de estancia:** 14/01/2018 – 28/04/2018

**Coordinador del Centro de Química Estructural:** Carlos Nieto de Castro.

**COST MC Chair:** Prof Evamarie Hey-Hawkins, hey@uni-leipzig.de

**COST Office Science Officer:** Dr Lucia Forzi, lucia.forzi@cost.eu

**COST STSM Manager:** Prof Muriel Hissler, muriel.hisslerniv-rennes1.fr

## 9.2. Trabajo realizado durante la estancia predoctoral.

La estancia realizada en la presente tesis doctoral se realizó en la Universidade de Lisboa (Lisboa, Portugal), con una duración de 3 meses y dos semanas (14/01/2018 a 28/04/2018).

Durante este período, se pretendió cumplir los siguientes objetivos:

1. Evaluar la estabilidad de una serie de complejos en varios medios biológicos relevantes.
2. Determinar la actividad antiproliferativa en una línea celular cancerígena (MCF7).
3. Determinar el mecanismo de muerte celular mediante el ensayo anexina V / PI.
4. Estudiar la interacción con la albúmina sérica humana mediante fluorescencia.

Los complejos seleccionados para realizar este estudio ([Figura 52](#)) se escogieron con la finalidad de poder observar qué ligandos proferían una mejor actividad antitumoral y así intentar dar una explicación al mecanismo de acción.

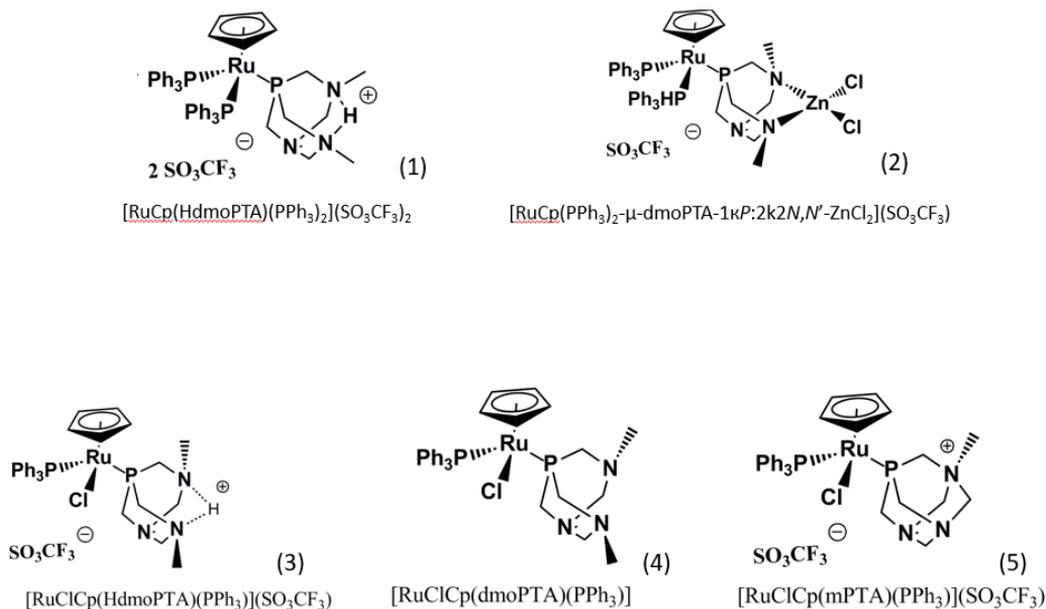


Figura 52. Estructuras utilizadas en el estudio.

## 1. Estudio de la estabilidad en distintos medios celulares.

Los estudios de estabilidad se realizaron mediante UV-Vis y por espectroscopia de RMN.

Con respecto a los análisis UV-Vis, para definir la concentración ideal de los ensayos de estabilidad, se realizó la caracterización previa de todos los compuestos en DMSO y en el rango de concentración  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M} - 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . La concentración seleccionada fue de  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , ya que la banda de transferencia de carga es muy visible a esta concentración.

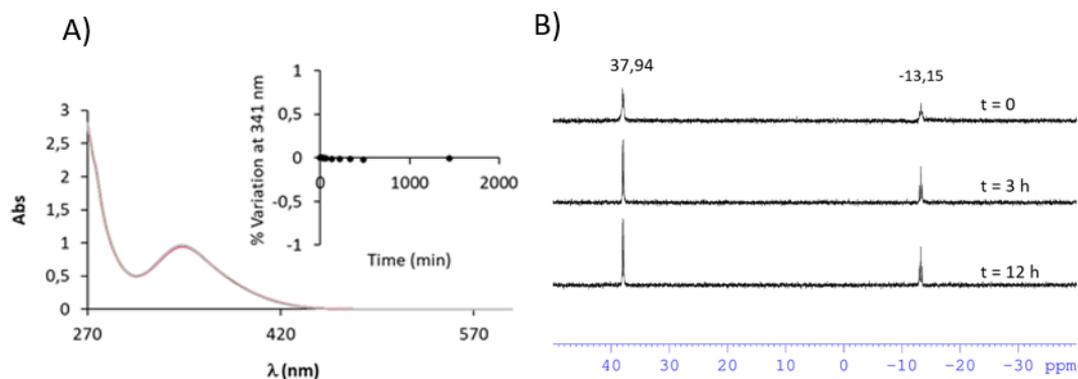
Se seleccionaron tres disolventes para los estudios de estabilidad mediante UV-Vis: DMSO, Tampon buffer (Hepes 0,01 M, pH 7,4) / DMSO al 2% y medio de cultivo (DMEM con Glutamax I (Gibco®) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) y 1% de penicilina / estreptomycin) / 2% de DMSO. La elección de estos disolventes viene determinada por los estudios que íbamos a realizar posteriormente. El DMSO es utilizado para

disolver el complejo antes de los ensayos, la disolución buffer es utilizada en los ensayos de HSA, y el medio de cultivo es el medio en el que se encuentran las líneas celulares y al cual añadiremos nuestro complejo.

Por ello, se preparó una solución de cada complejo ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  M) en los disolventes enumerados anteriormente y se midió mediante espectroscopía de UV-Vis a lo largo del tiempo. Estos ensayos fueron complementados con espectros  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN medidos a lo largo del tiempo en disoluciones DMSO- $d_6$  y DMSO- $d_6$  /  $\text{D}_2\text{O}$ .

Tras medir la estabilidad de los complejos durante 24 h se obtuvieron los siguientes resultados:

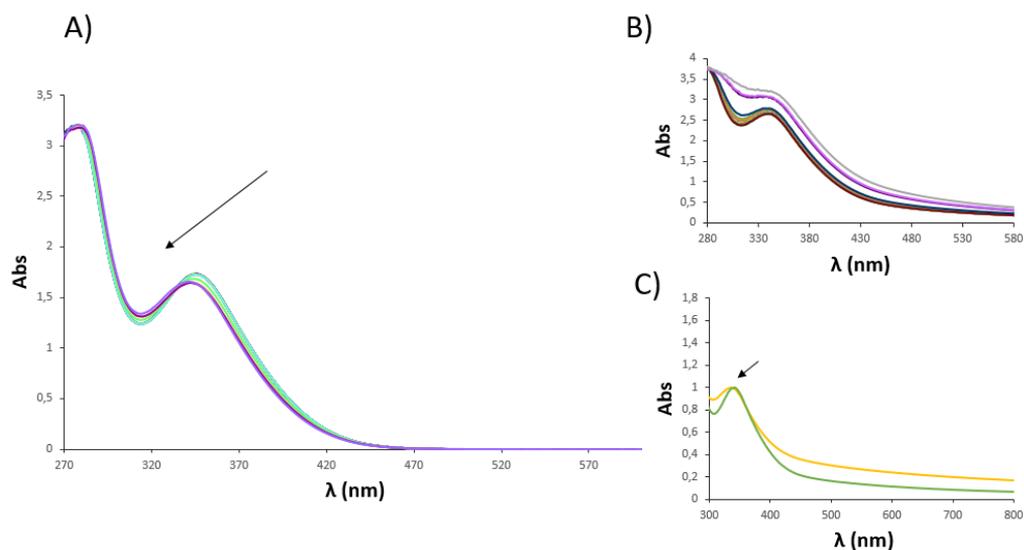
El compuesto  $[\text{RuCp}(\text{HdmoPTA})(\text{PPh}_3)_2](\text{OTf})_2$  (**1**) mostró ser estable en todas las disoluciones estudiadas, tal y como se puede observar en la [figura 53](#). Además, no se observaron cambios en los espectros de forma, intensidad y posición de las bandas ([Figura 53-A](#)), ni en los espectros  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN en DMSO /  $\text{H}_2\text{O}$  ([Figura 53-B](#)).



**Figura 53.** Estudios de estabilidad para el compuesto **1**: A) espectro de UV-Vis a lo largo el tiempo que muestra la variación porcentual a 341 nm a lo largo del tiempo; B) Espectros  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN a lo largo del tiempo en DMSO- $d_6$ /D $_2$ O (1:2) a 25 °C.

En cuanto al compuesto  $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2-\mu\text{-dmoPTA-1}\kappa\text{P:2}\kappa^2\text{N,N}'\text{-ZnCl}_2](\text{OTf})_2$  (**2**), los estudios de estabilidad mostraron que, en DMSO, la banda de transferencia de carga cambia ligeramente a longitudes de onda

más bajas (Figura 54-A), lo que indica un cambio estructural. Esto podría deberse a la liberación de la unidad  $\{ZnCl_2\}$  en DMSO, transformando así el compuesto **2** en el complejo  $[RuCp(PPh_3)_2(dmoPTA-1\kappa P)]^+$ , el cual es igual que **1** pero sin el protón compartido entre los dos  $NCH_3$ . Cuando este compuesto se disuelve en un medio de DMSO / buffer (Figura 54-B) o en DMSO / medio de cultivo (Figura 54-C), se puede observar tanto el cambio en la banda de transferencia de carga como la presencia de precipitado, tal y como se puede observar por el aumento de la absorbancia inicial.



**Figura 54.** Estudios de estabilidad para el compuesto **2**: A) UV-vis en DMSO B) Espectros UV-vis en buffer / DMSO y C) Vis-UV normalizado en medio de cultivo / DMSO a 0 min (verde) y 24 h (amarillo).

Analizando los espectros de RMN de **2** en  $DMSO-d_6$  (Figura 55-A) se puede confirmar que el complejo **2** (originalmente a 37,39 ppm y -15,25 ppm) cambia transformándose en el complejo desprotonado mencionado anteriormente (46,90 ppm y -7,71 ppm, respectivamente). Para determinar la especie final y las reacciones que tienen lugar con exactitud, se deberían llevar a cabo más estudios, como, por ejemplo, mediante HPLC o espectrometría de masas.

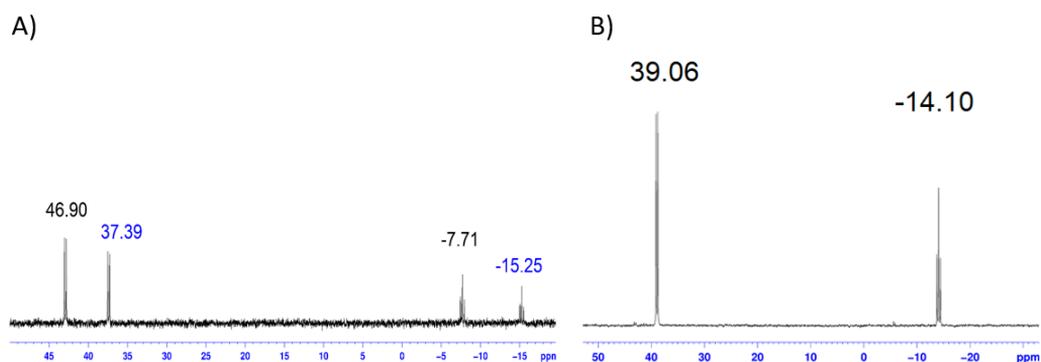
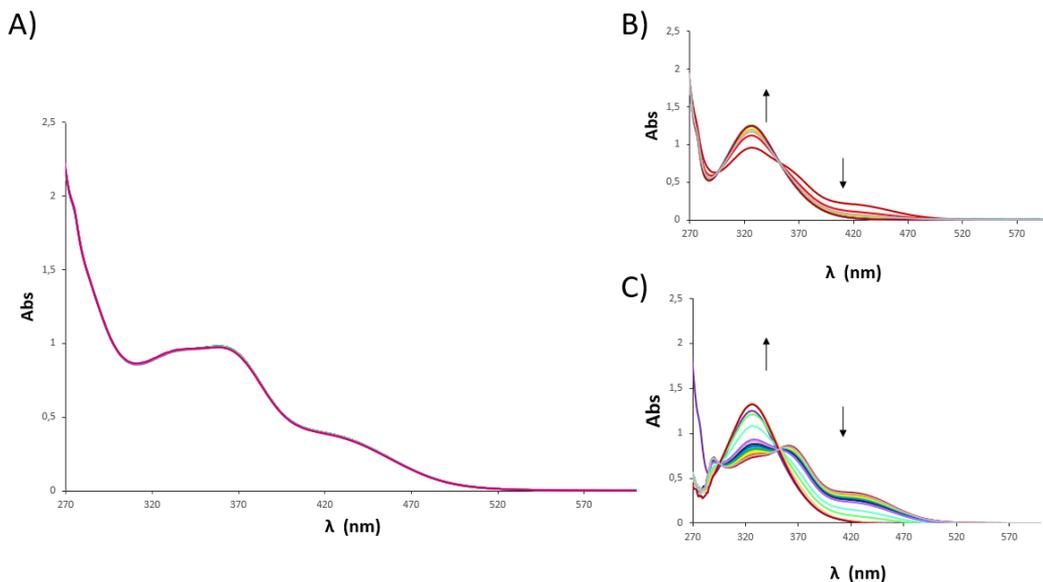
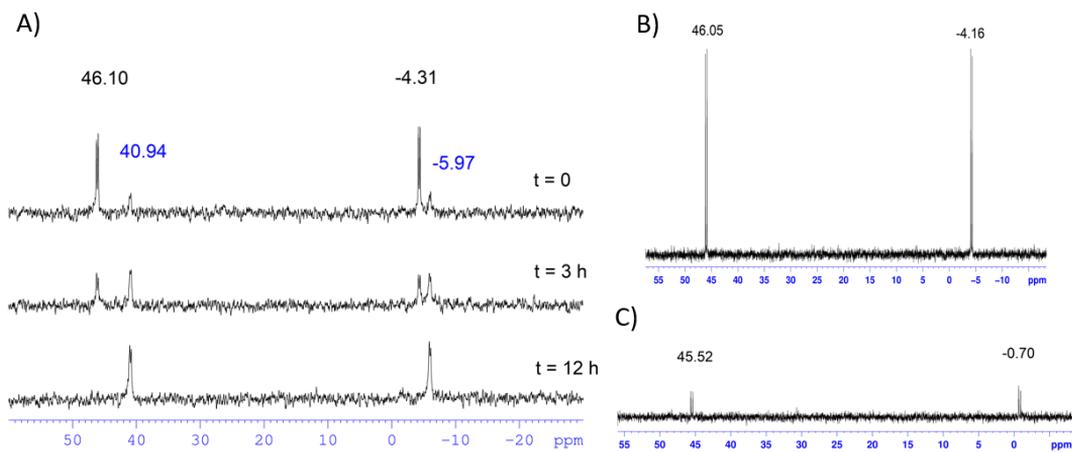


Figura 55. Estudios  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN para A) **2** y B) **1** en DMSO-d<sub>6</sub> a 25 °C.

Finalmente, los estudios de estabilidad de los compuestos  $[\text{RuClCp}(\text{HdmoPTA})(\text{PPh}_3)](\text{OTf})$  (**3**),  $[\text{RuClCp}(\text{dmoPTA})]$  (**4**) y  $[\text{RuClCp}(\text{mPTA})(\text{PPh}_3)](\text{OTf})$  (**5**) mostraron un comportamiento similar. Estos complejos no mostraron variaciones en sus espectros UV-Vis y  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN en DMSO (Figuras 56-A y 57-B, para el complejo **3**). Sin embargo, en DMSO / buffer y DMSO / medio de cultivo celular se transforman en otra especie (Figuras 56-B y 56-C, para **3**). Las mediciones de RMN confirman que los complejos **3-5** están reaccionando a medida que pasa el tiempo, estabilizándose después de 12 h (Figura 57-A). La disminución de las señales de fósforo a 46,10 ppm y -4,31 ppm a lo largo del tiempo, indica que el complejo inicial está reaccionando en un nuevo compuesto, dando lugar a nuevas señales a 40,94 ppm y -5,97 ppm, respectivamente. Además, las señales de fósforo muestran que la sustitución no se lleva a cabo mediante la liberación del ligando  $\text{PPh}_3$  o el ligando PTA, porque de lo contrario, podríamos ver la señal de dichos ligandos a -6 ppm y -80 ppm respectivamente. Así pues, probablemente esté ocurriendo un intercambio del ligando  $\text{Cl}^-$  por agua. Los espectros de UV-Vis en DMSO / medio de cultivo muestran dos intersecciones que indican un equilibrio entre dos especies, lo que corrobora la sustitución entre ligando  $\text{Cl}^-$  y  $\text{OH}_2$  (Figura 56-C) mencionado anteriormente.



**Figura 56.** Estudios de estabilidad para el compuesto **3**: A) espectros UV-vis en DMSO. B) espectros UV-vis en buffer. C) espectro UV-vis en medio celular / DMSO que muestra dos intersecciones debido a la presencia de un equilibrio.



**Figura 57.** Estudios de RMN para el complejo **3**: A) Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN en  $\text{DMSO-d}_6 / \text{D}_2\text{O}$  a lo largo del tiempo a 25 °C. B) Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN en  $\text{DMSO-d}_6$  a 25 °C. C) Espectro  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$ , a 25 °C.

## 2. Determinación de la actividad antiproliferativa en la línea celular de cáncer MCF7.

El IC<sub>50</sub> es una medida cuantitativa de la potencia de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica. Durante esta estancia en Lisboa, medimos la concentración necesaria de los complejos citados anteriormente para inhibir a la mitad del crecimiento de las células.

La determinación de la actividad antiproliferativa de los compuestos en células MCF7 (cáncer de mama) se realizó siguiendo los métodos descritos en bibliografía.<sup>55</sup> Para ello, se ha usado el ensayo de proliferación celular MTT. La línea celular MCF7 se mantuvo en una disolución de DMEM con Glutamax I (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS) y penicilina / estreptomicina al 1%, en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% (Heraeus, Alemania), 37 °C y atmósfera humidificada. Las células fueron adheridas a la superficie en monocapas y después de la confluencia se recogieron mediante su disolución con tripsina-EDTA.

La viabilidad celular se evaluó usando un ensayo colorimétrico basado en MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), que se reduce en formazán (cristales púrpuras) por la acción de una deshidrogenasa mitocondrial en células metabólicas activas.

Con este propósito, las células se depositaron en placas de 96 pocillos a 10·10<sup>3</sup> células / 200 µL. Durante 24 h, las células se dejaron adherir a la superficie, adicionándole posteriormente varias series de dilución de los compuestos **1-5** en medio de cultivo y en alícuotas de 200 µL. Los complejos se solubilizaron primero en DMSO y luego en medio de cultivo, y se añadieron a concentraciones finales que variaban de 0,1 µM a 100 µM. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo celular no excedió el 1%.

---

<sup>55</sup> N. Mendes, F. Tortosa, A. Valente, F. Marques, A. Matos, T. S. Morais, A. I. Tomaz, F. Gartner, M. H. Garcia. *Anticancer Agents Med Chem.*, **2017**, 17, 126-136.

Después de exponer continuamente los compuestos a las células durante 48 horas a 37 °C / 5% de CO<sub>2</sub>, se descartó el medio de cultivo y las células se incubaron con 200 µL de solución de MTT en PBS (0,5 mg / mL) durante 3 horas a 37 °C / 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, la disolución se eliminó y los cristales de formazan púrpura formados dentro de las células se disolvieron en 200 µl de DMSO. La viabilidad celular se evaluó midiendo la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro de placa (PowerWave Xs, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.). El efecto citotóxico de los cinco compuestos se cuantificó calculando la concentración de fármaco que inhibe el crecimiento de células tumorales en un 50% (IC<sub>50</sub>), en base a un análisis de regresión no lineal de datos de respuesta a la dosis (software GraphPad Prism).

Los resultados obtenidos en las medidas antiproliferativas ([Tabla 3](#)) mostraron lo siguiente:

Complex	IC <sub>50</sub> (µM)
1	0.43 ± 0.09
2	0.39 ± 0.20
3	1.13 ± 0.29
4	1.38 ± 0.3
5	12.6 ± 4.2

**Tabla 3.** Valores de IC<sub>50</sub> para cada uno de los complejos (µM) después de 48 h de incubación a 37 °C / 5% de CO<sub>2</sub>.

Los valores de  $IC_{50}$  para los complejos **1** y **3** muestran valores de 0,43 y 1,13  $\mu M$ , respectivamente. Las diferencias estructurales entre estos dos complejos se encuentran en uno de los ligandos: mientras que el complejo **1** tiene un  $PPh_3$ , el complejo **3** tiene un cloruro muy lábil. Se sabe que los cloruros del cisplatino son desplazados por el agua una vez que entran en el citoplasma de las células, convirtiéndose en un potente electrófilo capaz de reaccionar con los grupos sulfidrilos de las proteínas y los átomos dadores de N de los ácidos nucleicos. Por lo tanto, el cisplatino se une a los residuos de purina que causan daño al ADN en las células cancerosas. Sabiendo esto, y teniendo en cuenta que el complejo **3** tiene un ligando  $Cl^-$  lábil (mostrado en nuestros estudios de estabilidad) uno puede suponer que el ADN podría ser un objetivo como en el caso del cisplatino.

Aunque los complejos **3**, **4** y **5** tienen estructuras muy similares, el complejo **5** es aproximadamente 10 veces menos citotóxico que los compuestos **3** y **4**. Estas diferencias parecen estar relacionadas con el ligando PTA que en el caso de **5** es mPTA, mientras que en los complejos **3** y **4** es dmPTA. De acuerdo con estos resultados, podemos deducir que un ligando más voluminoso podría tener un papel importante en el mecanismo biológico de estos compuestos.

Además, los resultados globales parecen indicar que el reemplazo del cloruro por una fosfina conduce a compuestos más citotóxicos (**1** y **3** frente a **3-5**).

A pesar de todo lo discutido anteriormente, no se puede descuidar el hecho de que la mayoría de los compuestos sufren reacción de hidrólisis en los medios celulares, por lo que la especie activa aún tiene que determinarse.

### 3. Determinación del mecanismo de muerte celular mediante ensayos Anexina V/PI.

Como bien es conocido, la célula es la unidad básica reproductora de los seres vivos, por lo que crecen y se dividen de forma controlada en cuanto es necesario para mantener el organismo sano y en correcto funcionamiento. Este período, que abarca desde que la nueva célula es generada hasta su reproducción celular, es denominado como ciclo celular (Figura 58), y dura aproximadamente 24 horas.

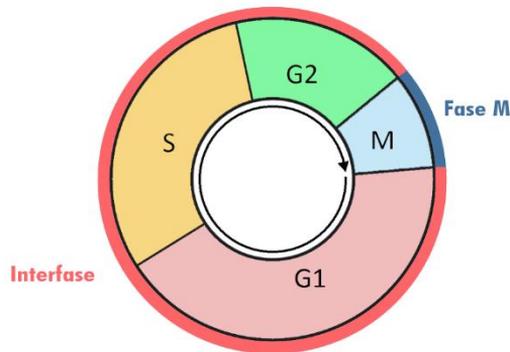


Figura 58. Esquema de las fases que intervienen en el ciclo celular.

Sin embargo, no todas las células realizan la reproducción celular: algunas de ellas entran en un estado vegetativo en el cual solo se limitan a llevar a cabo sus funciones (Fase G0) y otras son inducidas a la muerte celular por imperfecciones en el ADN o errores en su funcionamiento.

Entre los procesos de muerte celular, nos centraremos en: la apoptosis (o muerte celular programada) y la necrosis.

La **apoptosis** puede ocurrir en los organismos multicelulares. Mediante una orden genéticamente programada, se inicia una serie de reacciones bioquímicas que conducen a cambios característicos en la morfología de las células.

La **necrosis**, en cambio, es el daño celular que da lugar a la muerte prematura y no programada de las células en el tejido vivo mediante la autólisis. Este proceso, es provocado por un agente nocivo que causa una lesión tan grave en la membrana plasmática que no se puede reparar o curar. La muerte celular comienza cuando diversos receptores se activan, y el resultado es la pérdida de integridad de la membrana celular.

Esta diferencia estructural en la membrana plasmática es crucial para diferenciar el mecanismo de muerte celular que sufren las células al estar expuestas a los complejos, y es el principal objetivo de esta medida.

La determinación del mecanismo de muerte celular se llevó a cabo mediante la técnica de ensayo Annexin V / PI. Este ensayo, se basa en dos componentes: Anexina V y Yoduro de Propidio.

La anexina V es una proteína capaz de unir ciertos fosfolípidos de la membrana de una célula en la cara interior de la misma (hacia el citoplasma). Después de esto, "se gira" hacia la parte externa durante las primeras etapas de la apoptosis celular.

El PI es una molécula colorante capaz de unirse al ADN y que solo puede entrar en las células cuando se rompe su membrana, lo que es característico de la necrosis y la apoptosis tardía.

Por lo tanto, esta técnica proporciona una forma de identificar diferentes tipos de muerte celular, ya sea por necrosis o apoptosis (tardía y temprana).

Las células MCF7 se trataron con los compuestos a una concentración igual a su  $IC_{50}$  y  $2 \times IC_{50}$  a las 48 h de incubación. Después de eso, las células ( $\sim 2 \cdot 10^5$ ) se recolectaron recogiendo el sobrenadante y lavando las células adheridas con PBS antes de separarlas con tripsina. Para determinar el porcentaje de células muertas, el sedimento se redisolvió en tampón de unión (binding buffer: Hepes 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,14 M,  $CaCl_2$  2,5 mM) que contenía yoduro de propidio (PI) y anexina V. Tras 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, la tasa de células apoptóticas y

/ o necróticas se midió mediante citometría de flujo. Todos los datos fueron analizados usando el software WinMDI 2.9.

Debido a problemas con las contaminaciones de la sala de cultivo celular, estos ensayos deben repetirse para obtener resultados significativos.

#### **4. Estudio de la interacción de los complejos con la albúmina sérica humana (HSA).**

La unión de los compuestos a las proteínas séricas es ahora un requisito de la FDA (Food and Drug Administration) como parte del proceso de desarrollo del fármaco. Además, se conoce que el Ru es capaz de formar aductos estables con determinadas proteínas del plasma sanguíneo,<sup>56</sup> como por ejemplo la albúmina, que se acumula en los tejidos malignos debido a un sistema capilar con fugas que permite una mejora de la permeabilidad y del efecto de retención celular. Esta mejora se puede usar para acceder de forma eficaz a los tumores y administrar así los fármacos con mayor facilidad. Por lo tanto, decidimos estudiar la interacción de nuestros compuestos con HSA por fluorescencia, tal y como se describe en la bibliografía señalada.<sup>57</sup>

Debido a la falta de tiempo, solo se estudió el compuesto **1**.

Para ello, se prepararon disoluciones madre de HSA disolviendo la proteína en tampón Hepes (pH = 7,4). La concentración de HSA fue determinada mediante espectrofotometría UV, utilizando el coeficiente de extinción molar  $\epsilon$  (278 nm) = 36,850 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Se prepararon muestras y controles de diferentes concentraciones disolviendo previamente **1** en DMSO debido a su baja solubilidad en medios acuosos. Luego, se

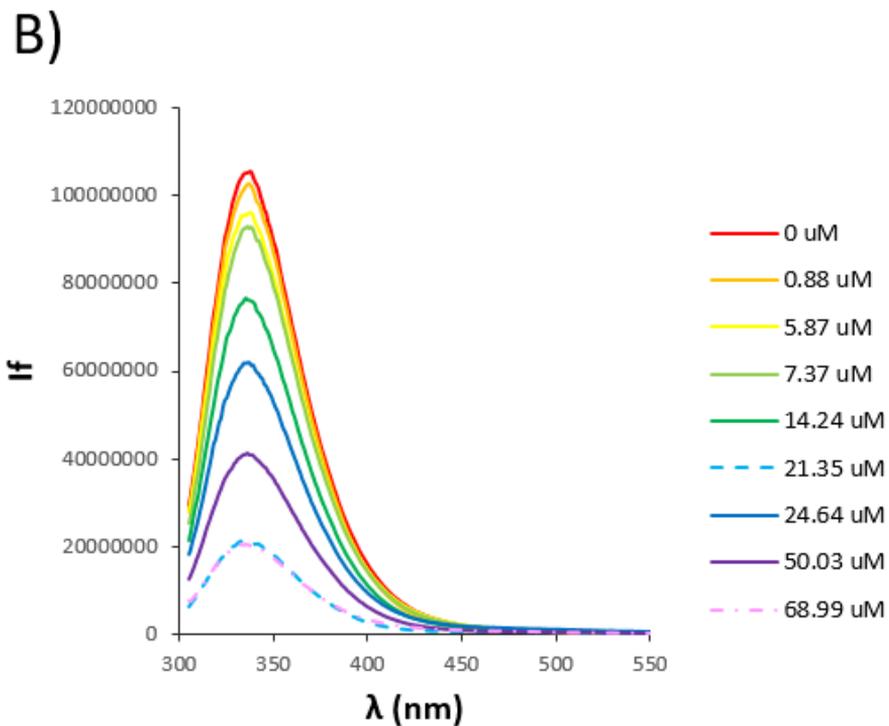
---

<sup>56</sup> J. C. Pessoa, I. Tomaz. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 3701-3738.

<sup>57</sup> A. I. Tomaz, T. Jakusch, T. S. Morais, F. Marques, R. F. M. de Almeida, F. Mendes, E. A. Enyedy, I. Santos, J. C. Pessoa, T. Kiss, M. H. Garcia. *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, *117*, 261-269.

incubaron durante 24 h (a 37 °C). Las muestras y controles de las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluómetro Spex Fluorolog® 3-22 / Tau-3 de Horiba Jobin Yvon, y las mediciones UV-VIS se llevaron a cabo después en un espectrofotómetro Jasco V-660.

De los estudios realizados con HSA se obtuvieron tres conjuntos de datos para el complejo de sistema **1**-HSA, y en la [Figura 59](#) se presenta un gráfico representativo.



**Figura 59.** Espectro de valores de  $I_f$  corregidos del complejo **1** en un rango de 0 - 68.99  $\mu\text{M}$ .

Los datos de emisión de fluorescencia obtenidos mostraron que en presencia de **1** hay un efecto quenching eficiente de la emisión de proteína (del residuo Trp214, concretamente), de modo que la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar la concentración del complejo.

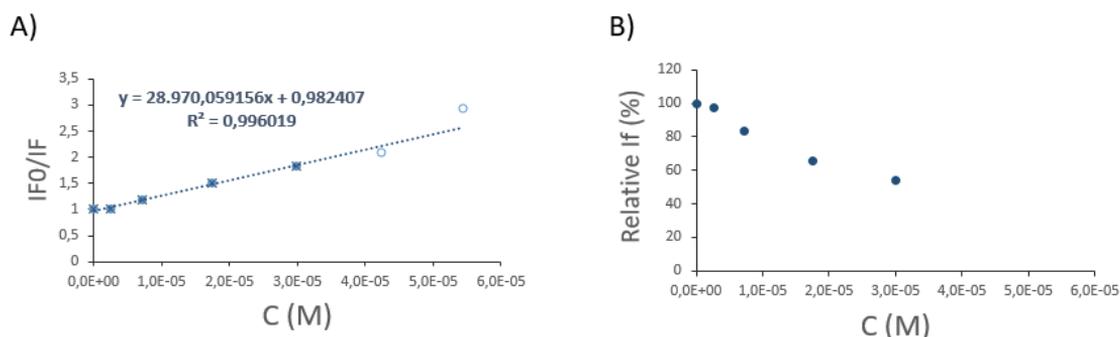
Los espectros normalizados no mostraron desplazamiento en la longitud de onda de emisión de intensidad máxima con y sin el complejo, lo que sugiere que la proteína sería la única especie emisora en disolución y que el aducto (o aductos) formado entre **1** y HSA no es emisoro.

Se puede acceder al mecanismo involucrado en el quenching observado utilizando la relación Stern-Volmer, que se traduce por la siguiente ecuación:

$$\frac{I_f^0}{I_f} = 1 + k_q \tau_0 \cdot [Q]$$

**Ecuación 1.** Ecuación de Stern-Volmer que relaciona la cinética de reacción con el efecto quenching.

Un ajuste lineal para las representaciones de Stern-Volmer para todos los conjuntos de datos (**Figura 60**) sugiere que tiene lugar un mecanismo de quenching estático, por lo que tendríamos la formación de un aducto de proteína 1: 1 complejo. Además, KSV (la constante de Stern-Volmer ( $K_{SV} = k_q \tau_0$ ), se puede interpretar como una constante de enlace,  $K_b$ , la cual hemos calculado utilizando el valor de pendiente obtenido en cada ajuste:  $K_b = 3,5 \cdot 10^4 \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$ , o  $\text{LOG } K_b = 4,49$ ; respectivamente ( $R^2 > 0.99$ ).



**Figura 60.** Estudio de Stern-Volmer de **1** estudiado por A)  $I_f^0 / I_f$  y B) el % Relativo  $I_f$  (%) frente a la concentración ( $\mu\text{M}$ ) en un rango de 0 - 69  $\mu\text{M}$ , a  $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$  y  $25^\circ\text{C}$ .

En resumen, podemos decir que de acuerdo con los resultados obtenidos por RMN, los estudios de estabilidad mediante UV-vis, el  $IC_{50}$  y los ensayos de interacción con HSA, podemos concluir que el complejo **1** cumple los primeros requisitos de la FDA como parte del proceso de desarrollo de medicamentos, puesto que muestra una clara interacción con HSA, un comportamiento estable en los tres medios de mayor relevancia y una prometedora actividad antiproliferativa frente a la línea celular MCF7.

