



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

**Ана Рилак Симовић**

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИСПИТИВАЊЕ  
МЕХАНИЗМА СУПСТИТУЦИОНИХ РЕАКЦИЈА  
РУТЕНИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2015**

## **I. Аутор**

Име и презиме: **Ана Рилак Симовић**

Датум и место рођења: **21. 08. 1985., Крагујевац**

Садашње запослење: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

## **II. Докторска дисертација**

Наслов: **Синтеза, карактеризација и испитивање механизма супституционих реакција рутенијум(II) комплекса**

Број страница: **183**

Број слика: **99**

Број библиографских јединица: **160**

Установа и место где је рад израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

Научна област(УКД): **Хемија(54)-Неорганска хемија(546)**

Ментор: **др Живадин Д. Бугарчић**

## **III. Оцена и одбрана**

Датум пријаве теме: **30. 01. 2013. год.; 10. 04. 2013. год.**

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

- 1. Др Живадин Д. Бугарчић, ментор, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,  
Ужа научна област: Неорганска хемија**
- 2. Др Милош И. Ђуран, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,  
Ужа научна област: Неорганска хемија**
- 3. Др Живослав Љ. Тешић, редовни професор, Хемијски факултет, Београд,  
Ужа научна област: Аналитичка хемија**
- 4. Др Биљана Петровић, ванредни професор, ПМФ, Крагујевац,  
Ужа научна област: Неорганска хемија**

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

- 1. Др Живадин Д. Бугарчић, ментор, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,  
Ужа научна област: Неорганска хемија**
- 2. Др Милош И. Ђуран, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,  
Ужа научна област: Неорганска хемија**
- 3. Др Живослав Љ. Тешић, редовни професор, Хемијски факултет, Београд,  
Ужа научна област: Аналитичка хемија**
- 4. Др Биљана Петровић, ванредни професор, ПМФ, Крагујевац,  
Ужа научна област: Неорганска хемија**

Датум одбране докторске дисертације:

*ПОСВЕЋЕНО РОДИТЕЉИМА*

*Ова докторска дисертација је рађена у Институту за хемију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, под менторским руководством проф. др Живадина Д. Бугарчића.*

*Професору др Живадину Д. Бугарчићу захваљујем се на сугестијама, саветима и подршци током израде, писања и прегледа ове докторске дисертације, као и на указаном поверењу, великом разумевању и стрпљењу.*

*Захваљујем се професорима др Милошу И. Ђурану и др Живославу Љ. Тешићу на учешћу у комисији за преглед, оцену и одбрану тезе.*

*Др Биљани Петровић такође се захваљујем на учешћу у комисији за преглед, оцену и одбрану тезе. Посебно се захваљујем др Петровић на несебичној помоћи током израде и писања докторске дисертације, на знању које ми је преносила током реализације овог рада, као и на многобројним корисним и пријатељским саветима који су ми пуно помогли да истрајем у свом раду.*

*Сарадницима из групе проф. Бугарчића захваљујем на указаном разумевању и заједничком раду.*

*Искрено се захваљујем професору Енцу Алесиу (Enzo Alessio) са Универзитета у Трсту, Италија, на указаном поверењу и разумевању током боравка у његовој лабораторији ради израде дела докторске дисертације. Такође, велику захвалност дугујем др Јоанису Браџосу (Ioannis Bratsos) на несебичној помоћи и корисним саветима и сугестијама током експерименталног рада и израде ове докторске дисертације.*

*Захвалност изражавам кристалографима проф. Ениу Зангранду (Ennio Zangrando), проф. Истоку Турелу (Iztok Turel) и др Јакобу Кљуну (Jakob Kljun) који су урадили рендгенске структурне анализе и значајно допринели интерпретацији резултата.*

*Највећу захвалност дугујем својим родитељима, брату и супругу Александру, као и свим пријатељима на сталној и безрезервној подршци и разумевању. Посебно се захваљујем родитељима на безусловној љубави, стрпљењу и охрабрењу, што ми је пуно олакшало да завршим докторат. Они су мој велики ослонац у животу и зато им посвећујем ову дисертацију.*

*Ана Рилак Симовић*



## Списак радова и саопштења Ане Рилак Симовић

### 1. Научни радови објављени у међународним научним часописима

- 1.1 **Ana Rilak, Biljana Petrović, Sanja Grgurić-Šipka, Živoslav Tešić and Živadin D. Bugarčić,**

*Kinetics and mechanism of the reactions of Ru(II)-arene complex with some biologically relevant ligands,*

*Polyhedron*, 2011, **30**, 2339-2344.

**M22**

- 1.2 **Ana Rilak, Ioannis Bratsos, Ennio Zangrando, Jakob Kljun, Iztok Turel, Živadin D. Bugarčić and Enzo Alessio,**

*Factors that influence the antiproliferative activity of half sandwich Ru<sup>II</sup>-[9]aneS3 coordination compounds: activation kinetics and interaction with guanine derivatives,*

*Dalton Transactions*, 2012, **41**, 11608-11618.

**M21**

- 1.3 **Ana Rilak, Ioannis Bratsos, Ennio Zangrando, Jakob Kljun, Iztok Turel, Živadin D. Bugarčić and Enzo Alessio,**

*New water-soluble ruthenium(II) terpyridine complexes for anticancer activity: synthesis, characterization, activation kinetics and interaction with guanine derivatives,*

*Inorganic Chemistry*, 2014, **53**, 6113-6126.

**M21**

- 1.4 **Ana Rilak, Ralph Puchta and Živadin D. Bugarčić,**

*Mechanism of the reactions of ruthenium(II)polypyridyl complexes with thiourea, sulfur-containing amino acids and nitrogen-containing heterocycles,*

*Polyhedron*, under review.

**M22**

## 2. Радови саопштени на националним научним конференцијама

### 2.1 **Ana Rilak, Biljana Petrović, Sanja Grgurić-Šipka and Ivanka Ivanovic,**

*Kinetics of the substitution reactions of some Ru(II/III) complexes with N-donor biologically relevant nucleophiles,*

48th Meeting of the Serbian Chemical Society,

Novi Sad, Serbia, April 17-18, 2010, NH04.

**M64**

### 2.2 **Ana Rilak, Živadin D. Bugarčić, Ioannis Bratsos, Enzo Alessio and Ennio Zangrando,**

*Interaction of half sandwich Ru(II) coordination compounds with guanine derivatives,*

Golden Jubilee Meeting of the Serbian Chemical Society,

Belgrade, Serbia, June 14-15, 2012, NH01.

**M64**

### 2.3 **Ana Rilak, Živadin D. Bugarčić, Ioannis Bratsos, Enzo Alessio and Ennio Zangrando,**

*New meridional Ru(II) terpyridine complexes: synthesis, characterization, activation kinetics and interaction with guanine derivatives,*

First international conference of young chemists of Serbia,

Belgrade, Serbia, October 19-20, 2012, HS PP3.

**M62**

## 3. Радови саопштени на међународним научним конференцијама

### 3.1 **Ana Rilak and Živadin D. Bugarčić,**

*Interaction of Ru(II)-terpyridine complexes with some nitrogen- and sulfur-donor ligands,*

8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries,

Belgrade, Serbia, June 27-29, 2013, BS-Sy P08.

**M34**

### 3.2 **Ana Rilak, Ralph Puchta and Živadin D. Bugarčić,**

*Interaction of Ru(II)-terpyridine complexes with some sulfur- and nitrogen-containing ligands,*

12th European Biological Inorganic Chemistry Conference,

Zurich, Switzerland, August 24-28, 2014, PO49.

**M34**

#### 4. Стручни радови објављени у националним научним часописима

##### 4.1 Ана Рилак и Живадин Д. Бугарчић,

*Интеракције комплекса метала платинске групе са биомолекулима. Примена и значај у медицини.*

*Хемијски преглед*, 2014, **55**, 30-37.

**M53**

## ИЗВОД

Неорганска једињења имају важну улогу у биолошким и биомедицинским процесима. Познато је да многа једињења која се користе у медицини немају само органски начин деловања. Неки су активирани или биотрансформисани помоћу јона метала, укључујући металоензиме. Други имају директан или индиректан утицај на метаболизам јона метала. Јони метала су такође веома важни за структуру и функцију нуклеинских киселина. Поред тога, неесенцијални јони метала веома често се користе у биолошким системима у терапеутске и дијагностичке сврхе.

Након великог успеха цисплатине у лечењу канцера, посебна пажња је посвећена развоју рутенијум(II/III) комплекса као потенцијалних антитуморских агенаса. Главне разлике између рутенијума и платине су: опсег доступних оксидационих стања, координациони број и геометрија. Везивање рутенијума за биомолекуле може бити реверзибилно, што може редуковати токсичност метала, за разлику од платине. Рутенијум спада у VIII групу прелазних метала као и гвожђе. Рутенијум може да замени гвожђе при везивању за биомолекуле, а како ћелије тумора имају повећану потребу за гвожђем, то ће омогућити ефикаснију доставу комплекса рутенијума до жељене мете.

Примарни циљ развоја рутенијум антитуморских комплекса је наћи такво једињење које ће имати активност према туморима који су резистентни на лекове платине. Секундарни циљ је да активност не би требало да буде праћена великом токсичношћу, односно да једињења имају добру подношљивост и широк терапеутски опсег (тј. велики опсег ефективне дозе пре појаве штетних ефеката).

Како је ДНК важна биолошка мета за многе антитуморске комплексе различитих метала, од великог је значаја познавање механизма координовања за ДНК потенцијалних антитуморских агенаса. Утврђено је да се арена рутенијум(II) комплекси координују претежно за гуанин преко N7 азотовог атома. Затим су истраживања окренута ка интеракцији антитуморских комплекса рутенијума са протеинима. Недавно је пронађено да и ензими могу бити мете у хемотерапији канцера.

У циљу утврђивања односа између структуре и активности нових потенцијално антитуморских комплекса као и у циљу добијања више информација о могућим начинима

интеракције испитиваних комплекса, у оквиру ове докторске дисертације урађена је синтеза и карактеризација монофункционалних рутенијум(II) комплекса, као и испитивање њихових интеракција са биолошки значајним лигандима. Добијени резултати су приказани следећим редоследом:

- Синтеза и карактеризација монофункционалних рутенијум(II) комплекса са меридијалне геометријом опште формуле  $mer-[Ru(L_3)(N-N)X][Y]_n$  (где је  $L_3 = Cl-tpy$  (4'-хлоро-2,2':6',2''-терпиридин) или  $tpy$ ;  $N-N = en$  (1,2-диаминоетан),  $dach$  (1,2-диаминоциклохексан) или  $bpy$  (2,2'-бипиридин));  $X = Cl$  или  $dmsO-S$ ;  $Y = Cl, PF_6$  или  $CF_3SO_3$ ;  $n = 1$  или  $2$ , зависи од природе  $X$ ). Бидентатни хелатни лиганди,  $en$  и  $dach$ , изабрани су ради побољшања растворљивости њихових комплекса у води, као и због њихове способности за формирањем водоничних веза са координованим нуклеобазама. Ова последња особина појавила се као предуслов за посматрање антитуморске активности код монофункционалних „half sandwich” рутенијум(II) комплекса. Ради поређења направљен је и одговарајући  $Ru(Cl-tpy)$  комплекс са  $N-N = bpy$ . Сви новосинтетизовани комплекси су добро растворни у води ( $> 25 \text{ mg/mL}$ ), осим  $[Ru(Cl-tpy)(bpy)(dmsO-S)][Y]_2$  (**8**,  $Y = CF_3SO_3$  или  $PF_6$ ). Проучавање хидролизе нових комплекса у воденом раствору помоћу NMR спектроскопије, показало је да хлоридо деривати  $[Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl][Cl]$  где је  $N-N = en$  (**1**),  $dach$  (**2**) и  $bpy$  (**3**), и  $[Ru(tpy)(N-N)Cl][Cl]$  где је  $N-N = en$  (**4**) и  $dach$  (**5**) хидролизују до одговарајућих аква комплекса. Брзина реакције хидролизе зависи од природе хелатног лиганда (неколико минута за  $en$  и  $dach$ , неколико сати за  $bpy$ ). Са друге стране,  $dmsO$  деривати су веома стабилни у води, чак и након неколико сати нису уочене промене. Не постоје неке значајне разлике у понашању између  $tpy$  и одговарајућих  $Cl-tpy$  комплекса. Такође су испитиване интеракције **1**, **2** и **3** комплекса са дериватима гуанина,  $9MeG$  (9-метилгуанин) и  $5'-GMP$  (гуанозин-5'-монофосфат). Сва три комплекса се координују селективно за  $N7$  азотов атом гуанина. Брзина реакције зависи од природе хелатног лиганда: комплекси **1** и **2**, који имају алифатични диамин као хелатни лиганд, реагују доста брже (неколико минута до неколико сати) у односу на комплекс **3** који садржи  $bpy$

(неколико дана). Поред тога, пронађено је да комплекс **1** показује селективност при координовању за 5'-GMP у конкуренцији са 5'-AMP (аденозин-5'-монофосфат).

- Резултати испитивања супституционих реакција два рутенијум(II)-тру комплекса,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**1**) и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**2**), са тиоуреом (Tu), L-цистеином (L-Cys), L-метионином (L-Met), пиразолом (Pz), 1,2,4-триазолом (Tz) и пиридином (Py). Добијени резултати за реакције комплекса **1** и **2** са испитиваним лигандима јасно показују да брзина реакције зависи од природе хелатног лиганда: en комплекс **1** реагује 2 пута брже у односу на dach комплекс **2**. Међутим, природа улазног лиганда је веома битна. Реактивност изучаваних лиганда опада у следећем низу: Tu > L-Cys > Pz > Tz > Py > L-Met. Негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују на асоцијативни механизам супституције. ДФТ израчунавања указују на јасну предност координације гуанина у односу на координацију тиетра, што може имати важну улогу у фармаколошкој активности рутенијум терпиридин комплекса. У складу са NMR резултатима, важно је напоменути да реакције комплекса **1** и **2** воде ка формирању тиолато комплекса  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{SR})]^+$  (**4**) и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{SR})]^+$  (**11**), а затим до оксидације тиолног сумпора везаног за рутенијум(II), формирајући сулфенато комплексе  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{RSO})]^{2+}$  (**5**) и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{RSO})]^{2+}$  (**12**). NMR експериментално добијени резултати, такође, показују да се у почетној фази реакције, Tz везује за рутенијум(II) преко N2 азотовог атома, што је кинетички фаворизован процес, а затим након 8 до 10 сати почиње формирање термодинамички стабилнијег N4 производа. Разлика у стабилности N2 и N4 производа је додатно доказана и помоћу ДФТ израчунавања.
- Резултати испитивања кинетике реакције хидролизе за три комплекса  $[\text{Ru}([9]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  (**1**),  $[\text{Ru}([9]\text{aneS3})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  (**2**) и  $[\text{Ru}([9]\text{aneS3})(\text{pic})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  (**3**), где је [9]aneS3 = 1,4,7-тритациклононан, pic = пиколин. Како се верује да је ДНК главна биолошка мета одговарајућих аква комплекса, испитивана је интеракција комплекса са дериватима гуанина, 9MeG, Guo (гуанозин) и 5'-GMP. Нађено је да се комплекси координују селективно за N7 азотов атом 9MeG, Guo и 5'-GMP, при чему брзина реакције зависи од природе хелатног лиганда. Рендгенска

структурна анализа комплекса  $[\text{Ru}([\text{9}]aneS3)(en)(9MeG-N7)][PF_6]_2$  (**4**) и  $[\text{Ru}([\text{9}]aneS3)(pic)(9MeG-N7)][PF_6]$  (**10**) показује да када хелатни лиганд поседује могућност формирања водоничне везе ( $chel = en$ ), долази до додатне стабилизације стварањем интрамолекулске водоничне везе између  $C(6)=O$  гуанина и  $NH$  групе  $en$ . Утврђено је да се хидролиза комплекса **1**, **2** и **3** одвија у току 30 минута на 298 K, која је за два реда величине бржа од хидролизе цисплатине и за један ред величине бржа у односу на органометални комплекс  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-арена})(en)Cl]^+$ . Брзина реакције хидролизе расте у следећем низу: **1** ( $en$ ) > **3** ( $pic$ ) > **2** ( $bpy$ ), указујући да зависи од природе и наелектрисања хелатног лиганда. С обзиром да су реакције анације такође брзе, константе равнотеже су релативно мале ( $10^{-2}$  M). Добијени резултати испитивања кинетике супституционих реакција комплекса **1**, **2** и **3** са 5'-GMP, јасно показују да брзина реакције зависи од природе хелатног лиганда пре него од наелектрисања комплекса. Неутрални комплекс **3** везује 5'-GMP истом брзином као и катјонски комплекс **2**, а 2,5 пута брже у односу на комплекс **1**. Асоцијативни механизам реакције супституције је потврђен на основу добијених вредности за енталпију и ентропију активирања ( $\Delta H^\ddagger > 0$ ,  $\Delta S^\ddagger < 0$ ).

- Изучаване су супституционе реакције рутенијум(II) арена комплекса  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-}cum)(pydc)Cl]$  (где је  $p\text{-}cum = p\text{-}изопропил\ толуен$ ,  $pydc = 2,3\text{-}пиридиндикарбоксилато$ ) са азот-донорским нуклеофилима, као што су 5'-GMP, Guo и L-His (L-хистидин), помоћу UV-Vis спектрофотометрије и NMR спектроскопије. Реакције су праћене под условима реакције *pseudo*-првог реда на  $pH = 2,5$  и  $pH = 7,2$ . Ред реактивности испитиваних лиганда је исти на обе  $pH$  вредности:  $Guo > 5'\text{-GMP} > L\text{-His}$ , док су реакције на  $pH = 7,2$  брже. Асоцијативни механизам реакције супституције је потврђен на основу добијених вредности за енталпију и ентропију активирања ( $\Delta H^\ddagger > 0$ ,  $\Delta S^\ddagger < 0$ ). Добијени резултати за константу брзине реакције супституције помоћу  $^1H$  NMR спектроскопије на 295 K указују на исти ред реактивности лиганда. Хидролиза  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-}cum)(pydc)Cl]$  комплекса је веома брза и завршава се за време снимања првог спектра. Додатак вишка  $NaCl$  у равнотежни раствор доводи до померања равнотеже ка хлоридо врсти.

- Испитивана је цитотоксичност  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ ,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{pic})\text{Cl}]$  комплекса према ћелијској линији тумора дебелог црева миша (CT26). На основу добијених резултата утврђено је да  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  комплекс показује највећу активност.  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{pic})\text{Cl}]$  комплекси показују нижу активност према истој ћелијској линији и при истим концентрацијама.



## **SUMMARY**

Inorganic compounds play crucial roles in biological and biomedical processes, and it is evident that many organic compounds used in medicine do not have a purely organic mode of action; some are activated or biotransformed by metal ions including metalloenzymes, others have a direct or indirect effect on metal ion metabolism. Metal ions are also very important for the structure and function (in the case of RNA) of nucleic acids. Inorganic chemistry offers many opportunities for medicinal chemistry, and the discovery of metal-based drugs has moved on from chance discovery to rational drug design. Moreover, nonessential metal ions are very often used in biological systems either for therapeutic application or as diagnostic aids.

After the great success of cisplatin in cancer treatment, special attention was devoted to evaluation of ruthenium complexes as potential antitumor agents. The major differences between ruthenium and platinum are the range of accessible oxidation states, coordination numbers and geometries available. Potentially, ruthenium binding to biomolecules may be reversible, in contrast to platinum, which subsequently reduces the toxicity of the metal. Ruthenium is in the same group of the periodic table as iron (group 8) and may mimic iron in its binding to biomolecules which, as tumor cells have a high demand for iron, would enable the drug to be delivered more effectively to the target side.

The primary goal of developing ruthenium antitumor complexes is to find activity against tumors that are resistant to platinum drugs. A secondary goal is that activity should not be accompanied by severe toxicity, that the compounds have a good tolerability and a large therapeutic window (i.e. a large range of effective dosage before the onset of severe adverse effect).

As DNA is an important potential biological target for many metal-based anticancer complexes, it is of a great importance to understand DNA binding properties of potential anti-cancer agents. It has been found that the arene ruthenium(II) ethylenediamine complexes bind preferentially to guanine residues in double-helical DNA. Currently drug development involving ruthenium complexes has shifted from DNA targeting toward protein targeting drugs. Recently, it was found that enzymes also can be targets in cancer chemotherapy.

With the aim of expanding the structure-activity relationship investigation and in order to obtain more information about the possible interaction mode of studied complexes, here we presented the synthesis and characterization of a series of new water-soluble, monofunctional ruthenium(II) complexes, and their interactions with biologically relevant ligands. The results are presented in the following order:

- Synthesis and characterization of a series of new water-soluble, monofunctional ruthenium(II) complexes with a meridional geometry of the general formula  $mer-[Ru(L_3)(N-N)X][Y]_n$  (where  $L_3 = Cl\text{-tpy}$  or  $tpy$ ;  $N-N = en, dach$  or  $bpy$ ;  $X = Cl$  or  $dms\text{-}S$ ;  $Y = Cl, PF_6$  or  $CF_3SO_3$ ;  $n = 1$  or  $2$ , depending on the nature of  $X$ ). The chelating ligands  $en$  and  $dach$  were selected for improving the solubility in water of their complexes and for their capability to form H-bonds with coordinated nucleobases. This latter property appears as a prerequisite for observing antitumor activity in monofunctional half sandwich Ru(II) compounds. For comparative purposes, the aromatic  $N-N$  donor  $bpy$  ligand was also used. With the exception of  $[Ru(Cl\text{-tpy})(bpy)(dms\text{-}S)][Y]_2$  (**8**,  $Y = CF_3SO_3$  or  $PF_6$ ), all new complexes are well soluble in water ( $> 25$  mg per mL). Studies on the chemical behavior of the new complexes in aqueous solution, monitored by NMR spectroscopy, showed that the chlorido derivatives **1** – **5** release the  $Cl^-$  ligand to form the corresponding aqua species. Whereas the rate of the hydrolysis was found to depend markedly on the nature of the chelating ligand (minutes for  $en$  and  $dach$ , hours for  $bpy$ ) its extent was similar in all cases, with a *ca.* 1:9 ratio between intact and aquated species at equilibrium. On the other hand, the dicationic  $dms\text{-}S$  derivatives **6** – **10** were found to be very stable in water; no release of the  $dms\text{-}S$  was detected even after several hours of observation. No significant difference was observed between the corresponding  $tpy$  and  $Cl\text{-tpy}$  compounds. We also investigated the reactivity of **1** – **3** towards the guanine model compounds 9-methylguanine (9MeG) and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP). All three complexes bind selectively to N7 of 9MeG and 5'-GMP, but with rates and extents that depend strongly on the nature of the chelating ligand: compounds **1** and **2**, that have an aliphatic diamine as chelating ligand, react much faster (minutes to hours) compared to

the bpy complex **3** (days). In addition, we established that complex **1** has selectivity for 5'-GMP when compete with 5'-AMP (adenosine-5'-monophosphate).

- The results of investigation of ligand substitution reactions of two ruthenium(II)-tpy complexes,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**1**) and  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**2**), with thiourea (Tu), L-cysteine (L-Cys), L-methionine (L-Met), pyrazole (Pz), 1,2,4-triazole (Tz) and pyridine (Py). The kinetic data for the reactions of complexes **1** and **2** with investigated ligands clearly showed that the rate of the reaction depends on the nature of the chelating ligand: the en complex **1** reacts *ca.* 2 times faster than dach complex **2**. However, the nature of the entering nucleophile is very important. The following order of reactivity is:  $\text{Tu} > \text{L-Cys} > \text{Pz} > \text{Tz} > \text{Py} > \text{L-Met}$ . An associative mechanism for the substitution process is supported by the negative values of the entropy of activation. The experimental results supported by DFT calculations revealed a clear preference for the coordination of guanine compared to the coordination of thioether, which could play a significant role in the pharmacological activity of ruthenium(II) terpyridine complexes. According to the NMR results it is worth noting that the reactions of complexes **1** and **2** with L-Cys lead to the formation of S-bound thiolato complexes, *i.e.*  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{SR})]^+$  (**4**) and  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{SR})]^+$  (**11**), respectively, followed by oxidation of thiol sulfur bound to Ru(II) forming the sulfenato complexes  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{RSO})]^{2+}$  (**5**) and  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{RSO})]^{2+}$  (**12**), respectively. The NMR experimental evidence also shows that in the initial stage of the reaction, Tz binds to Ru(II) through N2 atom that is kinetically favoured, while after *ca.* 8 to 10 h starts the formation of thermodynamically more stable N4 adduct. The stability differences of the N2- and N4-bound Tz was further supported by DFT calculations.
- The results of investigation of the kinetics of the aquation reaction for three complexes  $\text{Ru}([\text{9}] \text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  (**1**),  $[\text{Ru}([\text{9}] \text{aneS3})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  (**2**), and  $[\text{Ru}([\text{9}] \text{aneS3})(\text{pic})\text{Cl}]$  (**3**). In addition, as DNA is believed to be the main biological target of the corresponding aqua species, we also investigated their binding to the guanine derivatives 9MeG, guanosine (Guo) and in particular, 5'-GMP. We have shown here that complexes **1** – **3** bind selectively to N7 of 9MeG, Guo and 5'-GMP, with rates and extents that depend on the nature of the chelating ligand. The X-ray molecular structures

of compounds  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{en})(9\text{MeG-N7})][\text{PF}_6]_2$  (**4**) and  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{pic})(9\text{MeG-N7})][\text{PF}_6]$  (**10**) clearly showed that when the chelating ligand can act as H-bond donor (chel = en) the binding is further stabilized by intramolecular H-bonding between C(6)=O of guanine and one NH of the en ligand. We also established that the aquation of complexes **1** – **3** occurs within 30 min at 298 K, which is *ca.* two orders of magnitude faster than cisplatin and one order of magnitude faster than the organometallic counterparts

$[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{en})\text{Cl}]^+$ . The rate of aquation increases in the order **1** (en) > **3** (pic) > **2** (bpy), suggesting that it is affected both by the nature and by the charge of the chelating ligand. As the corresponding anation reactions (binding of  $\text{Cl}^-$  to the aqua species) are also rapid, the equilibrium constants are relatively small (*ca.*  $10^{-2}$  M). The kinetic data for the reaction of compounds **1** – **3** with 5'-GMP clearly showed that the rate of the reaction depends on the nature of the chelating ligand rather than on the charge of the complex: the neutral complex **3** binds 5'-GMP as fast as the cationic compound **2**, and *ca.* 2.5 times faster than **1**. An associative mechanism for the substitution process is supported by the measured enthalpies and entropies of activation ( $\Delta H^\ddagger > 0$ ,  $\Delta S^\ddagger < 0$ ).

- The results of investigation of substitution reactions of ruthenium(II) arene complex,  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  (where p-cym = p-isopropyl toluene, pydc = 2,3-pyridinedicarboxylato) with biologically nitrogen-donor nucleophiles, such as 5'-GMP, Guo and L-histidine (L-His) were studied by UV-VIS spectrophotometry and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. The reactions were studied at pH 2.5 and at 7.2. All reactions were followed under *pseudo*-first order conditions with large excess of the nucleophiles. The reactivity of the used ligands follows the same order at both pH values: Guo > 5'-GMP > L-His, while the reactions at pH = 7.2 are always faster. The negative entropies of activation ( $\Delta S^\ddagger$ ) support an associative mode of activation. However, the rate constants obtained by  $^1\text{H}$  NMR at 295 K in  $\text{D}_2\text{O}$  follow the same order of the ligand reactivity. The hydrolysis of the  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  complex was very fast and completed by the time when the first spectrum was measured. Addition of excess of NaCl to equilibrium solutions reversed the hydrolysis.

- The cytotoxicity of the following complexes  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ ,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  and  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{pic})\text{Cl}]$  is investigated against colon cancer cell line CT26. Among them, the most active compound was found to be  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  complex.  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  and  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{pic})\text{Cl}]$  complexes exhibit lower activity against the same tumor cell line at the same concentrations.

## СКРАЋЕНИЦЕ И ОЗНАКЕ

цисплатина	<i>cis</i> -диаминдихлоридоплатина(II)
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
Cl-try	4'-хлоро-2,2',6',2''-терпиридин
try	2,2',6',2''-терпиридин
en	етилендиамин
dach	(±)- <i>trans</i> -1,2-диаминоциклохексан
bpy	2,2'-бипиридин
dmsо-S	диметилсулфоксид
PF <sub>6</sub>	хексафлуорофосфат
CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub>	трифлуорометансулфонат
NMR	нуклеарно магнетна резонантна спектроскопија
9MeG	9-метилгуанин
5'-GMP	гуанозин-5'-монофосфат
5'-AMP	аденозин-5'-монофосфат
Tu	тиоуреа
L-Cys	L-цистеин
L-Met	L-метионин
Pz	пиразол
Tz	1,2,4-триазол
Pу	пиридин
[9]aneS3	1,4,7-тритаациклононан
pic	пиколин
Guo	гуанозин
p-cym	p-изопропил толуен
pydc	2,3-пиридиндикарбоксилато
L-His	L-хистидин
UV-Vis	ултраљубичаста и видљива спектрофотометрија
im	имидазол
ind	индазол
NAMI-A	[Him] <i>trans</i> -[RuCl <sub>4</sub> (im)(dmsо-S)]
KP1019	[Hind] <i>trans</i> -[RuCl <sub>4</sub> (ind) <sub>2</sub> ]
РНК	рибонуклеинска киселина
ben	бензен
bip	бифенил
DНА	дихидроантрацен
TНА	тетрахидроантрацен
карбоплатина	<i>cis</i> -диамин(1,1-циклобутандикарбоксилато)платина(II)
асас	ацетилацетонат
9EtG	9-етилгуанин
5'-CMP	цитидин-5'-монофосфат
5'-TMP	тимидин-5'-монофосфат
HPLC	течна хроматографија високих перформанси,

MS	масена спектроскопија
G	гуанин
T	тимин
GSH	глутатион ( $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин)
cGMP	циклични гуанозин-3',5'-монофосфат
MS	масена спектроскопија
pta	1,3,5-триаза-7-фосфатрицикло[3.3.1.1]-декан
fcl	„face-capping” макроцикличним лигандом
[9]aneN3	1,4,7-триазациклононан
azpy	2-фенилазопиридин
tazpy	o-толилазопиридин
stopped-flow	метода заустављеног тока
S <sub>E</sub>	електрофилна супституција
S <sub>N</sub>	нуклеофилна супституција
D	дисоцијативни механизам
A	асоцијативни механизам
I	механизам измене
E <sub>a</sub>	енергија активирања
R	гасна константа (8,314 JK <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
T	температура у Келвиновим степенима (K)
$\Delta H^\ddagger$	промена енталпије активирања
$\Delta S^\ddagger$	промена ентропије активирања
$\Delta G^\ddagger$	промена слободне (Gibbs-ове) енергије
$\Delta V^\ddagger$	промена запремине активирања
N	Avogadro-ов број ( $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
h	Planck-ова константа ( $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$ )
P	притисак
k <sub>1</sub>	константа брзине повратне реакције
k <sub>2</sub>	константа брзине директне реакције супституције
k	константа брзине хемијске реакције
k <sub>o</sub>	фактор учестаности
bn	бутилендиамин
Nepes	N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфидна киселина
IR	инфрацрвена спектроскопија
Et <sub>3</sub> N	триетиламин
A	апсорбција раствора
$\lambda$	таласна дужина
t	време у секундама (s)
k <sub>obsd</sub>	константа брзине реакције <i>pseudo</i> -првог реда
FBS	фетусни говеђи серум
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
MeOH	метанол
EtOH	етанол

$K_a$	константа киселости
$k_{H_2O}$	константа брзине реакције хидролизе
$k_{Cl}$	константа брзине реакције аналитике



## САДРЖАЈ

<b>Увод</b> .....	1
<b>1. Општи део</b>	
1.1. Рутенијум.....	4
1.2. Антитуморски комплекси рутенијума.....	6
1.3. Комплекси рутенијума(III).....	9
1.3.1. NAMI-A.....	9
1.3.1.1. Хемијске особине NAMI-A.....	10
1.3.1.2. Механизам деловања.....	12
1.3.2. KP1019.....	13
1.3.2.1. Механизам деловања.....	14
1.4. Органометални рутенијум(II) арена комплекси.....	14
1.4.1. Хидролиза рутенијум(II) арена комплекса.....	18
1.4.2. Интеракције рутенијум(II) арена комплекса са нуклеобазама.....	20
1.4.3. Интеракције рутенијум(II) арена комплекса са олигонуклеотидима и ДНК..	21
1.4.4. Реакције са аминокиселинама и протеинима.....	22
1.4.5. RAPTA комплекси.....	25
1.5. Half-sandwich рутенијум(II) комплекси.....	25
1.6. Рутенијум(II) полипиридил комплекси.....	28
1.7. Супституционе реакције комплексних једињења.....	30
1.8. Активациони параметри.....	33
1.9. Одређивање механизма нуклеофилних супституционих реакција.....	36
1.10. Реакције супституције октаедарских комплекса.....	38
1.10.1. Утицај одлазећег лиганда.....	39
1.10.2. Утицај инертног лиганда.....	39
1.10.3. Стерне сметње.....	40
<b>Задатак рада</b> .....	41
<b>2. Експериментални део</b>	

2.1.	Хемикалије и реагенси.....	42
2.2.	Синтеза комплекса.....	42
2.3.	Инструменти.....	53
2.4.	Кинетичка мерења.....	54
2.4.1.	Реакције хидролизе и супституције $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ и $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ комплекса.....	54
2.4.2.	Реакције хидролизе и супституције $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ , $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ и $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{pic})\text{Cl}]$ комплекса.....	55
2.4.3.	Супституционе реакције рутенијум(II) арена $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{Ru}(\text{pydc})\text{Cl}]$ комплекса.....	57
2.5.	$^1\text{H}$ NMR мерења.....	57
2.6.	pH титрације.....	57
2.7.	Квантно хемијска метода.....	58
2.8.	Рендгенска структурна анализа.....	58
2.9.	Испитивање цитотоксичности.....	61
2.9.1.	Ћелијске културе.....	61
2.9.2.	МТТ-тест.....	61

### 3. Резултати и дискусија резултата

3.1.	Нови рутенијум(II) терпиридин комплекси: синтеза, карактеризација, активациона кинетика и интеракција са дериватима гуанина .....	64
3.1.1.	Синтеза и карактеризација рутенијум(II) терпиридин комплекса.....	65
3.1.2.	Хемијско понашање у воденом раствору .....	77
3.1.2.1.	NMR испитивања .....	78
3.1.2.2.	Кинетичка испитивања реакције хидролизе.....	80
3.1.2.3.	Одређивање $\text{pK}_a$ вредности.....	82
3.1.3.	Интеракције са дериватима гуанина .....	84
3.1.4.	Интеракције $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}]^+$ ( <b>1</b> ) са 5'-AMP и компетитивне реакције са мешом 5'-AMP и 5'-GMP.....	95
3.1.5.	UV/Vis испитивања реакције комплекса <b>1</b> и <b>2</b> са дериватима гуанина.....	98

3.2.	Интеракција рутенијум(II) терпиридин комплекса са сумпор- и азот-донорским биомолекулима .....	102
3.2.1.	UV-Vis испитивања реакције комплекса <b>1</b> и <b>2</b> са сумпор- и азот-донорским биомолекулима.....	103
3.2.2.	NMR испитивања реакције комплекса <b>1</b> и <b>2</b> са сумпор-донорским биомолекулима .....	109
3.2.3.	ДФТ израчунавања за систем размене Gua/SMe <sub>2</sub> .....	117
3.2.4.	NMR испитивања реакције комплекса <b>1</b> и <b>2</b> са азот-донорским биомолекулима .....	120
3.3.	Фактори који утичу на антипролиферативну активност Ru <sup>II</sup> -[9]aneS3 комплекса: активациона кинетика и интеракције са дериватима гуанина.....	127
3.3.1.	Хемијско понашање Ru-[9]aneS3 комплекса <b>1</b> , <b>2</b> и <b>3</b> у воденом раствору.....	127
3.3.2.	NMR испитивања.....	128
3.3.3.	Рендгенска структурна анализа.....	145
3.3.4.	UV-Vis кинетичка испитивања реакције хидролизе и анације.....	150
3.3.5.	UV-Vis испитивања реакције комплекса <b>1</b> , <b>2</b> и <b>3</b> са 5'-GMP.....	153
3.4.	Кинетика и механизам супституционих реакција рутенијум(II) арена комплекса са биолошки релевантним лигандима.....	156
3.4.1.	UV-Vis кинетичка мерења.....	157
3.4.2.	<sup>1</sup> H NMR кинетичка мерења.....	162
3.5.	Испитивање цитотоксичности рутенијум(II) полипиридил комплекса.....	167
	<b>Закључак</b> .....	169
	<b>Литература</b> .....	172
	<b>Биографија</b> .....	183

## УВОД

Јони прелазних метала и њихови комплекси имају веома важну улогу у различитим биохемијским и матаболичким процесима. Поред тога, јони неесенцијалних метала се често примењују у биолошким системима у терапеутске и дијагностичке сврхе. Широко опсега доступних оксидационих стања, координациони бројеви и геометрија, као и термодинамичке и кинетичке карактеристике јона метала, воде до једињења која нуде могућност дизајнирања разних терапеутских агенаса. Открића у неорганској и бинеорганској хемији имају важан утицај на савремену клиничку медицину.<sup>1</sup>

У потрази за лековима који нису на бази платине, рутенијум заузима важно место, нарочито због мање токсичности и веће селективности према ћелијама канцера.<sup>1</sup> Верује се да је то због могућности рутенијума да замени гвожђе при координовању за биомолекуле. Како ћелије канцера имају повећан број трансферских рецептора да би задовољили повећану потребу за гвожђем, комплекси рутенијума могу бити ефикасније испоручени до ћелија тумора. Утврђено је да неколико једињења показује активност веома сличну цисплатини, а у неким случајевима чак и бољу. На пример, изоелектронски рутенијум(III) комплекси  $[\text{Him}]_{\text{trans}}\text{-}[\text{RuCl}_4(\text{im})_2]$  и  $[\text{Hind}]_{\text{trans}}\text{-}[\text{RuCl}_4(\text{ind})_2]$  (im = имидазол, ind = индазол) су показали активност према неколико различитих тумора, нарочито према платина резистентним колоректалним туморима. Такође, рутенијум(III) комплекс,  $[\text{Him}]_{\text{trans}}\text{-}[\text{RuCl}_4(\text{im})(\text{dms}\text{-}\text{S})]$  је посебно активан према чврстим метастазирајућим туморима миша.  $[\text{Him}]_{\text{trans}}\text{-}[\text{RuCl}_4(\text{im})(\text{dms}\text{-}\text{S})]$  (NAMI-A) и  $[\text{Hind}]_{\text{trans}}\text{-}[\text{RuCl}_4(\text{ind})_2]$  (KP1019) комплекси су успешно прошли I фазу испитивања. Постоји повећано интересовање у примени органометалних једињења, комплекса са барем једном метал-угљеник везом, у биологији и медицини. Арена рутенијум(II), органометални комплекси су привукли велику пажњу, с обзиром да је познато да арена лиганди стабилизују рутенијум у +2 оксидационом стању. Комплекси рутенијума(III) су инертнији у односу на одговарајуће комплексе рутенијума(II).<sup>2</sup> Утврђено је да „half-sandwich” арена рутенијум(II) комплекси,  $[(\eta^6\text{-арена})\text{RuX}(\text{N-N})]$  (X је халоген и N-N је бидентатни лиганд) често поседују добру растворљивост у води (предност за клиничку употребу), као и да су арена лиганди релативно инертни на измене у физиолошким условима. Утицај

структурних варијација на антиканцерогену активност арена рутенијум комплекса је интензивно испитиван. Верује се да је главна мета арена рутенијум антиканцерогених комплекса ДНК или РНК, али такође, могу бити и серум протеини.

Последњих неколико деценија, многобројна истраживања су била усмерена на синтезу рутенијум(II) полипиридил комплекса. Проучавана је њихова способност координовања за ДНК, при чему је пронађено да се већина ових комплекса ковалентно везује за N7 атом гуанина, формирајући монофункционалне производе, а неки од њих стопају репликацију ДНК. Већина рутенијум(II) терпиридин комплекса, која има такође и *N-N* полипиридил лиганд (нпр. бру), за последицу има веома ниску растворљивост у воденом раствору, ограничавајући биолошки релевантна истраживања.

Имајући то у виду, било је од значаја усмерити испитивања ка синтези и карактеризацији рутенијум(II) терпиридин комплекса меридијалне геометрије и њиховој интеракцији са ДНК нуклеобазама. У оквиру ове докторске дисертације испитивани су рутенијум(II) арена комплекси, „half-sandwich” Ru-[9]aneS3 комплекси и рутенијум(II) терпиридин комплекси у реакцијама са различитим биомолекулима. У *Општем делу* детаљно су описани рутенијум(II/III) комплекси, начин њиховог антитуморског дејства као и низ фактора који утичу на механизам реакције и антитуморску активност ових комплекса. Дат је преглед досада публикованих резултата на пољу интеракција рутенијум(II) арена, „half-sandwich” Ru-[9]aneS3 и рутенијум(II) полипиридил комплекса са дериватима гуанина, серум протеинима, пептидима и аминокиселинама. Представљен је детаљан опис супституционих реакција октаедарских комплекса са посебним освртом на бројне факторе који утичу на процес супституције. У *Експерименталном делу* су поред начина припреме коришћених реагенаса и раствора, описане методе коришћене приликом синтезе и карактеризације нових рутенијум(II) терпиридин комплекса, као и приликом испитивања њихових интеракција. Такође, описане су и методе за изучавање хидролизе рутенијум(II) комплекса, као и квантно хемијска (ДФТ) метода. Наведени су и коришћени инструменти. У поглављу *Резултати и дискусија резултата* детаљно је описана синтеза и карактеризација нових рутенијум(II) терпиридин комплекса опште формуле  $mer-[Ru(L_3)(N-N)X][Y]_n$ , њихова активациона кинетика, интеракција са дериватима гуанина (9-MeG, 5'-GMP и 5'-AMP), различитим хетероцикличним лигандима (Ру, Рз и Тз), аминокиселинама које садрже сумпор (L-Cys и L-Met) и Ту, као и ДФТ израчунавања.

Одређене су константе стабилности новосинтетизованих комплекса. Детаљно су описани фактори који утичу на антипролиферативну активност Ru-[9]aneS3 комплекса, [Ru([9]aneS3)(en)Cl][PF<sub>6</sub>], [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF<sub>6</sub>] и [Ru([9]aneS3)(pic)Cl], њихова активациона кинетика, интеракција са дериватима гуанина (9-MeG, Guo и 5'-GMP), као и карактеризација финалних реакционих производа помоћу рендгенске структурне анализе. Такође, приказани су резултати испитивања кинетике и механизма супституционих реакција комплекса [Ru(η<sup>6</sup>-p-cym)(pydc)Cl] са Guo, 5'-GMP и L-His, применом различитих експерименталних метода. На крају се налазе резултати испитивања цитотоксичности одабраних комплекса према одређеним ћелијским линијама тумора. Детаљно разумевање механизма понашања комплекса рутенијума у биолошким условима је основа будућих испитивања и развоја нових антитуморских агенаса, као и проналаска алтернативних третмана у терпији канцера.

Резултати ове докторске дисертације објављени су у оквиру 4 научна рада.

## 1. ОПШТИ ДЕО

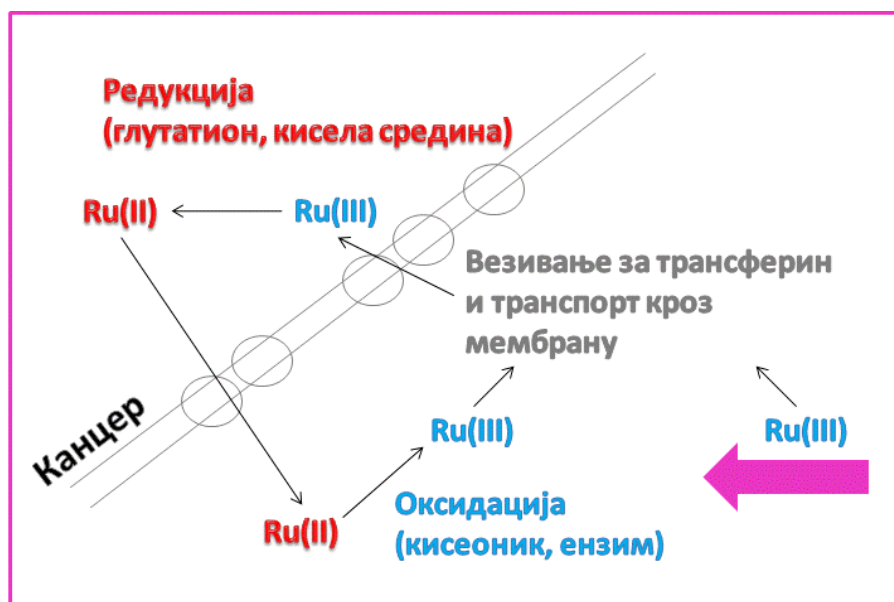
### 1.1. Рутенијум

Рутенијум спада у VIII групу прелазних метала и заједно са Os, Rh, Ir, Pd и Pt чини платинску групу метала. Име је добио по латинском називу за Русију (Ruthenia). Рутенијум има атомски број 44 ( $Kr\ 5s^14d^7$ ) и атомску масу 101,07. Постоји неколико изотопа рутенијума ( $^{96}Ru$ ,  $^{98}Ru$ ,  $^{99}Ru$ ,  $^{100}Ru$ ,  $^{101}Ru$ ,  $^{102}Ru$  и  $^{104}Ru$ ) од којих је изотоп  $^{102}Ru$  најзаступљенији са 31,6%. Рутенијум има широк опсег оксидационих стања од -2 до +8 тако да су његови комплекси редукционо активни и њихова примена као редукционих агенаса у различитим хемијским реакцијама је од великог значаја. У физиолошким условима може постојати у три оксидациона стања: рутенијум(II), рутенијум(III) и рутенијум(IV). Рутенијум(III) је доминантно оксидационо стање у физиолошким условима док су рутенијум(II) и рутенијум(IV) оксидациона стања која се лако постижу у присуству биолошких редуктаната (аскорбинска киселина или глутатион) или оксидационих агенаса ( $O_2$  или  $H_2O_2$ ). Сва три оксидациона стања граде координациона једињења октаедарске геометрије, док рутенијум(II) органометални комплекси граде једињења псеудооктаедарске геометрије (тзв. „*riano stool*” комплекси).<sup>1</sup>

Рутенијум(II) има попуњене све три ( $t_{2g}$ ) d орбитале што га чини дијамагнетичним док рутенијум(III) има један неспарен електрон у ( $t_{2g}$ ) d орбитали и он је парамагнетичан.<sup>2</sup> Разлика у само једном електрону између ова два оксидациона стања значајно утиче на њихове хемијске карактеристике. Рутенијум(II) се понаша као мека киселина и може имати  $\pi$ -донорске особине,<sup>3</sup> а рутенијум(III) се понаша као тврда киселина и може имати  $\pi$ -акцепторске особине.<sup>4</sup>

Комплекси рутенијума(III) су инертнији у односу на одговарајуће комплексе рутенијума(II). Из тог разлога активациони механизам тзв. „активација редукцијом” предложен је од стране професора Clarke-а, који је био међу првима који су истраживали комплексе рутенијума као потенцијалне антитуморске агенсе.<sup>5</sup> Он је заједно са својим сарадницима предложио да комплекси рутенијума(III) прво подлежу *in vivo* редукцији до мање инертног рутенијум(II) оксидационог стања, а затим долази до отпуштања хлоридо лиганда и стварања аква метаболита који је способан да се веже за биолошке мете.<sup>6</sup> Ови

комплекси остају у релативно неактивном рутенијум(III) оксидационом стању све док не стигну до туморског ткива где је присутан нижи сарджај кисеоника и рН, и повећана концентрација глутатиона (редукциони агенс) у односу на нормална ткива (Слика 1.1). У овим условима олакшана је редукција рутенијума(III) до рутенијума(II). Редокс потенцијал рутенијума је реверзибилан, па постоји могућност да се активан комплекс рутенијума(II) у нормално прокрвљеним ткивима са већом концентрацијом кисеоника, оксидује до инертног комплекса рутенијума(III).<sup>7</sup> Овај активациони пут може бити одговоран за селективну токсичност према канцерогеним ћелијама, као и за ефикасност према хипоксичним туморима који могу бити отпорни на хемотерапију и радиотерапију.



Слика 1.1. Предложени механизам активације комплекса рутенијума(III)

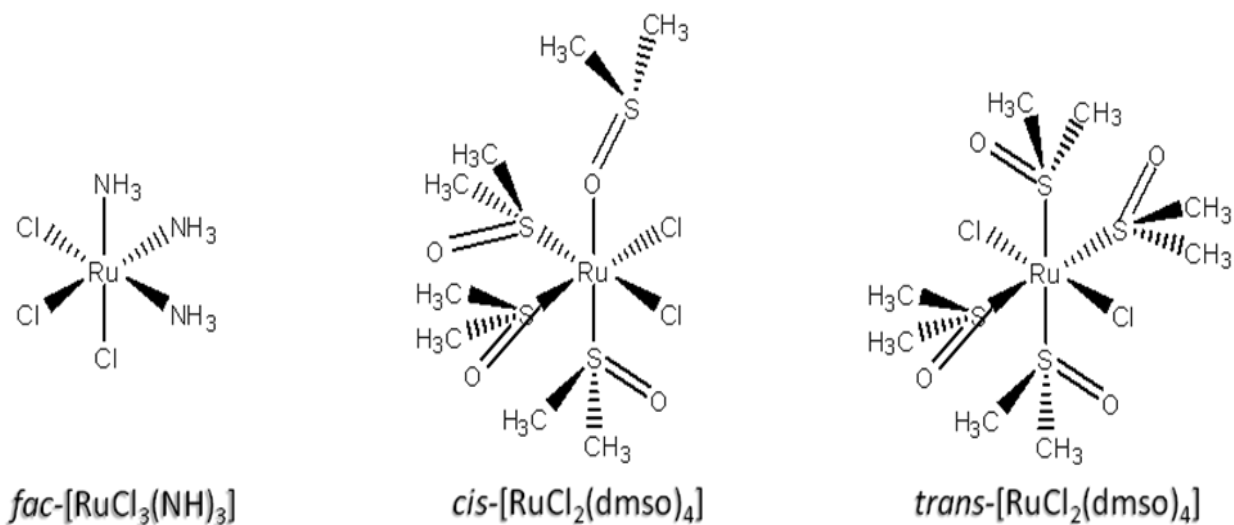
Још једна важна особина комплекса рутенијума(III) је способност да замени гвожђе при везивању за многе биомолекуле, укључујући серум протеине (нпр. трансферин и албумин). Рутенијум се везује за трансферин, при чему настаје трансферин-рутенијумски комплекс који може бити активно транспортован у туморска ткива на чијој се површини налази знатно већи број трансферинских рецептора у односу на здрава ткива.<sup>8</sup> Када се једном веже за трансферински рецептор, комплекс ослобађа рутенијум који се може лако



интернализовати у тумор.<sup>9,10</sup> Верује се да је ово други узрок селективног деловања комплекса рутенијума према ћелијама канцера што доводи и до смањења споредних нежељених ефеката терапије.<sup>11</sup>

## 1.2. Антитуморски комплекси рутенијума

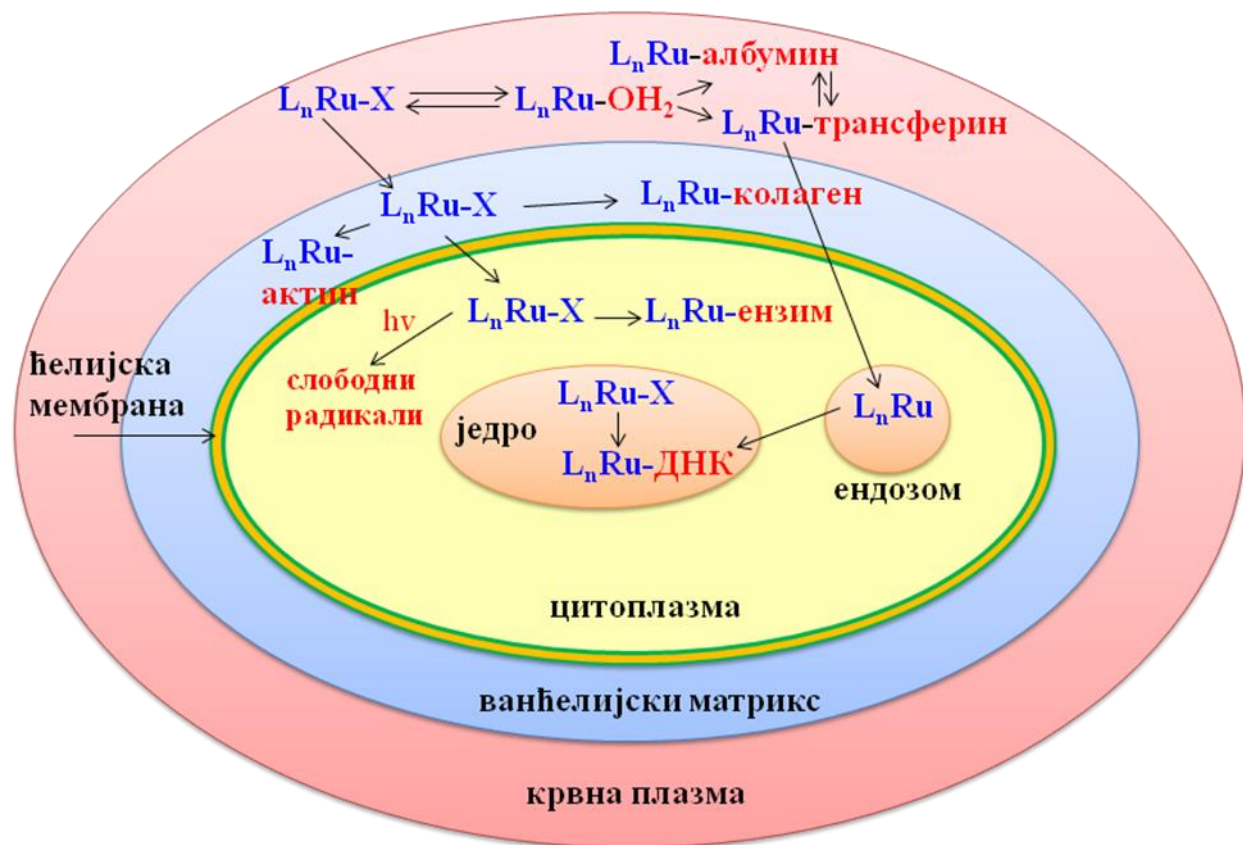
Први комплекси рутенијума тестирани на антитуморску активност су хлоро-амин- $\text{Ru(III)}$  комплекси јасно инспирисани цисплатином, за које се сматрало да реагују примарно са ДНК. Clarke је заједно са својим сарадницима први објавио резултате о антитуморској активности комплекса  $\text{fac-[RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$  (Слика 1.2).<sup>12</sup> Испитивања су показала да има чак и већу активност у односу на цисплатину у случају леукемије Р388. Међутим, недостатак и велики проблем у примени овог комплекса представља његова слаба растворљивост у физиолошком раствору, па због тога никада није нашао фармаколошку примену. Испитана је и цитотоксичност још једног рутенијум-аминског комплекса, који се користи као средство за бојење алдехид фиксираних мукополисахарида у хистологији, тзв. рутенијум црвено. Сматра се да ова цитолошка боја инхибира транспорт  $\text{Ca(II)}$  у ћелију селективним везивањем за  $\text{Ca(II)}$  транспортујуће протеине.<sup>5b,12,13</sup>



Слика 1.2. Структурне формуле неких комплекса рутенијума који показују антитуморску активност

Mestroni je sa svojim saradnicima ispitivao antitumorsku aktivnost rutенијум(II) комплекса, *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dmsо)<sub>4</sub>] (dmsо = диметилсулфоксид) (Слика 1.2).<sup>14</sup> Овај комплекс није цитотоксичан *in vitro*, а *in vivo* је показао токсичност три пута мању у односу на цисплатину. Ипак, при максималној толерантној дози овај комплекс је показао велику активност и према примарном тумору и према метастазама на примеру миша са чврстим метастазирајућим тумором.<sup>15</sup> На моларној основи, цитотоксичност *trans* изомера (Слика 1.2) је чак око 20 пута већа у односу на *cis* изомер и овај комплекс је ефикаснији у смањењу броја и тежине спонтаних метастаза које потичу од примарних тумора. У експериментима на мишевима којима је оперативно уклоњен примарни тумор, *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(dmsо)<sub>4</sub>] је ефикаснији у односу на цисплатину по питању постоперативног продужења животног века. Другим речима, овај *trans* изомер је показао мању активност према примарном тумору, али већу селективност и ефикасност према метастазама.<sup>14</sup> Ова чињеница указала је на разлику у механизму реакција комплекса рутенијума у односу на комплексе платине.<sup>16</sup>

Ревиије о антитуморској активности комплекса рутенијума, које су објављене последњих десетак година, концентришу се на NAMI-A<sup>17-19</sup> и KP1019,<sup>20-22</sup> или на групу комплекса са сличним лигандима, као што су амини<sup>5b</sup>, полипиридили,<sup>5b,23,24</sup> полиаминкарбоксилати,<sup>25</sup> или арени,<sup>26-30</sup> као и на различитим врстама реактивности у биолошкој средини. Са друге стране, скорашњи радови указују на сличности у механизму деловања различитих типова антиканцерогених комплекса рутенијума. На пример, специфична антиметастатска активност која је до скоро сматрана као јединствена особина комплекса NAMI-A, такође је демонстрирана и за RAPTA рутенијум(II) арена комплексе.<sup>31</sup> Као и код NAMI-A, антиметастатска активност рутенијум(II) арена комплекса је у вези са интеракцијом са ванћелијским матриksom и површином ћелије, пре него са ДНК у ћелијском нуклеусу.<sup>31</sup> У прошлости, многа испитивања су концентрисана на везивање комплекса рутенијума за ДНК и његове компоненте,<sup>5b,12,23,32,33</sup> док је од недавно главни фокус усмерен ка интеракцијама са протеинима крвне плазме.<sup>21,34</sup>



**Шема 1.1.** Предложени активациони путеви антиканцерогених комплекса рутенијума ( $L$  су инертни лиганди, а  $X$  је одлазећа група)<sup>1</sup>

На основу Шеме 1.1 можемо видети да постоје два главна метаболичка пута рутенијум комплекса опште формуле  $L_nRu-X$ , где су  $L$  инертни лиганди као што су арена или  $N$ -донори, а  $X$  је одлазећа група као што је хлоридо или карбоксилато:

- пропустљивост ћелије пасивном дифузијом или специфичним транспортним механизмом из ванћелијског у унутарћелијски простор и
- хидролиза комплекса и везивање за одговарајуће биомолекуле.

Након интравенске администрације, комплекс рутенијума може подлећи хидролизи у крвној плазми у већој или мањој мери, а затим везивању за серум протеине, као што су албумин или трансферин (Шема 1.1).<sup>21,34</sup> Предложени механизам је да се рутенијум(II) ослобађа из рутенијум(III)-трансферинског комплекса унутар ћелије, при чему се

редукција врши глутатионом или аскорбинском киселином.<sup>20</sup> Међутим, уколико рутенијум(III) доспе у ћелију у облику стабилног комплекса са трансферином, следиће метаболички пут гвожђе(III)-трансферинског комплекса, укључујући везивање за трансферинске рецепторе на површини ћелије, затим енкапсулацију у ендозому (Шема 1.1), из ког се ослобађа као комплекс рутенијума(II) комбинацијом ензимске редукције и смањене рН вредности у ендозому.<sup>35</sup>

Уколико се комплекс рутенијума не веже за протеине у крвној плазми, може дифундовати у ванћелијски матрикс и формирати адукте са колагеном или протеинима на површини ћелије (као што је актин) који могу бити одговорни за антиметастатску активност NAMI-A<sup>36-38</sup> и рутенијум(II) арена комплекса.<sup>31</sup>

Неизреаговани комплекс може даље дифундовати кроз ћелијску мембрану у цитоплазму (Шема 1.1) и везати се за активне центре разних ензима, ковалентно<sup>39-41</sup> или нековалентно.<sup>42,43</sup> На крају, врсте које стигну до ћелијског нуклеуса, дифузијом или транспортним механизмом, могу формирати ДНК адукте.<sup>23,33,44</sup> Способност да се прати пут комплекса рутенијума из крвне плазме до ћелије, као и хемијске трансформације рутенијума, су од изузетне важности за разумевање механизма антитуморске активности комплекса рутенијума.

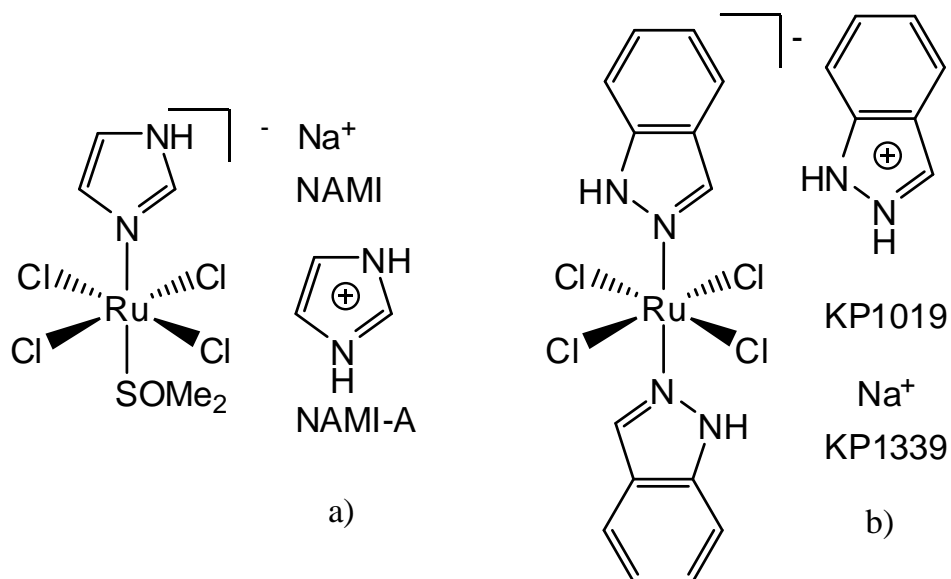
### 1.3. Комплекси рутенијума(III)

Истраживања комплекса рутенијума постају интензивнија након открића антитуморске активности два изоелектронска, ањонска комплекса рутенијума(III) са хетероцикличним базама: NAMI-A, [Him]trans-[RuCl<sub>4</sub>(im)(dmsO-S)] (im = имидазол), синтетисан од стране Alessio-ове групе и KP1019, [Hind]trans-[RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>] (ind = индазол), синтетисан од стране Kerpler-ове групе (Слика 1.3).

#### 1.3.1. NAMI-A

Раних 90-тих синтетисан је комплекс [Na]trans-[RuCl<sub>4</sub>(im)(dmsO-S)] (NAMI) (Слика 3а), који је посебно активан према чврстим метастазирајућим туморима.<sup>18,45</sup> У преклиничким истраживањима NAMI је замењен својим аналогом, односно имидазолном сољу истог комплекса, NAMI-A [Him]trans-[RuCl<sub>4</sub>(im)(dmsO-S)] (Слика 1.3а). Ово је први

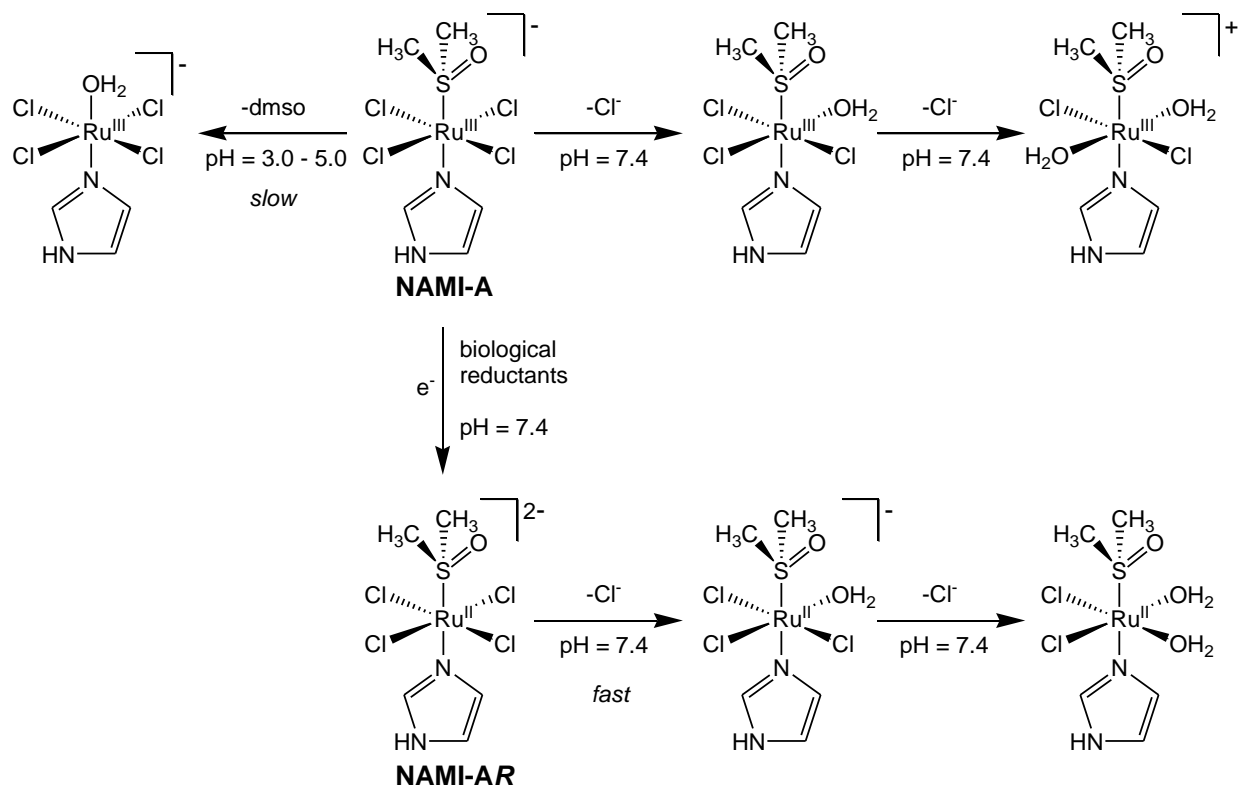
комплекс рутенијума који је ушао у фазу I клиничког испитивања, 1999. године, на холандском Институту за борбу против рака у Амстердаму. NAMI-A поседује повољне биолошке и хемијске карактеристике: добра антимагнетна активност, ниска општа токсичност, лака и репродуктивна припрема, добра стабилност, а те особине иницирају његов даљи развој. Успешно је завршена I фаза испитивања на 24 пацијента, показујући добру подношљивост широког опсега суб-токсичне дозе без неочекиване токсичности.



**Слика 1.3.** Структурне формуле комплекса рутенијума(III) а)  $[Him]trans-[RuCl_4(im)(dmsos)]$  или NAMI-A, б)  $[Hind]trans-[RuCl_4(ind)_2]$  или KP1019

### 1.3.1.1. Хемијске особине NAMI-A

Познато је да NAMI-A подлеже низу хидролитичких процеса у воденом раствору, чија природа и брзина зависе од рН вредности (Шема 1.2).<sup>45b</sup> У физиолошким условима (рН = 7,4, фосфатни пуфер), комплекс NAMI-A је релативно лабилан и подлеже ступњевитој хидролизи два хлоридо лиганда у току неколико минута. Први хидролитички корак је катализован помоћу рутенијум(II) врсте. Други хидролитички корак је праћен спором делимичном дисоцијацијом dmsos-a.



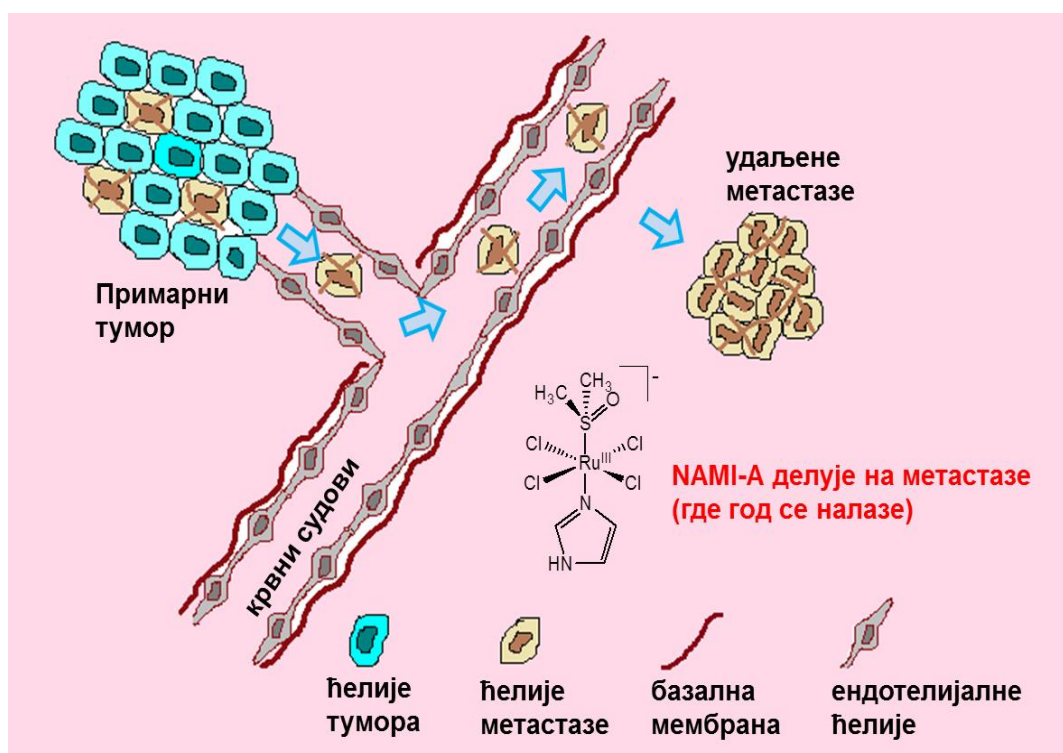
**Шема 1.2.** Хемијско понашање NAMI-A у воденом раствору при различитим условима<sup>17</sup>

Насупрот томе, NAMI-A је прилично инертан комплекс на собној температури и у слабо киселој средини, pH = 3-5 (услови уношења инфузијом). При овим условима хидролиза хлорида је сузбијена и одвија се једино спора дисоцијација dmsa-a.

Присуство биолошких редукционих агенаса *in vivo* у великој мери утиче на понашање комплекса NAMI-A. При физиолошкој pH вредности стехиометријске количине биолошких редуктаната (аскорбинска киселина, цистеин или глутатион) брзо и квантитативно редукују NAMI-A до одговарајућег дианјонског комплекса *trans*-[RuCl<sub>4</sub>(im)(dmsa)]<sup>2-</sup>, NAMI-AR, који затим подлеже брзој ступњевитој хидролизи два хлоридо лиганда (Шема 1.2).<sup>46,47</sup> Детаљни подаци доприносе утврђивању да ли је селективна антимагистатска активност NAMI-A проузрокована потпуно или делимично његовом редукцијом, као и да ли хемијске трансформације у воденом раствору могу утицати на његову фармаколошку активност или токсичност.

### 1.3.1.2. Механизам деловања

Механизам деловања NAMI-A је још увек недовољно познат. *In vitro* и *in vivo* испитивања показују да се снажно везује за протеине плазме, албумин и трансферин.<sup>48,49</sup> NAMI-A показује способност интеракције и са ДНК, али сматра се да то није примарна мета. Интеракција са актинима унутар ћелије<sup>36,37</sup> или са колагеном ванћелијског матрикса<sup>33</sup> који доводе до редуковане мобилности инвазивних ћелија канцера, предложена је као могући механизам антиметастатског дејства NAMI-A. Показује способност не само да превентира формирање метастаза већ и да инхибира њихов раст када су већ успостављене.<sup>50</sup> На Слици 1.4 приказан је механизам деловања комплекса NAMI-A.



**Слика 1.4.** Селективно дејство NAMI-A на метастазе тумора. Резултат је слаба редукација примарног тумора (где метастазе представљају субпопулацију) и изражено, скоро потпуно уклањање метастаза (где ћелије које метастазирају представљају скоро 100% укупних ћелија)<sup>19</sup>

Предложени механизам дејства укључује<sup>51</sup> :

- интеракцију са регулацијом ћелијског циклуса која резултује у пролазној акумулацији ћелија у G<sub>2</sub>/M фази;
- инхибицију матриксних металопротеиназа и активацију адхезионих молекула;
- повећање дебљине капсуле око примарног тумора и ванћелијског матрикса око крвних судова, чиме спречава туморске ћелије да продиру у околно ткиво и крвне судове и
- везивање за нуклеинске киселине, показујући директни ефекат на ДНК туморских ћелија.

### 1.3.2. KP1019

Истовремено са развојем комплекса NAMI-A од стране Alessio-a и сарадника са Универзитета у Трсту, Kerpler и његови сарадници са Универзитета у Бечу су синтетизовали рутенијум(III) комплекс [Hind]*trans*-[RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>] (ind = индазол), KP1019 (Слика 1.36). KP1019 показује велику активност према примарним цисплатина резистентним колоректалним туморима, али не показује значајну антиметастатску активност. Овај комплекс је ушао у I фазу клиничких испитивања 2004. године при чему су добијени обећавајући резултати: пет од шест доступних пацијената доживело је стабилизацију болести и лечење које је праћено једино умереном токсичношћу, што може бити узрок високог степена везивања за серум протеине и селективне активације у ткиву тумора.<sup>20,21</sup> Међутим, због релативно слабе растворљивости овај комплекс је замењен својим аналогом, односно натријумовом сољу KP1339, за даља клиничка испитивања. Комплекс је прилично стабилан у инфузионом раствору што је од важног значаја за складиштење и транспорт комплекса као и за клиничку употребу. Брзина реакције хидролизе зависи од температуре и рН вредности раствора. У води на собној температури мала количина комплекса (око 2%) хидролизује у току једног сата дајући одговарајући моноаква комплекс, док у раствору пуфера на рН 6,00 и 7,40 полувремена реакције су 5,4 и 0,5 сати (на 310 К).



### 1.3.2.1. Механизам деловања

Након интравенског уношења комплекса предложени механизам је следећи (Шема 1.3):

- хидролиза комплекса у крви праћена интеракцијом са серум протеинима као што су албумин и трансферин;
- транспорт комплекса у ћелију преко трансферинског циклуса;
- ослобађање комплекса проузроковано нижом рН вредношћу;
- редукција у хипоксичној ћелији тумора;
- везивање за нуклеинске киселине и
- индукција апоптозе преко митохондријалног пута.

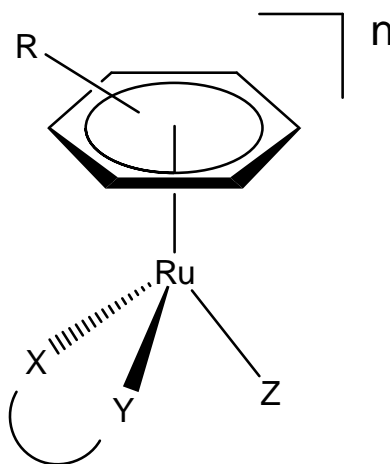


Шема 1.3. Предложени механизам деловања KP1019<sup>22</sup>

### 1.4. Органометални рутенијум(II) арена комплекси

Последњих година многобројна истраживања су фокусирана на органометална „half-sandwich“, рутенијум(II) арена једињења, која поседију антитуморску активност у *in vitro*, а у неким случајевима, и у *in vivo* условима. Органометални рутенијум(II) комплекси опште формуле  $[(\eta^6\text{-арен})Ru(XY)Z]$  (Слика 1.5), где је арен бензен или дериват бензена, XY неутрални или моноанјонски *N,N*-, *N,O*- или *O,O*-хелатни лиганд и Z халоген, интензивно су истраживана од стране Sadler-а и његових сарадника.<sup>27,52,53</sup> Ови комплекси

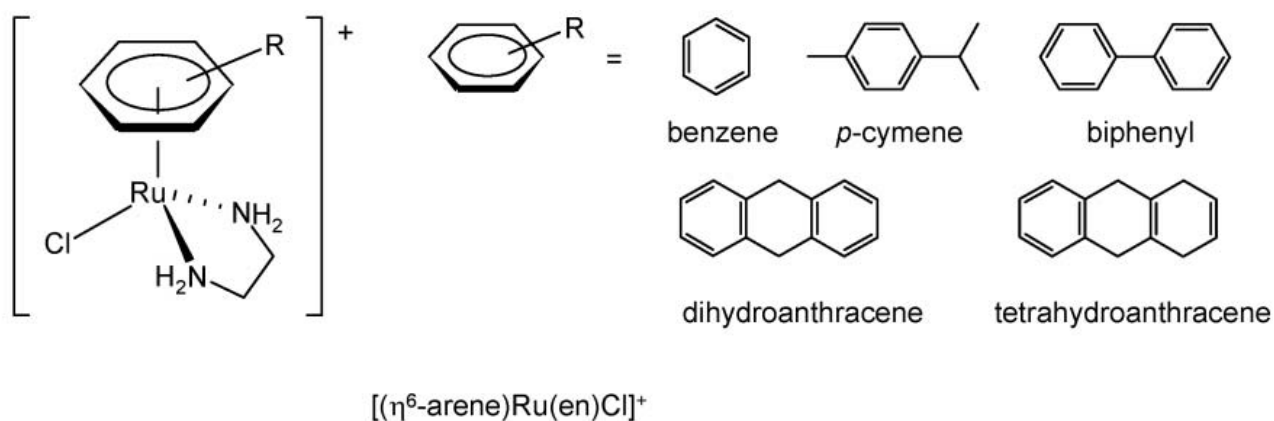
имају *pseudo*-октаедарку „piano-stool” структуру са неутралним арена лигандом који заузима три координациона места и чини „седиште столице за клавир”, а хелатни лиганд заједно са халогеном чини „ноге столице”.



Слика 1.5. Општа структура рутенијум(II) арена комплекса

Структура рутенијум(II) арена комплекса, дозвољавајући варијације три главне градивне компоненте (монодентатни лиганд Z, бидентатни лиганд XY и арена), омогућава фино подешавање фармаколошких особина ових комплекса.<sup>30</sup> Присуство координаног аренског лиганда пружа хидрофобне особине комплексу и стабилизује рутенијум у +2 оксидационом стању, тако да је оксидација до рутенијума(III) веома тешка. Природа арена лиганда може да потпомогне усвајање комплекса и интеракције са потенцијалним биолошким метама. Одлазећа група, која је обично хлорид и ослобађа место на металу за везивање биомолекула, може бити од важности за контролу кинетике активације комплекса. Супституција хлорида неким другим халогеном (бромидом или јодидом) има врло мали утицај на цитотоксичност комплекса. Хелатни лиганд може да одреди стабилност и кинетику супституције лиганда у комплексу. Комплекси који садрже бидентатни хелатни лиганд показују већу активност у односу на комплексе са монодентатним лигандом.<sup>54</sup>

Интензивна истраживања односа структуре и активности одговарајућих комплекса показала су да су најактивнији комплекси са хелатним лигандом  $XY = en$  и одлазећом групом  $Z = Cl$ . Заиста, комплекси  $[(\eta^6\text{-арен})Ru(en)Cl][PF_6]$  (Слика 1.6) показали су обећавајућу антиканцерогену активност, *in vitro* према канцерогеним ћелијским линијама, укључујући цисплатина резистентне канцерогене ћелије AR2780cis, и *in vivo* са значајним спречавањем раста A2780 и A2780cis ћелија.<sup>53,55</sup>



Слика 1.6. Рутенијум(II) арена комплекси са различитим арена лигандима

Цитотоксичност расте са повећањем величине координаног арена: бензен (ben) < p-цимен (cym) < бифенил (bip) < дихидроантрацен (ДНА) < тетраhydroантрацен (ТНА), тако да bip комплекс има сличну цитотоксичност као и карбоплатина ( $IC_{50} = 6 \mu M$ ), а ТНА комплекс показује активност као и цисплатина ( $IC_{50} = 0,6 \mu M$ ) (Табела 1.1). Структурне формуле неких од поменутих комплекса приказане су на Слици 1.6. Комплекси опште формуле  $[(\eta^6\text{-cym})Ru(X)(Y)(Z)]$  (X, Y или Z = халид, ацетонитрил или изоникотинамид), са три монодентатна лиганда, не показују активност према A2780 ћелијама канцера јајника *in vitro*.<sup>56</sup> Ови комплекси могу бити сувише реактивни са компонентама ћелијских култура и ћелија, и деактивирани од стране биомолекула пре него што стигну до жељене мете везивања.

Недавни тестови цитотоксичности на широк дијапазон рутенијум(II) арена комплекса показали су да је однос између структуре комплекса и њихове активности

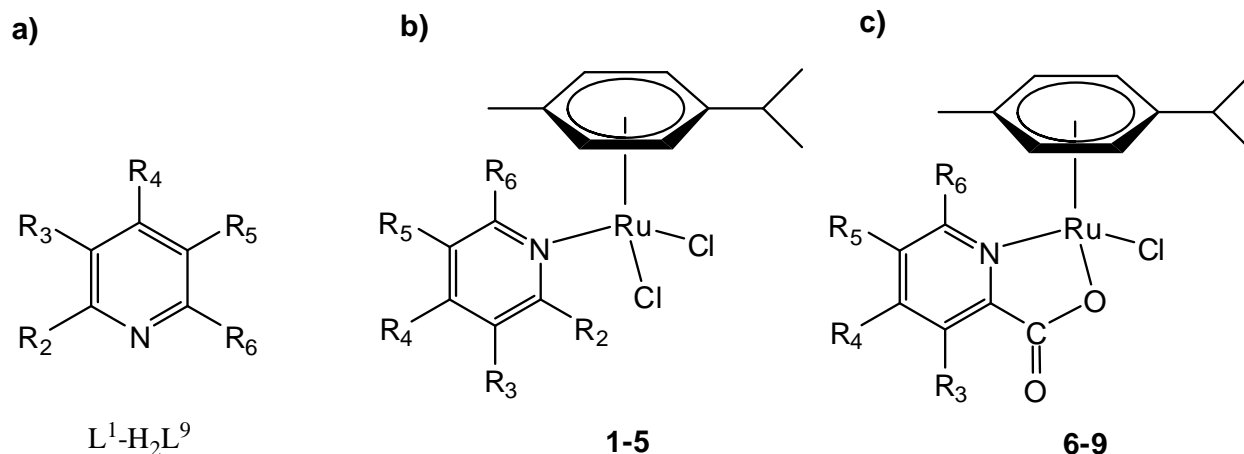
много комплекснији.<sup>57,58</sup> На пример, ако се еп замени са ацетилацетонатним лигандом (асаc), сум и бір комплекси показују већу цитотоксичност од ДНА комплекса. Замењујући еп са N,N,N',N'-тетраметилетилендиамином или 2,2'-бипиридином добијамо комплексе који не показују значајну цитотоксичност, док комплекс са 1,2-диаминбензеном као хелатним лигандом показује упоредиву или побољшану цитотоксичност у поређењу са еп аналогом.<sup>57,58</sup>

**Табела 1.1.** IC<sub>50</sub> вредности рутенијум(II) арена комплекса [(η<sup>6</sup>-арен)Ru(X)(Y)Cl]A [A = PF<sub>6</sub><sup>-</sup> за позитивно наелектрисане комплексе], карбоплатине и цисплатине у А2780 ћелијама канцера јајника након 24 сата излагања леку.<sup>54</sup>

Арен/Pt комплекс	X	Y	IC <sub>50</sub> (μM)
<i>p</i> -цимен	CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>3</sub> CN	> 100
<i>p</i> -цимен	Cl	Изоникотинамид	> 100
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>		56
бензен	H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>		17
<i>p</i> -цимен	H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>		10
<i>Карбоплатина</i>			6
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NEtH		6
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>		5
дихидроантрацен	H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>		2
<i>Цисплатина</i>			0,6
тетрахидроантрацен	H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>		0,5

Пре неколико година, синтетисана је серија нових рутенијум(II) арена комплекса опште формуле [(η<sup>6</sup>-*p*-сум)Ru(L)Cl<sub>2</sub>] где L = 3-ацетилпиридин, 4-ацетилпиридин, 2-амино-5-хлоропиридин, изоникотинска или никотинска киселина, и [(η<sup>6</sup>-*p*-сум)Ru(HL)Cl] где HL = 2,3-пиридин-, 2,4-пиридин-, 2,5-пиридин- и

2,6-пиридин-дикарбоксилат (Слика 1.7).<sup>59</sup> Новосинтетизовани комплекси показали су ниску цитотоксичност на неколико испитиваних туморских ћелијских линија. Уочено је да је замена различито супституисаних пиридинских лиганата са анјоном пиколинске киселине, при чему настаје комплекс  $[(\eta^6\text{-}p\text{-сум})\text{Ru}(\text{pico})\text{Cl}]$ , довела до повећане антипролиферативне активности овог комплекса.<sup>60,61</sup>



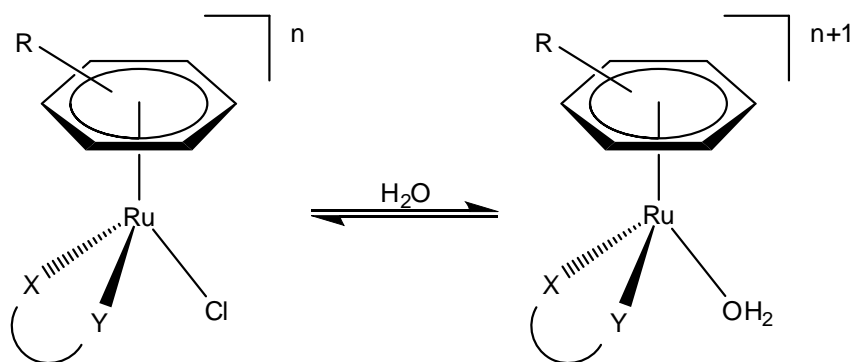
- $L^1$ , **1**:  $R_2, R_4, R_5, R_6 = H; R_3 = COCH_3$   
 $L^2$ , **2**:  $R_2, R_3, R_5, R_6 = H; R_4 = COCH_3$   
 $L^3$ , **3**:  $R_2 = NH_2; R_3, R_4, R_6 = H; R_5 = Cl$   
 $HL^4$ , **4**:  $R_2, R_3, R_5, R_6 = H; R_4 = COOH$   
 $HL^5$ , **5**:  $R_2, R_4, R_5, R_6 = H; R_3 = COOH$   
 $H_2L^6$ , **6**:  $R_2, R_3 = COOH; R_4, R_5, R_6 = H$   
 $H_2L^7$ , **7**:  $R_2, R_4 = COOH; R_3, R_5, R_6 = H$   
 $H_2L^8$ , **8**:  $R_2, R_5 = COOH; R_3, R_4, R_6 = H$   
 $H_2L^9$ , **9**:  $R_2, R_6 = COOH; R_3, R_4, R_5 = H$

Слика 1.7. Структурне формуле а) лиганата; б) комплекса са монодентатно везаним лигандом **1-5**; ц) комплекса са бидентатно везаним лигандом **6-9**<sup>59</sup>

#### 1.4.1. Хидролиза рутенијум(II) арена комплекса

Хидролиза је веома битан механизам активације антитуморских комплекса као што је цисплатина, стога испитивано је хемијско понашање рутенијум арена комплекса у воденој средини. У воденој средини, комплекси опште формуле  $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{L})\text{Cl}]^+$

подлежу хидролизи градећи одговарајуће аква комплексе  $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{L})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$  (Слика 1.8). Хлоридо комплекси подлежу реакцијама супституције доста спорије у односу на одговарајуће аква врсте,<sup>62</sup> па је веома битно познавање кинетике и термодинамике реакције хидролизе тј. формирање активног облика рутенијум(II) арена комплекса. Реакције хидролизе  $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  комплекса (где је арен *bir*, ДНА и ТНА) на 310К, у раствору  $\text{NaClO}_4$  концентрације 0,1 М ( $k_{\text{H}_2\text{O}} = 3,95 - 6,84 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), су за један ред величине брже у односу на реакције хидролизе цисплатине.<sup>63</sup>



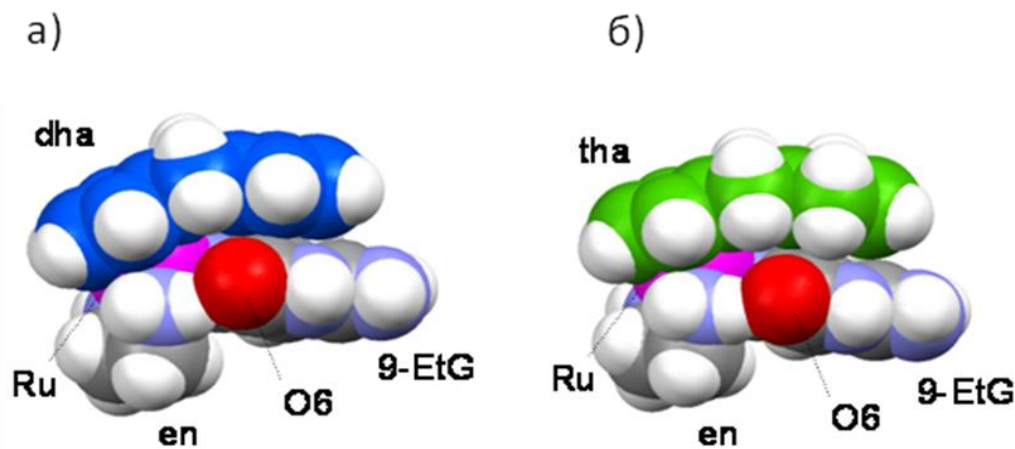
**Слика 1.8.** Хидролиза рутенијум(II) арена комплекса у воденом раствору и формирање аква адукта

Повратне, реакције анације у присуству 100 mM NaCl (слична концентрацији у крвној плазми) су веома брзе ( $k_{\text{Cl}} = 0,435 - 0,722 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Брзина реакције хидролизе и анације зависи од стерних и електронских ефеката арена лиганда. ДНА и ТНА комплекси подлежу реакцијама хидролизе и анације два пута брже у односу на *bir* комплекс. Рутенијум(II) арена комплекси при екстрацелуларној концентрацији хлорида ( $[\text{Cl}^-] = 104 \text{ mM}$ ) присутни су у облику мање активне хлоридо врсте, док се унутар ћелије где је концентрација хлорида знатно нижа ( $[\text{Cl}^-] = 4\text{-}25 \text{ mM}$ ) налазе се у облику активне аква врсте. рКа вредности аква комплекса  $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  крећу се између 7 и 8, тако да при физиолошкој рН,  $\text{Ru-OH}_2$  врсте преовладавају над мање активним  $\text{Ru-OH}$  врстама. На основу добијених резултата нађено је да константа брзине реакције хидролизе зависи у великој мери од природе бидентатног хелатног лиганда као и од рКа вредност аква адукта.

Уколико заменимо неутрални еп лиганд анијонским асас лигандом, долази до повећања константе брзине реакције хидролизе и вредности рКа аква комплекса са 8,25 на 9,41 (за  $\eta^6$ -арен = *p*-сум).<sup>57</sup>

#### 1.4.2. Интеракције рутенијум(II) арена комплекса са нуклеобазама

Изучавање интеракција рутенијум(II) арена комплекса са нуклеобазама је од изузетне важности с обзиром да је ДНК примарна мета антитуморских комплекса као што је цисплатина. Стога, испитиване су реакције комплекса  $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{X}]^{n+}$ , где је  $\eta^6$ -арен = *bir*, ТНА, ДНА, *p*-сум и Ph, X = Cl<sup>-</sup> или H<sub>2</sub>O, са дериватима нуклеинских киселина као моделима ДНК од стране Sadler-ове групе.<sup>62</sup> Испитивања су показала претежно формирање монофункционалног производа преко N7 азотовог атома гуанина. Реактивност различитих места координовања нуклеобаза према рутенијуму(II) при неутралној рН опада у следећем низу: гуанозин(N7) > тимидин(N3) > цитидин(N3) > аденозин(N7) > аденозин(N1). Производи интеракције са 9-етилгуанином (9EtG) су изоловани и окарактерисани помоћу рендгенске структурне анализе (Слика 1.9). Уочена је селективна Ru-N7(гуанин) координација која је додатно стабилизована стереоспецифичном водоничном везом између C6=O гуанина и NH групе еп, као и  $\pi$ - $\pi$  интеракцијама између ароматичног лиганда и нуклеобаза.<sup>52</sup>



Слика 1.9. Кристалне структуре а)  $[(\eta^6\text{-DHA})\text{Ru}(\text{en})(9\text{EtG})]^{2+}$  и б)  $[(\eta^6\text{-THA})\text{Ru}(\text{en})(9\text{EtG})]^{2+}$ , представљајући арена-пурин  $\pi$ - $\pi$  интеракцију и водоничну везу између NH еп и C6O гуанина(G)<sup>52</sup>

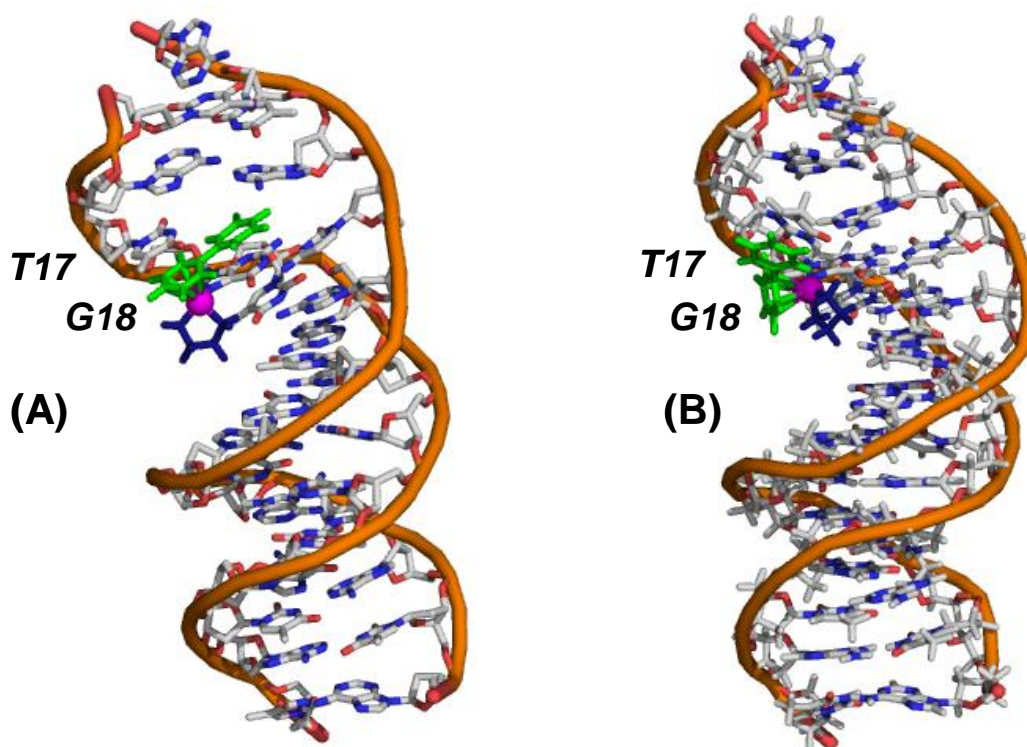
Слични резултати добијени су и при компетитивним реакцијама мононуклеотида (5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP и 5'-TMP) са  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})(\text{Cl})]^+$  комплексом, у којима је као коначни главни производ добијен  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})(\text{N7-GMP})]^{2+}$ . У овим реакцијама прво долази до хидролизе хлоридо комплекса и формирања одговарајућег активног аква адукта који се координује за нуклеотид преко кисеоника фосфатне групе, а затим долази до спорог премештања и формирања N7 адукта као главног производа.<sup>62</sup>

### 1.4.3. Интеракције рутенијум(II) арена комплекса са олигонуклеотидима и ДНК

Интеракција рутенијум(II) арена комплекса са ДНК је од посебне важности, јер ДНК може бити крајња мета за ову врсту потенцијалних антитуморских агенаса. Комплекс  $[(\eta^6\text{-}p\text{-sym})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  се везује селективно за гуанин (G) на олигонуклеотидима, формирајући монофункционалне производе Ru-G7 и Ru-G8, као и бифункционални производ G7(Ru)-G8(Ru).<sup>56</sup> Интеракција комплекса  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  са дуплексом d(ATACATGGTACATA)-d(TAT<sup>17</sup>G<sup>18</sup>TACCATGTAT) је проучавана помоћу HPLC-ESI-MS методе, као и помоћу 2D NOESY NMR спектроскопије. Такође, нађено је да се координација рутенијума одиграва преко N7 атома G, везујући се моно- и бифункционално за олигонуклеотид. На једном конформеру уочена је интеркалација арена лиганда (bip) између G18 и суседног тимина (T17), док на другом конформеру нема интеркалације, већ је арена лиганд наслоњен на благо савијен T17 (Слика 1.10).<sup>64</sup>

Интеракцијом рутенијум(II) арена комплекса са ДНК дуплексом долази до координације претежно за N7 азотов атом G остатка. Поред тога, присутне су и некоординативне интеракције као што су електростатичке интеракције, јака интрамолекуларска водонична веза између NH групе en и C6O гуанина и хидрофобне  $\pi$ - $\pi$  интеракције између ароматичног лиганда и база ДНК.<sup>65</sup>





**Слика 1.10.** Молекуларни модели два конформера 14-мер  $d(ATACATGGTACATA)-d(TAT^{17}G^{18}TACCATGTAT)$  за које је везан монофункционални фрагмент  $\{(\eta^6\text{-bip})Ru(en)\}^{2+}$  преко N7 атома гуанина (G18) а) показујући интеркалацију арена између G18 и T17 и б) нема интеркалације, већ је арена лиганд наслоњен на благо савијен T17. (Рутенијум је представљен љубичастом бојом, en тамно плавом и арена лиганд зеленом)<sup>63</sup>

#### 1.4.4. Реакције са аминокиселинама и протеинима

Реакције рутенијум(II) арена комплекса са аминокиселинама које садрже сумпор, као што су L-цистеин (L-Cys) и L-метионин (L-Met), су од великог интереса у погледу јаког утицаја на интрацелуларну хемију антитуморских комплекса платине, посебно њихово ангажовање у детоксификацији и механизму резистенције.<sup>66</sup> Протеини могу такође имати важну улогу у механизму деловања рутенијум(II) арена комплекса, укључујући могућност да рутенијум може заменити гвожђе у протеинима.

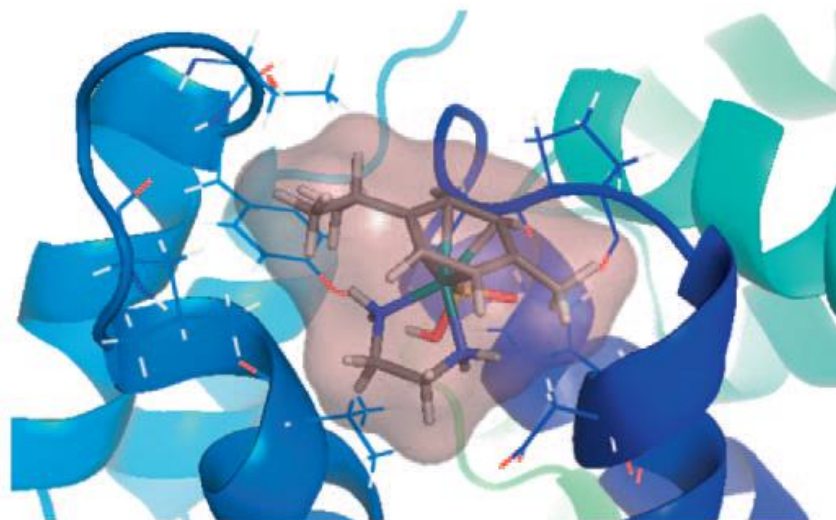
Sadler је са својим сарадницима испитивао интеракцију рутенијум(II) арена комплекса са аминокиселинама, L-Cys и L-Met.<sup>67</sup> На основу експерименталних резултата, нађено је да  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$  комплекс реагује споро са тиолном аминокиселином L-Cys (1:2) у воденом раствору на 310 K, дајући на почетку реакције три мононуклеарна производа, при чему је цистеин координован за рутенијум преко сумпора или кисеоника. Након 24 сата уочена су и два динуклеарна производа која настају као резултат губитка координованог етилендиаминa и садрже један или два мостна цистеинска лиганда. При високим концентрацијама L-Cys долази и до грађења неуобичајеног кластера  $\{(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}\}_8$ . Интеракција са тиоетарским сумпором L-Met је такође слаба и само 28%  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$  комплекса реагује дајући само један производ  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})(\text{L-Met-S})]^{2+}$ . Слаба реактивност испитиваног арена комплекса са одговарајућим аминокиселинама које садрже атом сумпора у бочном низу, и висока реактивност према гуанину, указује да се адукти са ДНК могу формирати чак и у присуству аминокиселина, пептида и протеина. У супротности са тим, сматра се да се рутенијум(III) комплекси везују јаче за протеине као што су албумин и трансферин него за ДНК, при чему протеин може послужити за доставу комплекса до канцерогених ћелија.<sup>68,69</sup> Ово указује да се механизам деловања рутенијум(II) арена антиканцерогених комплекса разликује од механизма рутенијум(III) комплекса.

Недавно су испитиване конкурентне реакције рутенијум(II) арена комплекса са трипептидом глутатионом (GSH) и цикличним гуанозин-3',5'-монофосфатом (cGMP) помоћу HPLC и LC-MS методе, <sup>1</sup>H и <sup>15</sup>N NMR спектроскопије.<sup>70</sup> При физиолошким условима (pH = 7, 22 mM NaCl, 310 K), у реакцији са GSH настаје тиолато производ  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})(\text{GS-S})]$  који је сасвим неочекивано оксидован помоћу кисеоника до сулфенато комплекса  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})(\text{GS(O)-S})]$ . При овим условима, конкурентна реакција испитиваног арена комплекса са GSH и cGMP доводи до формирања  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})(\text{cGMP-N7})]^+$  као главног производа, чак и у присуству великог вишка GSH. Ове редокс реакције цистеинил производа рутенијум(II) арена антиканцерогених комплекса могу имати важну улогу у њиховој биолошкој активности.

Постоји неколико публикованих радова у којима је испитивана интеракција рутенијум(II) арена комплекса са разним молекулама протеина.<sup>71,72</sup> Ове интеракције су

веома важне за утврђивање механизма деловања органометалних антиканцерогених комплекса.

Интеракције два арена комплекса,  $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  и  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ , са хуманим серум албумином, испитиване су помоћу масене спектрометрије (MS).<sup>73</sup> Добијени резултати показују да се оба комплекса координују за хистидин (His128, His247, His510) и за метионин (Met298) на површини албумина. Поред тога,  $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  комплекс може ући у шупљину протеина, везати се за Cys34 и изазвати оксидацију тиолата до сулфината (Слика 1.11). С обзиром да се Cys34 налази унутар шупљине,  $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  комплекс се не може координовати за Cys34, због фенил прстена који представља стерну сметњу. Закључено је да арена лиганд има кључну улогу у интеракцијама са протеинима. Стога такве оксидационе реакције тиола изазване координацијом рутенијума могу бити веома значајне у фармаколошкој активности ових рутенијум(II) комплекса.

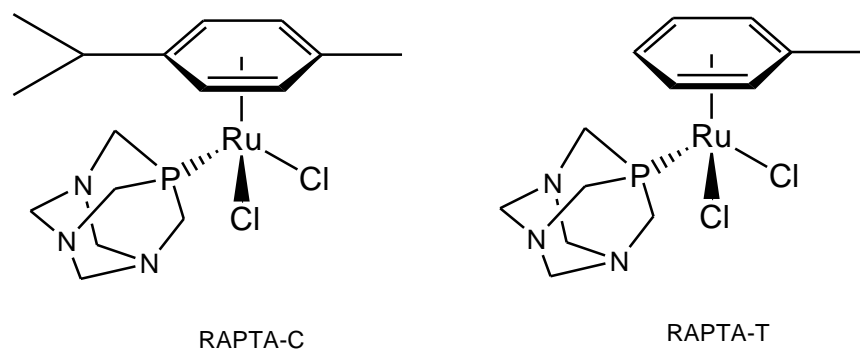


**Слика 1.11.** Структура  $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  комплекса са хуманим албумином. Рутенијум је координован за Cys34 који се налази у шупљини протеина.

### 1.5. RAPTA комплекси

Рутенијум(II) арена комплекси опште формуле  $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{X})_2(\text{pta})]$  (pta = 1,3,5-триаза-7-фосфатрицикло[3.3.1.1]-декан, X = Cl или дикарбоксилати, Слика 1.12), названи RAPTA комплекси, синтетисани су од стране Dyson-ове групе.<sup>74</sup> Ове комплексе карактерише присуство pta лиганда на месту етилендиамина у комплексима синтетисаним од стране Sadler-ове групе.

Органометални комплекси,  $[(\eta^6\text{-cum})\text{RuCl}_2(\text{pta})]$  (RAPTA-C) и  $[(\eta^6\text{-толуен})\text{RuCl}_2(\text{pta})]$  (RAPTA-T), су предмет детаљних *in vitro* и *in vivo* испитавања.<sup>31,75</sup> *In vitro* испитавања показују да је RAPTA-T практично лишен цитотоксичности, али интерагује са компонентама ванћелијског матрикса, чиме инхибирају неке од фаза метастатског процеса, као што су одвајање ћелија од примарног тумора, миграција и адхезија на новом месту.<sup>31</sup> Интересанто је да су ефекти израженији према ћелијама канцера са већим инвазивним потенцијалом, него према мање инвазивним ћелијама. *In vivo*, на моделу карцинома дојке, оба комплекса инхибирају формирање метастазе плућа, без значајнијег деловања на примарни тумор. RAPTA-T комплекс показује *in vitro* и *in vivo* понашање веома слично NAMI-A, што је изненађујуће с обзиром на структурне разлике.



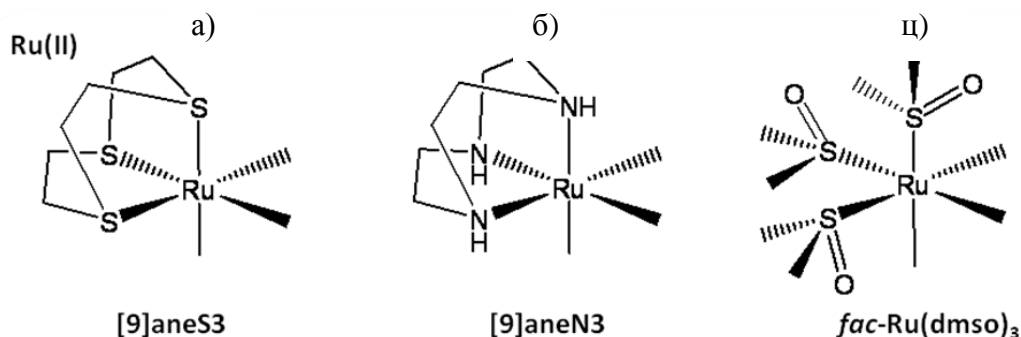
Слика 1.12. Структурне формуле RAPTA комплекса

### 1.6. „Half sandwich” рутенијум(II) комплекси

Пре неколико година Alessio је започео истраживање у циљу утврђивања да ли је  $\eta^6$ -арена лиганд код органометалних „half sandwich” комплекса неопходан за антитуморску активност или може бити успешно замењен неким другим неутралним

6-електрон донорским „face-capping” лигандом, или са три монодентатна лиганда која формирају стабилан *fac*-Ru(L)<sub>3</sub> фрагмент, док остали лиганди остају непромењени (Слика 1.13). Стога, Alessio је заједно са својим сарадницима развио нову серију рутенијум(II) „half sandwich” комплекса опште формуле [Ru(fcl)(chel)X][Y]<sub>n</sub>, у којима је арена лиганд замењен неутралним „face-capping” макроцикличним лигандом (fcl) као што су 1,4,7-тритаациклононан ([9]aneS3), 1,4,7-триазаациклононан ([9]aneN3), chel је неутрални или анјонски хелатни лиганд (*N-N*, као што су en, dach, bpy или супституисан bpy, супституисани триазоли; *O-O*, оксалат, малонат, асас; *N-O*, пиколинат (pic)), X је Cl или dmsо-S, а Y је CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, PF<sub>6</sub> или Cl (n зависи од наелектрисања хелата и X).<sup>76-80</sup>

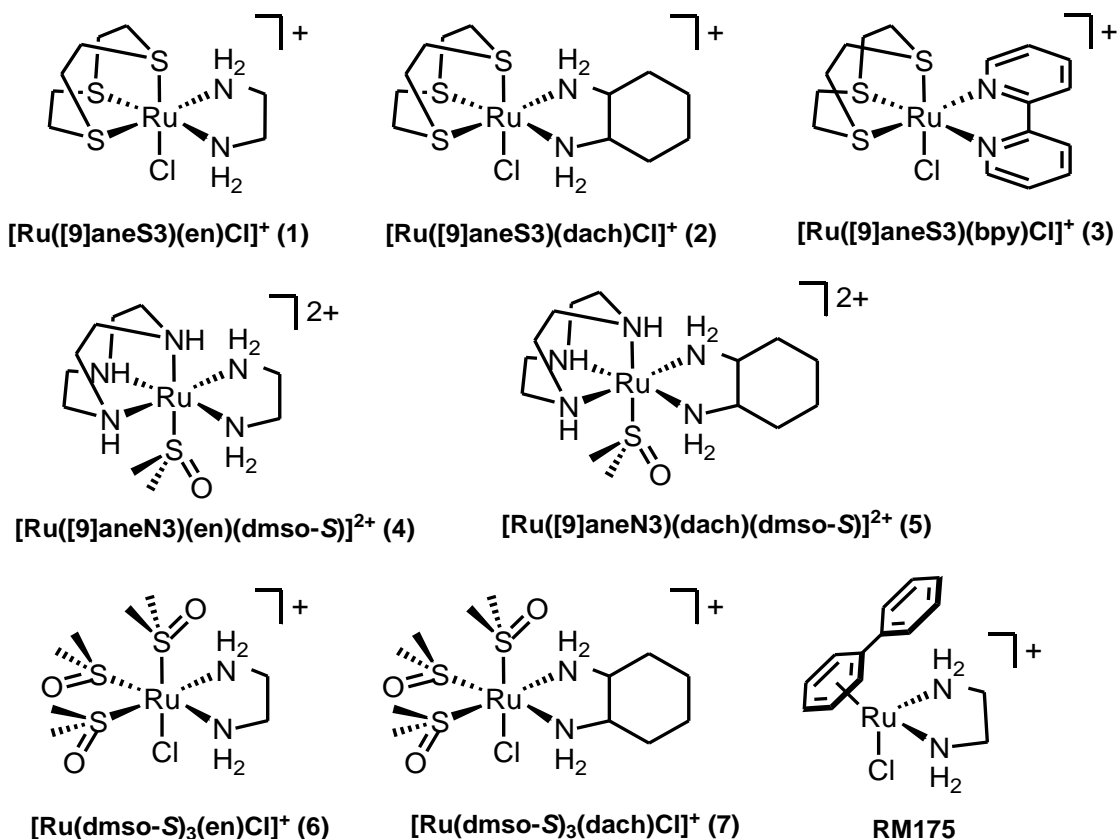
Недавно је синтетизована и нова серија рутенијум(II) „half sandwich” комплекса опште формуле *fac*-[Ru(dmsо-S)<sub>3</sub>(*N-N*)Cl][PF<sub>6</sub>] (*N-N* је en, dach или 2 NH<sub>3</sub>), који уместо арена и макроцикличног лиганда садрже три S-координована dmsо лиганда у фаџијалном положају.<sup>81</sup>



**Слика 1.13.** Структурне формуле рутенијум(II) „half sandwich” комплекса који се разликују у природи „face-capping” лиганда: а) 1,4,7-тритаациклононан ([9]aneS3), б) 1,4,7-триазаациклононан ([9]aneN3) и ц) три dmsо-S лиганда у фаџијалном положају (dmsо-S)<sub>3</sub>

Антипролиферативна активност ових комплекса испитивана је према хуманој ћелијској линији карцинома дојке MDA-MB-231. Добијени резултати су показали да једино [Ru([9]aneS3)(en)Cl][PF<sub>6</sub>] и [Ru([9]aneS3)(dach)Cl][PF<sub>6</sub>] (Слика 1.14) комплекси показују *in vitro* цитотокичност. Добијене IC<sub>50</sub> вредности су 80 μM (en) и 124 μM (dach),<sup>79</sup>

које су за један ред величине више у односу на најактивнији органометални комплекс  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-bip})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  ( $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$ , Табела 1.2).<sup>77</sup> Оба ова  $\text{Ru-[9]aneS3}$  комплекса подлежу реакцији хидролизе у току неколико минута и поседују могућност грађења водоничне везе преко хелатног лиганда. Ове две особине су веома важне за антипролиферативну активност. Комплекс као што је  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ , иако хидролизује сличном брзином као и  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  комплекс, због губитка могућности да гради водоничну везу показује веома ниску антипролиферативну активност. Са друге стране, комплекси као што су  $[\text{Ru}(\text{[9]aneN3})(\text{chel})(\text{dmsO-S})][\text{PF}_6]_2$ <sup>79</sup> и *fac*- $[\text{Ru}(\text{dmsO-S})_3(\text{chel})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ <sup>81</sup> (где је *chel* = *en* или *dach*) (Слика 1.14), који су инертни према супституцији, су такође неактивни.



Слика 1.14. Структурне формуле рутенијум(II) „half sandwich” комплекса који су тестирани на антипролиферативну активност

Табела 1.2. IC<sub>50</sub> вредности одговарајућих комплекса према MDA-MB-231 ћелијској линији

	IC <sub>50</sub> [μM]	
	MDA-MB-231	KB
1	81 ± 20	118 ± 120
2	124 ± 12	
3	> 300	109 ± 113
4	> 300	
5	> 300	
6	349 ± 226	
7	> 300	
<b>RM175</b>	8.99 ± 12.1	2.60

### 1.7. Рутенијум(II) полипиридил комплекси

Последњих неколико деценија, рутенијум полипиридил комплекси су били мета многобројних истраживања као могућа алтернатива за коришћење у класичној хемотерапији.<sup>66,82</sup> За неке од њих је пронађено да поседују обећавајућу антитуморску активност. Директна веза између цитотоксичности и координовања рутенијум полипиридил комплекса за ДНК је покренута од стране Brabec-а и његових сарадника.<sup>82</sup> Цитотоксичност три хлорополипиридил рутенијум(II) комплекса, [Ru(tpy)(bpy)Cl][Cl], *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] и *mer*-[Ru(tpy)Cl<sub>3</sub>] (tpy = 2,2',6',2''-терпиридин), испитивана је према разним ћелијским линијама тумора.<sup>33,82</sup> Комплекс *mer*-[Ru(tpy)Cl<sub>3</sub>] (Слика 1.15) је показао знатно већу цитотоксичност у односу на друга два комплекса. Висока активност овог комплекса предпоставља се да потиче од његове способности да везује ДНК преко два деривата гуанина у *trans* положају, на супротним ланцима, за разлику од мање активног комплекса, *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].<sup>83</sup> Reedijk и његови сарадници су показали да *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] формира моноадукт са 9-етилгуанином (9EtG), као и да кристална структура *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl(9EtG)][Cl] комплекса открива координацију 9EtG преко N7 азотовог атома.<sup>84</sup> Са друге стране, Alberto и његови сарадници су пронашли, при истим

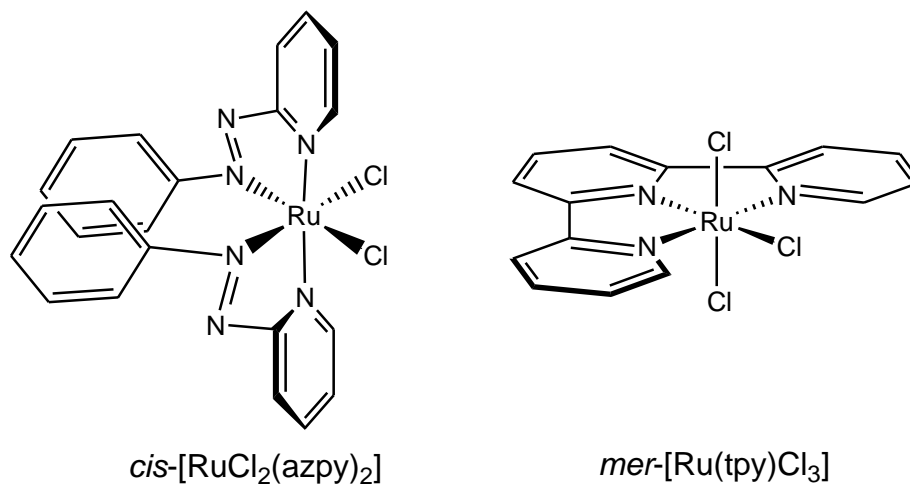
условима, квантитативну координацију два деривата гуанина (9MeG) у *cis* положају преко N7 атома.<sup>85</sup>

Током претходних година, синтетизован је велики број монофункционалних рутенијум(II) терпиридин комплекса опште формуле  $mer-[Ru(tpy)(N-N)Cl]^+$  ( $N-N$  = бидентатни азот-донорски хелатни лиганд).<sup>24,86-89</sup> Проучавана је њихова способност везивања за ДНК, при чему је пронађено да се већина ових комплекса ковалентно везује за N7 атом гуанина, формирајући монофункционалне производе, а неки од њих стопирају репликацију ДНК.<sup>82,86</sup>

Три изомерна рутенијум(II) полипиридил комплекса,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ - $[RuCl_2(azpy)_2]$  ( $azpy$  = 2-фенилазопиридин) су тестирана на серије ћелијских линија канцера: MCF-7, EVSA-T, WIDR, IGROV, M19, A498, H266 и A2780).<sup>90-92</sup> Комплекс  $\alpha$ - $[RuCl_2(azpy)_2]$  (Слика 1.15) је показао највећу активност са  $IC_{50}$  вредношћу 0,86 и 0,98  $\mu$ M према A2780 и A2780 *cisR*, што је у истом опсегу као и цитотоксичност рутенијум(II) арена комплекса према истим ћелијским линијама.<sup>56</sup> Испитивана је интеракција ових комплекса са 9-етилгуанином и гуанозином, при чему долази до формирања монофункционалних производа.

*Tris*(лиганд) комплекси  $[RuL_3][PF_6]_2$  ( $L$  = 2-фенилазопиридин или *o*-толилазопиридин) као и комплекси опште формуле  $[RuL_2'L][PF_6]_2$  ( $L$  = 2-фенилазопиридин или *bpy*) су синтетизовани, структурно окарактерисани и испитивани на цитотоксичну активност.<sup>93</sup> Ови комплекси су дизајнирани како би се испитала хипотеза да  $\alpha$ - $[RuCl_2(azpy)_2]$  комплекс поседује високу цитотоксичност због два *cis* хлоридо лиганда, која могу бити замењена при интеракцији са ДНК, као у случају цисплатине. Комплекси  $mer-[Ru(azpy)_3][PF_6]_2$  и  $mer-[Ru(tazpy)_3][PF_6]_2$  су показали цитотоксичну активност за серију ћелијских линија канцера (MCF-7, EVSA-T, WIDR, IGROV, M19, A498, H266). Тако да, чак и у одсуству хлоридо лиганда, примећена је цитотоксична активност. То би значило да 2-фенилазопиридин рутенијум(II) комплекси делују потпуно другачијим механизмом у односу на цисплатину.



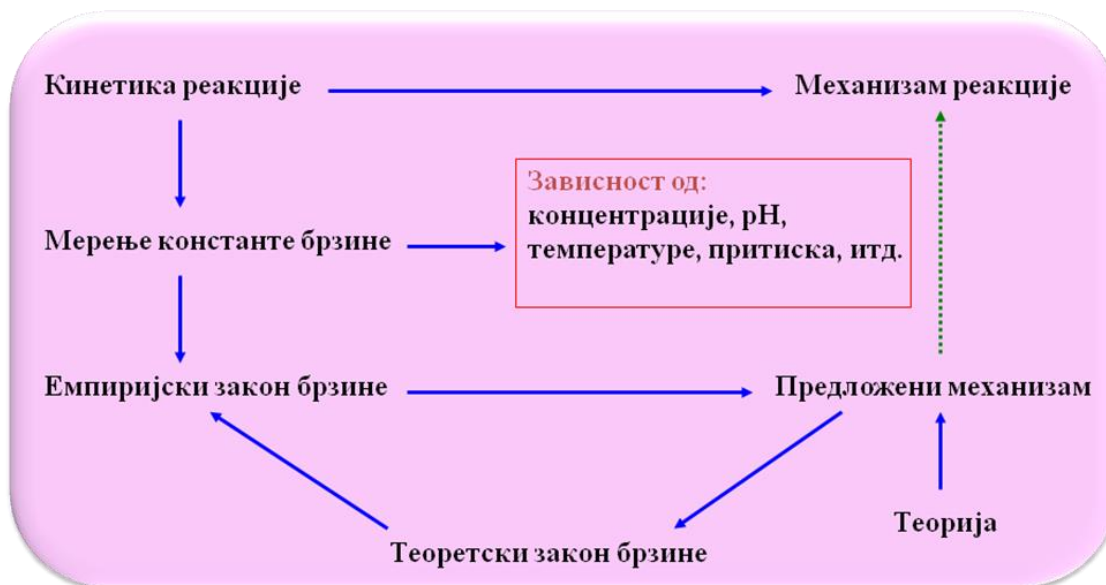


**Слика 1.15.** Структурне формуле неких рутенијум(II) полипиридил комплекса који показују цитотоксичну активност, где је азпу 2-фенилазопиридин и тпу 2,2',6',2''-терпиридин

### 1.8. Супституционе реакције комплексних једињења

Изучавање механизма реакције има за циљ утврђивање елементарних реакционих корака који воде ка настанку производа реакције, затим утврђивање брзине којом од реактаната настаје производ реакције и на крају утврђивање утицаја реакционих услова (промена концентрације реактаната, промена температуре и притиска, увођење катализатора, рН, јонска јачина раствора, итд.) на брзину реакције. Одређивање механизма реакције такође подразумева анализу начина на који се хемијска веза раскида и начина на који се нова веза формира. Пошто сваки елементарни корак реакције има свој механизам, комплетно објашњење реакционог механизма је тешко достижан циљ.

У Шеми 1.4 су приказани сви чиниоци које треба узети у обзир приликом одређивања механизма хемијске реакције.<sup>94</sup>



**Шема 1.4.** Кораци у одређивању механизма хемијске реакције

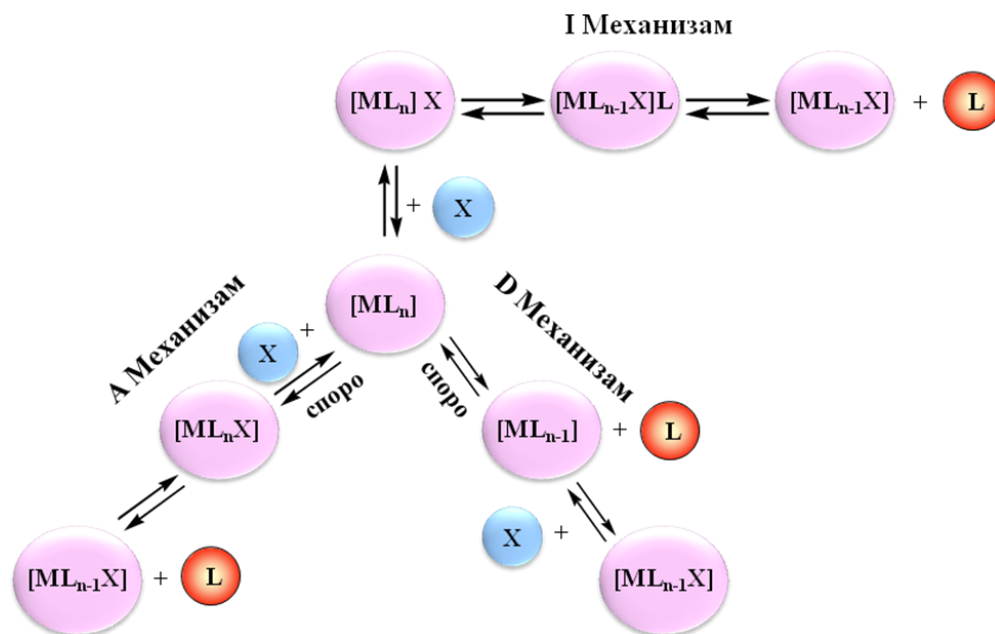
Проучавање механизма неорганских реакција нагло започиње са развојем нових експерименталних техника (UV-Vis спектрофотометрије, NMR спектроскопије, stopped-flow спектрофотометрије, HPLC методе, итд.).

Супституционе реакције комплексних једињења могу бити електрофилне ( $S_E$ ) и нуклеофилне ( $S_N$ ), у зависности од тога да ли у процесу супституције долази до замене централног јона метала или лиганата. Уколико се у току реакције супституише јон метала тј. електрофил, у питању је реакција електрофилне супституције, једначина (1.8.1), а уколико се врши замена лиганата, комплекс подлеже реакцији нуклеофилне супституције, једначина (1.8.2).



Нуклеофилне супституционе реакције, према Langford-у и Gray-у,<sup>95</sup> одвијају се по три различита механизма (Шема 1.5):

- Дисоцијативном механизму (D),
- Асоцијативном механизму (A) и
- Механизму измене (I)



**Шема 1.5.** Механизми нуклеофилне супституције комплексних једињења

Код дисоцијативног механизма (D) у првом ступњу реакције долази до дисоцијације једног лиганда L из координационе сфере комплекса, при чему настаје интермедијер са смањеним координационим бројем. У следећем ступњу улазни лиганд X се везује за централни јон метала. Први ступањ реакције је спорији и он одређује укупну брзину реакције супституције.

Код асоцијативног механизма (A) у првој фази улазни лиганд X се везује за централни јон метала, градећи интермедијер са повећаним координационим бројем, а затим, у другој фази одлазећи лиганд L напушта координациону сферу комплекса. Реакција грађења интермедијера са повећаним координационим бројем је спорија и она одређује укупну брзину процеса супституције.

Механизам измене (I) је процес код кога се, у првој фази, улазни лиганд X везује електростатичким силама за спољашњу координациону сферу комплекса. Потом долази до миграције улазног лиганда из спољашње у унутрашњу координациону сферу уз истовремену миграцију одлазећег лиганда L из унутрашње у спољашњу координациону сферу. Крајни процес је раскидање везе између комплекса и одлазећег лиганда. Овај механизам, за разлику од претходна два, нема интермедијера, али постоји прелазно стање, тј. процес поседује своју енергију активирања. Механизам измене се може поделити на  $I_a$  и  $I_d$  механизме. Уколико процес раскидања везе између централног јона метала и одлазећег лиганда L има већи утицај на брзину реакције, механизам се обележава са  $I_d$ , а уколико процес формирања нове везе између централног јона метала и улазног лиганда X има већи утицај на брзину хемијске реакције, механизам се обележава са  $I_a$ .<sup>95,96</sup>

### 1.9. Активациони параметри

Одређивање механизма хемијске реакције заснива се на анализи добијених вредности термодинамичких параметара ( $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$ ,  $\Delta V^\ddagger$ ) који карактеришу одређени процес. Један од битних података је вредност константе брзине хемијске реакције  $k$ , за чије одређивање постоји велики број експерименталних метода. Избор одговарајуће методе зависи како од брзине процеса који се проучава, тако и од особина учесника хемијске реакције.<sup>97</sup> Један од критеријума за одређивање механизма је познавање вредности промене ентропије активирања,  $\Delta S^\ddagger$ . Пошто је ентропија активирања мерило неуређености система, а на основу сазнања да се код различитих механизма формира интермедијер са већом или мањом неуређеношћу, овај параметар омогућава дефинисање механизма супституције. У случају D механизма пошто настаје интермедијер са смањеним координационим бројем, односно, повећава се неуређеност система,  $\Delta S^\ddagger$  има позитивну вредност. Код асоцијативног механизма настаје интермедијер са повећаним координационим бројем, односно, смањује се неуређеност система, па  $\Delta S^\ddagger$  има негативну вредност. У случају I механизма  $\Delta S^\ddagger$  је приближно једнака нули.

Да би се одредила вредност за  $\Delta S^\ddagger$  неопходно је познавање вредности константе брзине хемијске реакције на различитим температурама. Прво се одређује вредност енергије активирања,  $E_a$ , помоћу Arrhenius-ове једначине (1.9.1).<sup>97-101</sup>

$$k = k_0 \exp(-E_a/RT) \quad (1.9.1)$$

у којој је  $k$  константа брзине хемијске реакције,  $k_0$  фактор учестаности,  $R$  гасна константа и  $T$  температура на којој је одређена вредност константе брзине. Логаритмовањем једначине (1.9.1) добија се израз

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT \quad (1.9.2)$$

у коме постоји линеарна зависност  $\ln k$  у функцији  $1/T$ . Ова зависност је линеарна у ужем температурном интервалу од 30 – 40 °C. То значи да познавањем вредности константе брзине хемијске реакције за најмање три температуре, графичким путем се може одредити вредност члана  $-E_a/R$ , односно, вредност енергије активирања.<sup>97,100</sup>

Промена енталпије активирања,  $\Delta H^\ddagger$ , одређује се из једначине (1.9.3).

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad (1.9.3)$$

Промена ентропије активирања,  $\Delta S^\ddagger$ , представља промену слободне Gibbs-ове енергије,  $\Delta G^\ddagger$ , са променом температуре  $T$ , што се може изразити помоћу једначине (1.9.4)

$$\left( \frac{d(\Delta G^\ddagger)}{dT} \right) = -\Delta S^\ddagger \quad (1.9.4)$$

Вредност за  $\Delta S^\ddagger$  одређује се на основу Eyring-ове једначине (1.9.5)

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp\left( -\frac{\Delta G^\ddagger}{RT} \right) \quad (1.9.5)$$

С обзиром да се  $\Delta G^\ddagger$  може изразити преко  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$ , једначина (1.9.6)

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (1.9.6)$$

заменом у изразу (1.9.5) добија се једначина (1.9.7)

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \quad (1.9.7)$$

Логаритмовањем једначине (1.9.7) добија се израз

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{R}{Nh}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (1.9.8)$$

На основу израза (1.9.8) види се да постоји линеарна зависност члана  $\ln(k/T)$  у функцији  $1/T$ , тј. графички, на основу ове једначине, из нагиба добијене праве одређује се вредност за  $\Delta H^\ddagger$ , а из одсечка праве израчунава се вредност за  $\Delta S^\ddagger$ . Први члан у једначини,  $\ln(R/Nh)$ , је константа и на 25 °C износи 23,8.<sup>102,103</sup>

Најпоузданији критеријум за одређивање механизма је вредност промене запремине активирања,  $\Delta V^\ddagger$ .<sup>98,99</sup> Узимајући у обзир врсту интермедијера код различитих механизма, повећање притиска ће убрзавати реакције које се дешавају по А механизму, а успоравати реакције по D механизму. Зато, негативна вредност за  $\Delta V^\ddagger$  указује на А или I<sub>a</sub> механизам, а позитивна вредност  $\Delta V^\ddagger$  указује на D или I<sub>d</sub> механизам супституције. У случају I механизма, притисак не утиче значајније на брзину супституције.

Повезаност константе брзине хемијске реакције и  $\Delta V^\ddagger$  дата је Van't Hoff-овом једначином (1.9.9)

$$\left(\frac{d(\ln k)}{dP}\right)_T = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (1.9.9)$$

Вредност за  $\Delta V^\ddagger$  добија се праћењем промене константе брзине хемијске реакције у зависности од притиска, на основу једначине (1.9.10)

$$\Delta V^\ddagger = -bRT \quad (1.9.10)$$

у којој  $b$  представља нагиб праве  $\ln k$  у функцији притиска,  $P$ . Запремина активирања,  $\Delta V^\ddagger$ , састоји се из два члана, једначина (1.9.11).

$$\Delta V^\ddagger = \Delta V^\ddagger_{\text{int}} + \Delta V^\ddagger_{\text{sol}} \quad (1.9.11)$$

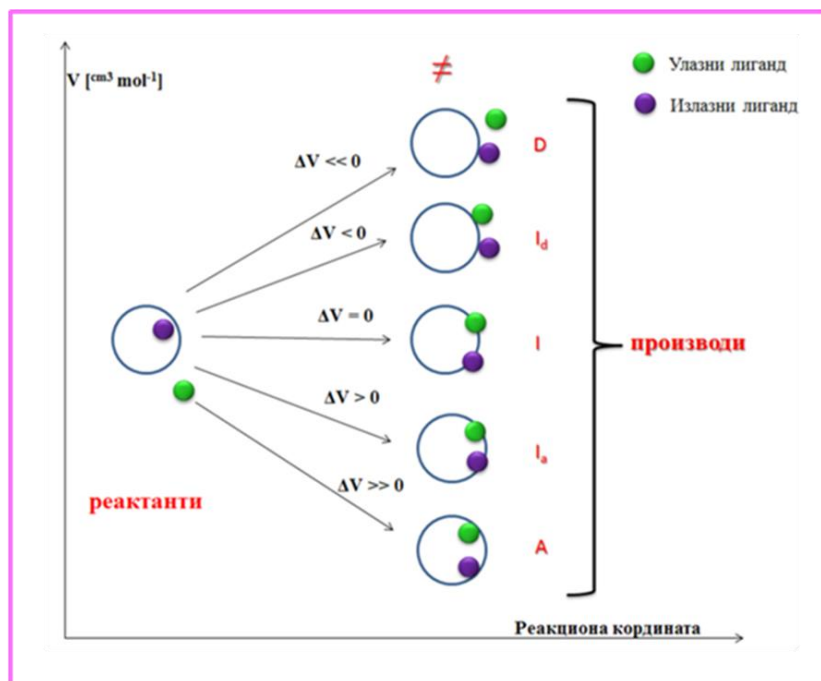
Први члан  $\Delta V^\ddagger_{\text{int}}$  односи се на промене у интернуклеарним растојањима и угловима веза приликом настајања активираниог комплекса, док други члан  $\Delta V^\ddagger_{\text{sol}}$  описује промене у наелектрисању, као и диполне интеракције у активираниом комплексу. Уколико реагују наелектрисани јони допринос другог члана може бити већи од првог, па вредност за  $\Delta V^\ddagger$  није поуздан критеријум за одређивање механизма. Међутим, када у току процеса супституције нема промена у наелектрисању, други члан у изразу (1.9.11) се може занемарити, тј. тада запремина активирања зависи само од  $\Delta V^\ddagger_{\text{int}}$ . У том случају је вредност за  $\Delta V^\ddagger$  најпоузданији критеријум за одређивање механизма супституције.<sup>98,99</sup>

### 1.10. Одређивање механизма нуклеофилних супституционих реакција

Одређивање механизма нуклеофилне супституционе реакције врши се на основу вредности термодинамичких параметара,<sup>98-103</sup> који карактеришу проучавани процес. Један од параметара помоћу кога се на врло једноставан начин може прелиминарно одредити механизам супституције је константа брзине хемијске реакције. На основу једначина које карактеришу процесе дисоцијативног, асоцијативног и механизма измене (Шема 1.5) види се да је процес супституције по дисоцијативном механизму реакција првог реда, а по асоцијативном механизму реакција другог реда. С тим у вези, уколико се приликом изучавања неке реакције установи да природа улазног лиганда не утиче на брзину реакције, тада се ради о дисоцијативном или  $I_d$  механизму супституције. И обрнуто,

уколико брзина хемијске реакције зависи од природе улазног лиганда, реакција се дешава по асоцијативном или  $I_a$  механизму супституције.<sup>95,96</sup>

Поузданији критеријум за одређивање механизма је познавање вредности промене ентропије активирања  $\Delta S^\ddagger$ . Као што је већ објашњено (одељак 1.9), ентропија активирања је мерило неуређености система, а на основу сазнања да се код различитих механизма формира интермедијер са већом или мањом неуређеношћу, овај параметар омогућава одређивање механизма супституције. Такође, поуздан критеријум за одређивање механизма је вредност промене запремине активирања.<sup>98,99</sup> Узимајући у обзир врсту интермедијера код различитих механизма, повећање притиска ће убрзавати реакције које се дешавају по А механизму, а успоравати реакције по D механизму. Зато, негативна вредност  $\Delta V^\ddagger$  указује на А или  $I_a$  механизам, а позитивна вредност  $\Delta V^\ddagger$  указује на D или  $I_d$  механизам супституције. У случају механизма измене, притисак не утиче значајније на брзину супституције.



**Шема 1.6.** Шематски приказ различитих типова механизма супституционих реакција за један замисљен "раван" комплекс.



### 1.11. Реакције супституције октаедарских комплекса

Комплексна једињења са координационим бројем 6 најчешће поседују октаедарску геометрију. Ова комплексних једињења имају  $O_h$  групу симетрије. Велики број елемената различитих електронских конфигурација има могућност да гради октаедарске комплексе.

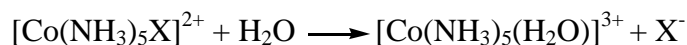
Тако, јони Na и Mg, који спадају у групу s-елемената, граде октаедарске комплексе, као и неки p-елементи попут сумпора и силицијума ( $SF_6$  и  $[SiF_6]^{2-}$ ).<sup>95,96,100</sup> Међутим, најбројнији су октаедарски комплекси прелазних d-елемената.

Процес супституције лиганда код октаедарских комплекса разликује се од процеса супституције код квадратно-планарних комплекса. Са једне стране,  $p_z$  орбитала јона метала, која је код квадратно-планарних комплекса доступна да прими електронски пар улазног лиганда у процесу супституције по А механизму, код октаедарских комплекса је попуњена. Са друге стране, волуминозност октаедарских комплекса је већа у односу на квадратно-планарне, па је и прилаз улазног лиганда отежан.<sup>96</sup>

Реакције супституције октаедарских комплекса могу се, такође, одвијати по D, A или I механизму, као што је описано у делу 1.7. Унутрашње-орбитални октаедарски комплекси ( $d^2sp^3$  хибридизација) чији јон метала има електронску конфигурацију  $d^0$ ,  $d^1$ ,  $d^2$  као и  $d^4$  електронску конфигурацију високог спина су координационо незасићени, тј. имају празне унутрашње d-орбитале. Дакле, ови јони метала поседују могућност да приме електронски пар улазног лиганда, који би, по А механизму, наградио интермедијер са координационим бројем 7. Међутим, за спољашње-орбиталне октаедарске комплексе ( $sp^3d^2$  хибридизација) се очекује D механизам супституције. Највећи број супституционих реакција октаедарских комплекса дешава се по D или  $I_d$  механизму, док на брзину супституције велики утицај имају природа одлазећег лиганда и природа инертног лиганда. У случају ових комплекса, стерне сметње су мање значајне.

### 1.11.1. Утицај одлазећег лиганда

Утицај одлазећег лиганда на брзину супституције октаедарских комплекса може се објаснити на примеру киселе хидролизе комплекса типа  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{X}]^{2+}$ :

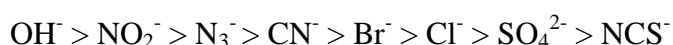


Брзина којом одлазећи лиганд X напушта координациону сферу зависи од јачине хемијске везе између јона метала и посматраног лиганда. Уколико су у питању лиганди истог наелектрисања, брзина реакције супституције расте са порастом величине лиганда. Међутим, ако посматрамо лиганде различитог наелектрисања, брзина реакције супституције опада са порастом наелектрисања одлазећег лиганда.

### 1.11.2. Утицај инертног лиганда

На брзину реакције супституције октаедарских комплекса значајно утиче и природа лиганда који се налазе у *cis* или *trans* положају у односу на одлазећи лиганд. На примеру комплекса  $[\text{Co}(\text{en})_2\text{XCl}]^+$ , где је са X означен инертан ањонски лиганд, може се објаснити овај ефекат. Наиме, лиганд X може да утиче на лабилност одлазећег  $\text{Cl}^-$  лиганда, по следећем редоследу:

Уколико се X налази у *trans* положају у односу на  $\text{Cl}^-$  лабилност опада у низу:



Уколико се X налази у *cis* положају у односу на  $\text{Cl}^-$  лабилност опада у низу:



Комплекси са *cis* геометријском структуром већином реагују брже него одговарајући *trans* комплекси, осим у случају када је  $\text{X} = \text{NO}_2^-$  или  $\text{N}_3^-$ . У принципу, разлике у реактивности поменути два геометријска изомера су врло мале.<sup>104</sup>

### 1.11.3. Стерне сметње

Уколико постоје стерне сметње око централног јона метала реакције супституције октаедарских комплекса се одвијају по D механизму, док се А механизам подразумева за стерно незаштићене комплексе. На пример, реакција хидролизе за *mezo* облик комплекса  $[\text{Co}(\text{bn})_2\text{Cl}_2]^+$ , (bn је бутилендиамин), је око 30 пута бржа у односу на смешу *d* и *l* облика, зато што је *mezo* облик више стерно заштићен.<sup>104</sup>

## ЗАДАТАК РАДА

Предмет ове докторске дисертације је синтеза и карактеризација рутенијум(II) полипиридил комплекса, као и испитивање интеракција новосинтетизованих рутенијум(II)-*tpy* комплекса, рутенијум(II) тритиа и рутенијум(II) арена комплекса са дериватима гуанина, аминокиселинама и хетероцикличним једињењима. Наведена испитивања могу се поделити на следећи начин:

- ❖ Синтеза и карактеризација рутенијум(II) терпиридин комплекса опште формуле  $mer-[Ru(L_3)(N-N)X][Y]_n$  (где је  $L_3 = Cl-tpy$  или  $tpy$ ;  $N-N = en, dach$  или  $bpy$ ;  $X = Cl$  или  $dmsO-S$ ;  $Y = Cl, PF_6$  или  $CF_3SO_3$ ;  $n = 1$  или  $2$ , зависи од природе  $X$ ), испитивање стабилности (реакције хидролизе) новосинтетизованих комплекса у растворима, као и одређивање механизма супституционих реакција рутенијум(II) терпиридин комплекса са биолошки значајним лигандима. Добијени резултати су потврђени и помоћу ДФТ израчунавања.
- ❖ Дефинисање механизма супституционих реакција рутенијум(II) тритиа комплекса,  $[Ru([9]aneS3)(en)Cl][PF_6]$ ,  $[Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF_6]$  и  $[Ru([9]aneS3)(pic)Cl]$ , са дериватима гуанина применом UV-Vis спектрофотометрије и NMR спектроскопије. Изоловање реакционих производа и одређивање њихове структуре помоћу рендгенске структурне анализе. Изучавање реакција хидролизе и анације испитиваних тритиа комплекса.
- ❖ Испитивање кинетике и механизма супституционих реакција рутенијум(II) арена комплекса,  $[Ru^{II}(\eta^6-p-cym)(pydc)Cl]$ , са азот-донорским нуклеофилима, као што су 5'-GMP, Guo и L-His, помоћу UV-Vis спектрофотометрије и NMR спектроскопије на  $pH = 2,5$  и  $pH = 7,2$ .
- ❖ Испитивање цитотоксичности рутенијум(II) комплекса,  $[Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl]$ ,  $[Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl]$  и  $[Ru(Cl-tpy)(pic)Cl]$ , према ћелијској линији тумора дебелог црева миша (CT26).

## 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

### 2.1. Хемикалије и реагенси

Комплекси  $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{RuCl}_2]_2$ ,  $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{Ru}(\text{pydc})\text{Cl}]$ ,  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  и  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{pic})\text{Cl}]$  су синтетисани по раније публикованим поступцима.<sup>59,79,105</sup> Чистоћа добијених једињења потврђена је елементалном анализом, UV-Vis спектрофотометријом, IR и  $^1\text{H}$  NMR спектроскопијом.

$\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Acros Organics),  $\text{D}_2\text{O}$  (Deutero GmbH 99 %), NaOH (Merck), NaCl (Zorka Šabac), LiCl (Merck), триетиламин (Merck), DMSO (Sigma Aldrich), Нерес пуфер (N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфидна киселина) (Sigma Aldrich), су коришћени без предходног пречишћавања.

1,2-диаминоетан, en, (Merck), ( $\pm$ )-trans-1,2-диаминоциклохексан, dach (Acros Organics), 2,2'-бипиридин, bpy, (Sigma Aldrich), 4'-хлоро-2,2':6',2''-терпиридин, Cl-tpy, (Sigma Aldrich), 2,2':6',2''-терпиридин, tpy, (Sigma Aldrich), 9-метилгуанин, 9MeG, (Sigma Aldrich), гуанозин, Guo, (Sigma Aldrich), динатријумова со гуанозин-5'-монофосфата, 5'-GMP- $\text{Na}_2$ , (Sigma Aldrich), аденозин-5'-монофосфат монохидрат, 5'-AMP- $\text{H}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , (Sigma Aldrich), L-хистидин, L-His, (Acros Organics), 2,3-пиридиндикарбоксилна киселина, pydc, (Acros Organics), тиоуреа, Tu, (Acros Organics), L-цистеин, L-Cys, (Sigma Aldrich), L-метионин, L-Met, (Sigma Aldrich), 1,2,4-триазол, Tz, (Fluka), пиразол, Pz, (Acros Organics) и пиридин, Py, (Sigma Aldrich), коришћени су, такође, без претходног пречишћавања.

### 2.2. Синтеза комплекса

Као прекурсор за синтезу рутенијум(II) терпиридин комплекса коришћени су *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dmsO})_4]$ ,<sup>106</sup>  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$  (**P2**),<sup>107</sup> и  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_2(\text{dmsO-S})]$  (**P4**),<sup>108</sup> синтетисани по раније публикованим поступцима, док су  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})\text{Cl}_3]$  (**P1**)<sup>109</sup> и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})\text{Cl}_2(\text{dmsO-S})]$  (**P3**)<sup>110</sup> прекурсор синтетисани по модификованим поступцима који су раније описани у литератури. У покушају да се изолују погодни кристали за рендгенску структурну анализу, већина катјонских комплекса је синтетизована са различитим контра јонима  $[\text{Cl}^-$ ,  $\text{PF}_6^-$  или  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$  (OTf)].

**[Ru(Cl-tpy)Cl<sub>3</sub>] (P1).** 303,3 mg RuCl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O (1,160 mmol) је растворено у 100,0 ml етанола и раствор је рефлуктован све док се боја не промени из браон у зелену (око 2 сата). Затим је додато 282,2 mg Cl-tpy (1,054 mmol) и настављено рефлуктовање још 4 сата. Током рефлуктовања боја раствора је поново промењена у браон-црвенкасту са истовременим формирањем браон талога. Након хлађења раствора на собној температури, талог је сакупљен филтрирањем, испран етанолом и етром и осушен под вакумом. Принос: 452,4 mg (90%). Израчунато за C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>3</sub>Ru (475,14): C, 37,9; H, 2,12; N, 8,84. Нађено: C, 37,9; H, 2,15; N, 8,87. Комплекс **P1** је растворан у DMSO-у и ацетонитрилу, слабо растворан у води, метанолу и етанолу, док је нерастворан у ацетону, хлороформу и дихлорметану. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>tpy</sub> 3048 (m), 2924 (w), 1590 (s), 1470 (w), 1419 (m), 1145 (s), 794 (s), 579 (w); ν<sub>Ru-Cl</sub> 316 (m). UV/Vis спектар (DMSO; λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 273 (21460), 313 (18092), 320 (17781), 408 (5749), 487 (3186).

**[Ru(Cl-tpy)Cl<sub>2</sub>(dmsO-S)] (P3).** Комплекс *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dmsO)<sub>4</sub>] (400,0 mg, 0,826 mmol) растворен је у 20 ml хлороформа који је претходно дегасификован, затим је додат Cl-tpy (243 mg, 0,908 mmol) и реакциона смеша је рефлуктована 7 сати. Током рефлуктовања раствор постаје љубичаст и долази до постепеног таложења браон талога. После упаравања на вакум упаривачу до запремине од 5 mL и складиштења на -20 °C, настали талог браон боје је сакупљен филтрирањем, испран етром и осушен под вакумом. Принос: 290,2 mg (68%). Израчунато за C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>ORuS (517,82): C, 39,4; H, 3,11; N, 8,11. Нађено: C, 39,4; H, 3,18; N, 8,07. Насупрот синтези објављеној у литератури у којој је изолован само *trans* изомер **P3** прекурсора, при одговарајућим експерименталним условима производ је изолован као смеша два изомера, *cis* и *trans*, у скоро једнаким количинама, као што се види помоћу NMR спектроскопије. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): *trans*-изомер: 9,37 (d, 2H, J = 5,3 Hz, C6H/C6''H), 8,94 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,68 (d, 2H, J = 7,2 Hz, C3H/C3''H), 8,02 (t, 2H, J = 7,7, C4H/C4''H), 7,57 (t, 2H, J = 6,1 Hz, C5H/C5''H), 3,59 (s, 6H, CH<sub>3</sub> dmsO-S); *cis*-изомер: 9,03 (d, 2H, J = 4,9 Hz, C6H/C6''H), 8,81 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,66 (d, 2H, J = 7,2 Hz, C3H/C3''H), 8,18 (t, 2H, J = 7,8, C4H/C4''H), 7,83 (t, 2H, J = 6,5 Hz, C5H/C5''H), 2,59 (s, 6H, CH<sub>3</sub> dmsO-S). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>tpy</sub> 3013 (m), 2919 (w), 1594 (s), 1467 (w), 1421 (s), 1118 (s), 794 (s), 579 (w); ν<sub>S=O</sub> 1096 (s), 1079 (s); ν<sub>Ru-S</sub> 427 (s); ν<sub>Ru-Cl</sub> 318 (m). UV/Vis спектар (CH<sub>3</sub>CN; λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 238 (27187), 271 (15175), 312 (16346), 326 (12756), 386 (2042), 515 (3639), 670 (726).

**Општи поступак за синтезу  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}][\text{Cl}]$  ( $1_{\text{Cl}}$  -  $3_{\text{Cl}}$ ) и  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{N-N})\text{Cl}][\text{Cl}]$  ( $4_{\text{Cl}}$  -  $5_{\text{Cl}}$ ) комплекса:**

Измерена количина  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})\text{Cl}_3]$  (**P1**) је додата у смешу етанол/вода (3:1) која садржи 10 eq. LiCl и 3 eq. триетиламина ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) као редукционо средство. Затим је додат хелатни лиганд *N-N* (1,2 eq.; *N-N* = en, dach, bpy) и смеша је рефлугована око 3 сата уз снажно мешање. Врућ љубичаст раствор је процеђен да би се уклонио нерастворан материјал. Упаравање на ротационом упаривачу под сниженим притиском до око  $\frac{1}{4}$  полазне запремине и складиштење на  $4,0\text{ }^\circ\text{C}$  током 24 сата проузроковало је формирање тамног талоба. Талог је сакупљен филтрирањем, испран хладном водом, хладним ацетоном и етром, и осушен под вакуумом. Одговарајући тпу комплекси **4** и **5** су синтетисани по сличном поступку користећи  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$  (**P2**) као полазни комплекс.

**$[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  ( $1_{\text{Cl}}$ ).** 100,0 mg (0,210 mmol) **P1** прекурсора, 16,8  $\mu\text{L}$  (0,252 mmol) en, 89,0 mg (2,100 mmol) LiCl и 87,9  $\mu\text{L}$  (0,630 mmol)  $\text{Et}_3\text{N}$  је додато у 20 ml смеше етанол/ $\text{H}_2\text{O}$  (3:1), при чему долази до формирања тамно љубичастог талоба комплекса **1**. Принос: 70,6 mg (67%). Израчунато за  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{N}_5\text{Ru}$  (499,79): C, 40,9; H, 3,63; N, 14,01. Нађено: C, 40,8; H, 3,71; N, 13,92. Комплекс **1** је растворан у води, метанолу и етанолу, слабо растворан у ацетону и нитрометану, док је нерастворан у хлороформу и дихлорметану.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 8,92 (d, 2H,  $J = 5,5$  Hz,  $\text{C}_6\text{H}/\text{C}_6''\text{H}$ ), 8,42 (s, 2H,  $\text{C}_3'\text{H}/\text{C}_5'\text{H}$ ), 8,35 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz,  $\text{C}_3\text{H}/\text{C}_3''\text{H}$ ), 7,99 (t, 2H,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{C}_4\text{H}/\text{C}_4''\text{H}$ ), 7,71 (ddd, 2H,  $J = 7,4, 5,6, 1,3$  Hz,  $\text{C}_5\text{H}/\text{C}_5''\text{H}$ ), 5,71 (t br, 2H,  $J = 5,1$  Hz,  $\text{NH}_2$  en), 3,25 (m br, 2H,  $\text{CH}_2$  en), 2,69 (s br, 2H,  $\text{NH}_2$  en), 2,36 (m br, 2H,  $\text{CH}_2$  en).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ): 8,95 (d, 2H,  $J = 5,5$  Hz,  $\text{C}_6\text{H}/\text{C}_6''\text{H}$ ), 8,42 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz,  $\text{C}_3\text{H}/\text{C}_3''\text{H}$ ), 8,38 (s, 2H,  $\text{C}_3'\text{H}/\text{C}_5'\text{H}$ ), 8,06 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{C}_4\text{H}/\text{C}_4''\text{H}$ ), 7,73 (t, 2H,  $J = 6,3$  Hz,  $\text{C}_5\text{H}/\text{C}_5''\text{H}$ ), 5,34 (s br, 2H,  $\text{NH}_2$  en), 3,48 (m br, 2H,  $\text{CH}_2$  en), 2,62 (m br, 2H,  $\text{CH}_2$  en), 2,02 (преклопљен са сигналом  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_2$  en).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ): 162,4 ( $\text{C}_2'/\text{C}_6'$ ), 160,8 ( $\text{C}_2/\text{C}_2''$ ), 153,6 ( $\text{C}_6\text{H}/\text{C}_6''\text{H}$ ), 137,6 ( $\text{C}_4\text{H}/\text{C}_4''\text{H}$ ), 136,7 ( $\text{C}_4'$ ), 128,7 ( $\text{C}_5\text{H}/\text{C}_5''\text{H}$ ), 124,4 ( $\text{C}_3\text{H}/\text{C}_3''\text{H}$ ), 122,5 ( $\text{C}_3'\text{H}/\text{C}_5'\text{H}$ ), 46,92 ( $\text{CH}_2$  en), 46,91 ( $\text{CH}_2$  en). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{NH}}$  3256 (m);  $\nu_{\text{tpy}}$  3036 (m), 1599 (s), 1474 (m), 1423 (s), 1119 (s), 787 (s), 566 (w);  $\nu_{\text{Ru-Cl}}$  320 (m). UV/Vis спектар ( $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ): 239 (24310), 277 (20993), 317 (29034), 370 (4375), 503 (4390), 562 (3830).

**[Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] (2<sub>Cl</sub>)**. 100,0 mg (0,210 mmol) **P1** прекурсора, 30,3  $\mu$ L (0,252 mmol) dach, 89,0 mg (2,100 mmol) LiCl и 87,9  $\mu$ L (0,630 mmol) Et<sub>3</sub>N је додато у 20 ml смеше етанол/H<sub>2</sub>O (3:1), проузрокујући формирање тамно љубичастог талога комплекса **2**. Принос: 80,2 mg (69%). Израчунато за C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>Ru (553,88): C, 45,5; H, 4,37; N, 12,64. Нађено: C, 45,4; H, 4,29; N, 12,72. Комплекс **2** је растворан у води, метанолу и етанолу, делимично растворан у нитрометану, док је нерастворан у ацетону, хлороформу и дихлорметану. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 8,98 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, C6H), 8,89 (d, 1H, *J* = 5,2 Hz, C6''H), 8,45 (s, 1H, C3'H), 8,44 (s, 1H, C5'H), 8,37 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz, C3H/C3''H), 8,01 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, C4H/C4''H), 7,71 (t, 2H, *J* = 6,1 Hz, C5H/C5''H), 6,05 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, NH dach), 5,19 (m, 1H, NH dach), 2,76 – 2,61 (m, 2H, NH + CH dach), 2,61 – 2,51 (m, 1H, CH dach), 2,37 (m, 1H, NH dach), 2,09 – 1,97 (m, 1H, CH dach), 1,83 – 1,69 (m, 2H, CH dach), 1,55 (d, 2H, *J* = 10,1 Hz, CH dach), 1,24 (m, 1H, CH dach), 1,11 (m, 1H, CH dach), 0,89 (m, 1H, CH dach). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>): 8,98 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, C6H), 8,93 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, C6''H), 8,42 (t, 2H, *J* = 8,9 Hz, C3H/C3''H), 8,37 (dd, 2H, *J* = 10,7, 1,7 Hz, C3'H/C5'H), 8,05 (t, 2H, *J* = 7,8 Hz, C4H/C4''H), 7,72 (m br, 2H, C5H/C5''H), 5,68 (d br, 1H, NH dach), 4,85 (t, 1H, *J* = 12,2 Hz, NH dach), 2,94 (m, 1H, CH dach), 2,69 (d br, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 2,31 (m, 1H, CH dach), 2,11 (преклопљен са сигналом H<sub>2</sub>O, NH dach), 1,92 – 1,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub> dach), 1,74 (br m, 1H, NH dach), 1,68 (d br, 1H, *J* = 13,1 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1,59 (d br, 1H, *J* = 12,7 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1,34 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1,21 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1,01 (ddd, 2H, *J* = 24,9, 12,5, 3,5 Hz, CH<sub>2</sub> dach). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>): 162,44 (C2'), 162,37 (C6'), 160,8 (C2), 160,7 (C2''), 153,7 (6''H), 153,6 (C6H), 137,6 (C4H), 137,5 (C4''H), 137,0 (C4'), 128,9 (C5''H), 128,6 (C5H), 124,4 (C3H), 124,3 (C3''H), 122,54 (C3'H), 122,48 (C5'H), 61,9 (CH dach), 61,7 (CH dach), 36,4 (CH<sub>2</sub> dach), 35,1 (CH<sub>2</sub> dach), 25,7 (CH<sub>2</sub> dach), 25,3 (CH<sub>2</sub> dach). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{\text{NH}}$  3285 (m);  $\nu_{\text{tpy}}$  2930 (m), 1602 (s), 1472 (m), 1423 (m), 1109 (s), 785 (s), 563 (w);  $\nu_{\text{Ru-Cl}}$  310 (w). UV/Vis спектар (H<sub>2</sub>O;  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 239 (24530), 278 (21080), 317 (29220), 369 (4430), 502 (4690), 561 (4010).

**[Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl][Cl] (3<sub>Cl</sub>)**. 50,0 mg (0,105 mmol) **P1** прекурсора, 19,7 mg (0,126 mmol) bpy, 44,5 mg (1,050 mmol) LiCl и 43,9  $\mu$ l (0,315 mmol) Et<sub>3</sub>N је додато у 10 ml смеше етанол/H<sub>2</sub>O (3:1), проузрокујући тамно црвени кристални талог комплекса **3**. Принос: 48,8 mg (78%). Израчунато за C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>Ru (595,87): C, 50,4; H, 3,04; N, 11,75. Нађено: C, 50,4; H, 3,13; N, 11,71. Погодни кристали за рендгенску структурну анализу



добити су из воденог раствора **3**<sub>Cl</sub> додатком вишка NaCl. Комплекс **3** је растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону, хлороформу, дихлорметану и нитрометану. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 9,95 (d, 1H, *J* = 5,5 Hz, CaH), 8,67 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,66 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, CdH), 8,41 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, C3H/C3''H), 8,36 – 8,29 (m, 2H, CgH/CcH), 7,99 (t, 1H, *J* = 6,4 Hz, CbH), 7,93 (t, 2H, *J* = 7,8 Hz, C4H/C4''H), 7,79 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, C6H/C6''H), 7,70 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz, ChH), 7,38 – 7,29 (m, 3H, CjH/C5H/C5''H), 6,95 (t, 1H, *J* = 6,7 Hz, CiH). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O): 158,9 (C2'/C6'), 158,6 (Cf), 157,6 (C2/C2''), 156,1 (Ce), 152,5 (C6H/C6''H), 151,8 (CjH), 151,8 (CaH), 141,8 (C4'), 137,5 (C4H/C4''H), 137,0 (CcH), 135,9 (ChH), 127,7 (C5H/C5''H), 126,9 (CbH), 125,8 (CiH), 124,1 (C3H/C3''H), 123,4 (CdH), 123,1 (CgH), 123,0 (C3'H/C5'H). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>tpy</sub> 3043 (m), 1600 (m), 1463 (m), 1421 (s), 1117 (s), 788 (s), 568 (m); ν<sub>Ru-Cl</sub> 351 (w). UV/Vis спектар (H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 239 (19670), 281 (19500), 290 (19240), 313 (18090), 488 (5810).

**[Ru(tpy)(en)Cl][Cl] (4<sub>Cl</sub>)**. 100,0 mg (0,227 mmol) **P2** прекурсора, 18,2 μL (0,272 mmol) en, 96,0 mg (2,264 mmol) LiCl и 94,7 μL (0,679 mmol) Et<sub>3</sub>N је додато у 22 ml смеше етанол/H<sub>2</sub>O (3:1), при чему долази до формирања тамно љубичастог талоба комплекса **4**. Принос: 46,4 mg (44%). Израчунато за C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>Ru (465,34): C, 43,9; H, 4,12; N, 15,05. Нађено: C, 44,0; H, 4,18; N, 15,00. Комплекс **4** је растворан у води, метанолу и етанолу, слабо растворан у ацетону и нитрометану, док је нерастворан у хлороформу и дихлорметану. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 8,92 (d, 2H, *J* = 5,5 Hz, C6H/C6''H), 8,40 (d, 2H, *J* = 7,9 Hz, C3H/C3''H), 8,36 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, C3'H/C5'H), 8,00 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, C4H/C4''H), 7,82 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, C4'H), 7,68 (m, 2H, C5H/C5''H), 5,62 (t br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 3,24 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2,62 (t br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 2,34 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>): 8,96 (d, 2H, *J* = 5,8 Hz, C6H/C6''H), 8,41 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz, C3H/C3''H), 8,36 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, C3'H/C5'H), 8,02 (td, 2H, *J* = 7,8, 1,5 Hz, C4H/C4''H), 7,81 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, C4'H), 7,69 (m, 2H, C5H/C5''H), 5,33 (s br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 3,46 (m, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2,61 (m, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2,03 (s br, 2H, NH<sub>2</sub> en). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>): 161,8 (C2'/C6'), 161,6 (C2/C2''), 153,5 (C6H/C6''H), 137,4 (C4H/C4''H), 130,7 (C4'H), 128,2 (C5H/C5''H), 123,8 (C3H/C3''H), 122,4 (C3'H/C5'H), 46,9 (CH<sub>2</sub> en), 46,8 (CH<sub>2</sub> en). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3233 (m), 3152 (m); ν<sub>tpy</sub> 3055 (m), 2937 (m), 1616 (m), 1447 (s), 1116 (s), 767 (s), 619 (m); ν<sub>Ru-Cl</sub> 309 (w). UV/Vis спектар (λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 232 (20830), 274 (20151), 317 (28290), 368 (3800), 481 (4433), 539 (3524).

**[Ru(tpy)(dach)Cl][Cl] (5<sub>Cl</sub>)**. 50,0 mg (0,113 mmol) **P2** прекурсора, 16,3  $\mu$ L (0,136 mmol) dach, 47,9 mg (1,130 mmol) LiCl и 47,0  $\mu$ L (0,339 mmol) Et<sub>3</sub>N је додато у 10 ml смеше етанол/H<sub>2</sub>O (3:1) проузрокујући формирање тамно љубичастог талога комплекса **5**. Принос: 41,2 mg (70%). Израчунато за C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>Ru (519,43): C, 48,6; H, 4,85; N, 13,48. Нађено: C, 48,8; H, 4,79; N, 13,52. Комплекс **5** је растворан у води, метанолу и етанолу, делимично растворан у нитрометану, док је нерастворан у ацетону, хлороформу и дихлорметану. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 8,97 (d, 1H, *J* = 5,3 Hz, C6H), 8,88 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, C6''H), 8,40 (t, 2H, C3H/C3''H), 8,36 (t, 2H, *J* = 8,1 Hz, C3'H/C5'H), 8,00 (m, 2H, C4H/C4''H), 7,81 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz, C4'H), 7,68 (m, 2H, C5H/C5''H), 5,97 (dd, 1H, *J* = 11,9, 4,7 Hz, NH dach), 5,11 (t, 1H, *J* = 11,3 Hz, NH dach), 2,76 – 2,52 (m, 3H, NH + CH + CH<sub>2</sub> dach), 2,34 (t, 1H, *J* = 10,7 Hz, NH dach), 2,10 – 1,96 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1,83 – 1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub> dach), 1,55 (d, 2H, *J* = 11,9 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1,24 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1,11 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 0,88 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>): 8,98 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, C6H), 8,92 (d, 1H, *J* = 5,0 Hz, C6''H), 8,41 (t, 2H, *J* = 9,3 Hz, C3H/C3''H), 8,36 (dd, 2H, *J* = 9,5, 8,4 Hz, C3'H/C5'H), 8,01 (t, 2H, *J* = 7,8 Hz, C4H/C4''H), 7,80 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, C4'H), 7,67 (m br, 2H, C5H/C5''H), 5,64 (d br, 1H, NH dach), 4,81 (t, 1H, *J* = 12,2 Hz, NH dach), 2,92 (m, 1H, CH dach), 2,68 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 2,31 (m, 1H, CH dach), 2,00 (делимично преклопљен са сигналом H<sub>2</sub>O, NH dach), 1,87 – 1,79 (m, 3H, 2 × CH<sub>2</sub> + NH dach), 1,68 (d br, 1H, *J* = 12,7 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1,59 (d br, 1H, *J* = 12,2 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1,34 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1,21 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1,01 (ddd, 1H, *J* = 25,4, 12,6, 3,7 Hz, CH<sub>2</sub> dach). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>): 161,78 (C2), 161,75 (C2''), 161,66 (C2'), 161,57 (C6'), 153,6 (C6H/6''H), 137,4 (C4H), 137,3 (C4''H), 130,6 (C4'H), 128,3 (C5H), 128,1 (C5''H), 123,8 (C3H), 123,7 (C3''H), 122,44 (C3'H), 122,36 (C5'H), 61,8 (CH dach), 61,7 (CH dach), 36,5 (CH<sub>2</sub> dach), 35,2 (CH<sub>2</sub> dach), 25,7 (CH<sub>2</sub> dach), 25,3 (CH<sub>2</sub> dach). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3240 (m), 3141 (m); ν<sub>tpy</sub> 2931 (s), 2856 (m), 1601 (s), 1446 (s), 1112 (m), 768 (s), 618 (m); ν<sub>Ru-Cl</sub> 310 (w). UV/Vis спектар (λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 233 (23896), 274 (23385), 318 (33757), 370 (4354), 493 (4660), 544 (4194).

**Аква производи [Ru(Cl-tpy)(N-N)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (1a<sub>q</sub> – 3a<sub>q</sub>) и [Ru(tpy)(N-N)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (4a<sub>q</sub> – 5a<sub>q</sub>):**

**[Ru(Cl-tpy)(en)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (1a<sub>q</sub>)**. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 8,99 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, C6H/C6''H), 8,51 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,42 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, C3H/C3''H), 8,08 (td, 2H, *J* = 7,9, 1,4 Hz, C4H/C4''H), 7,76 (ddd, 2H, *J* = 7,3, 5,6, 1,3 Hz, C5H/C5''H), 5,84 (t br, 2H, *J* = 5,1 Hz, NH<sub>2</sub> en),

3,26 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2,54 (t br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 2,35 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O): 161,3 (C2'/C6'), 159,3 (C2/C2''), 152,8 (C6H/C6''H), 138,6 (C4'), 137,4 (C4H/C4''H), 127,9 (C5H/C5''H), 123,5 (C3H/C3''H), 121,9 (C3'H/C5'H), 45,1 (CH<sub>2</sub> en), 44,7 (CH<sub>2</sub> en).

**[Ru(Cl-tpy)(dach)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (2aq).** <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 9,04 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, C6H), 8,94 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, C6''H), 8,51 (d, 1H, *J* = 1,5 Hz, C3'H), 8,49 (d, 1H, *J* = 1,6 Hz, C5'H), 8,42 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz, C3H/C3''H), 8,09 (dd, 2H, *J* = 8,5, 7,1 Hz, C4H/C4''H), 7,76 (dd, 2H, *J* = 7,2, 6,0 Hz, C5H/C5''H), 6,20 (dd, 1H, *J* = 12,5, 3,8 Hz, NH dach), 5,32 (t, 1H, *J* = 12,0 Hz, NH dach), 2,75 – 2,61 (m, 2H, CH dach/NH dach), 2,61 – 2,54 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 2,28 (t, 1H, *J* = 11,4 Hz, NH dach), 2,02 (m, 1H, CH dach), 1,84 – 1,70 (m, 2H, CH<sub>2</sub> dach), 1,56 (d, 2H, *J* = 12,2 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1,24 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1,10 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 0,88 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O): 161,3 (C2'/C6'), 159,4 (C2/C2''), 152,8 (C6H), 152,6 (C6''H), 138,3 (C4'), 137,3 (C4H/C4''H), 127,8 (C5H/C5''H), 123,5 (C3H/C3''H), 121,9 (C3'H/C5'H), 60,3 (CH dach), 59,7 (CH dach), 34,6 (CH<sub>2</sub> dach), 33,1 (CH<sub>2</sub> dach), 24,0 (CH<sub>2</sub> dach), 23,4 (CH<sub>2</sub> dach).

**[Ru(Cl-tpy)(bpy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (3aq).** <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 9,55 (d, 1H, *J* = 5,5 Hz, CaH), 8,73 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,70 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, CdH), 8,46 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, C3H/C3''H), 8,39 – 8,33 (m, 2H, CcH/CgH), 8,05 (t, 1H, *J* = 6,6 Hz, CbH), 8,01 (td, 2H, *J* = 7,9, 1,4 Hz, C4H/C4''H), 7,84 (d, 2H, *J* = 5,5 Hz, C6H/C6''H), 7,71 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz, ChH), 7,38 (m, 2H, C5H/C5''H), 7,35 (d, 1H, *J* = 5,8 Hz, CjH), 6,96 (m, 2H, CiH). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O): 159,5 (C2'/C6'), 159,0 (Cf), 158,1 (C2/C2''), 156,2 (Ce), 153,1 (C6H/C6''H), 152,6 (CjH), 150,2 (CaH), 142,9 (C4'), 138,3 (C4H/C4''H), 137,4 (CcH), 136,0 (ChH), 128,0 (C5H/C5''H), 127,2 (CbH), 125,9 (CiH), 124,4 (C3H/C3''H), 123,3 (C3'H/C5'H), 123,3 (CdH), 123,2 (CgH).

**[Ru(tpy)(en)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (4aq).** <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 8,97 (d, 2 H, *J* = 5,4 Hz, C6H/C6''H), 8,43 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz, C3H/C3''H), 8,39 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, C3'H/C5'H), 8,06 (td, 2H, *J* = 7,9, 1,4 Hz, C4H/C4''H), 7,88 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz, C4'H), 7,72 (m, 2H, C5H/C5''H), 5,76 (t br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 3,24 (m, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2,52 (t br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 2,33 (m, 2H, CH<sub>2</sub> en). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O): 161,2 (C2'/C6'), 159,9 (C2/C2''), 152,7 (C6H/C6''H), 137,4 (C4H/C4''H), 131,8 (C4'H), 127,4 (C5H/C5''H), 123,1 (C3H/C3''H), 121,7 (C3'H/C5'H), 45,0 (CH<sub>2</sub> en), 44,5 (CH<sub>2</sub> en).

**[Ru(tpy)(dach)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (5aq).** <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): 9,02 (d, 1H, *J* = 5,5 Hz, C6H), 8,92 (d, 1H, *J* = 5,2 Hz, C6''H), 8,43 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, C3H/C3''H), 8,39 (t, 2H, *J* = 8,7 Hz, C3'H/C5'H), 8,06 (t, 2H, *J* = 7,9 Hz, C4H/C4''H), 7,87 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz, C4'H), 7,72 (m, 2H, C5H/C5''H), 6,12 (d br, 1H, NH dach), 5,23 (t, 1H, *J* = 11,9 Hz, NH dach), 2,72 – 2,52 (m, 2H, CH dach/CH<sub>2</sub>

dach), 2,24 (d, 1H,  $J = 11,1$  Hz, NH dach), 2,08 – 1,96 (m, 1H,  $CH_2$  dach), 1,83 – 1,69 (m, 2H,  $CH_2$  dach), 1,55 (d, 2H,  $J = 11,9$  Hz,  $CH_2$  dach), 1,24 (m, 1H,  $CH_2$  dach), 1,10 (m, 1H,  $CH_2$  dach), 0,88 (m, 1H,  $CH_2$  dach).  $^{13}C$  NMR ( $D_2O$ ): 161,23 ( $C2'$ ), 161,18 ( $C6'$ ), 161,0 ( $C2$ ), 160,9 ( $C2''$ ), 153,4 ( $C6H$ ), 153,2 ( $C6''H$ ), 137,9 ( $C4''H$ ), 137,7 ( $C4H$ ), 132,5 ( $C4'H$ ), 128,1 ( $C5''H$ ), 127,9 ( $C5H$ ), 123,84 ( $C3H$ ), 123,78 ( $C3''H$ ), 122,38 ( $C3'H$ ), 122,36 ( $C5'H$ ), 60,5 ( $CH$  dach), 60,3 ( $CH$  dach), 35,5 ( $CH_2$  dach), 33,9 ( $CH_2$  dach), 24,9 ( $CH_2$  dach), 24,6 ( $CH_2$  dach).

**Општи поступак за синтезу  $[Ru(Cl-tpy)(N-N)(dmsO-S)][CF_3SO_3]_2$  ( $6_{OTf}$  -  $8_{OTf}$ ) и  $[Ru(tpy)(N-N)(dmsO-S)][CF_3SO_3]_2$  ( $9_{OTf}$  -  $10_{OTf}$ ) комплекса:**

Измерена количина комплекса  $[Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl][Cl]$  ( $N-N = en$  ( $1_{Cl}$ ), dach ( $2_{Cl}$ ), bpy ( $3_{Cl}$ )) је растворена у раствору метанола који садржи велики вишак DMSO (око 35 eq.). Након додатка 2,1 eq.  $AgCF_3SO_3$ , реакциона смеша је загревана и рефлугована 2 сата у мраку. Током рефлуговања боја раствора је промењена из љубичасте (тамно црвене за  $8_{OTf}$ ) у црвено-наранџасту. Настали талог  $AgCl$  је уклоњен филтрацијом, а метанол је испарен под сниженим притиском. Уљани остатак је растворен у етанолу, затим је додат етар у капима до zasiћења, и раствор остављен на 4 °C током 24-48 сати. Кристални талог црвено-наранџасте боје је сакупљен филтрирањем, испран хладном мешом етанол/етар и етром и осушен под вакуумом.

Одговарајући tpy комплекси,  $9_{OTf}$  и  $10_{OTf}$ , су синтетисани по сличној процедури користећи  $[Ru(tpy)(en)Cl][Cl]$  ( $4_{Cl}$ ) и  $[Ru(tpy)(dach)Cl][Cl]$  ( $5_{Cl}$ ) као полазне комплексе.

**$[Ru(Cl-tpy)(en)(dmsO-S)][CF_3SO_3]_2$  ( $6_{OTf}$ ).** 25,0 mg (0,050 mmol) комплекса  $1_{Cl}$  и 27,0 mg (0,105 mmol)  $AgCF_3SO_3$  је додато у 7 ml раствора метанола који садржи 125,0  $\mu L$  DMSO, што доводи до формирања црвено-наранџастих игличастих кристала комплекса  $6_{OTf}$  погодних за рендгенску структурну анализу. Принос: 33,4 mg (83%). Израчунато за  $C_{21}H_{24}ClF_6N_5O_7RuS_3$  (805,15): C, 31,3; H, 3,00; N, 8,70. Нађено: C, 31,3; H, 3,03; N, 8,67. Комплекс  $6_{OTf}$  је растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону и ацетонитрилу, док је нерастворан у хлороформу и дихлорметану.  $^1H$  NMR ( $(CD_3)_2CO$ ): 9,23 (d, 2H,  $J = 5,5$  Hz,  $C6H/C6''H$ ), 8,86 (s, 2H,  $C3'H/C5'H$ ), 8,81 (d, 2H,  $J = 7,6$  Hz,  $C3H/C3''H$ ), 8,39 (t, 2H,  $J = 7,8$  Hz,  $C4H/C4''H$ ), 7,95 (t, 2H,  $C5H/C5''H$ ), 5,62 (t br, 2H,  $NH_2$  en), 4,18 (t br, 2H,  $NH_2$  en), 3,37 (m br, 2H,  $CH_2$  en), 2,95 (m br, 2H,  $CH_2$  en), 2,52 (s, 6H,  $CH_3$  dmsO-S).  $^{13}C$  NMR ( $(CD_3)_2CO$ ): 160,2 ( $C2'/C6'$ ), 159,5 ( $C2/C2''$ ), 154,9 ( $C6H/C6''H$ ), 144,4 ( $C4'$ ), 140,1 ( $C4H/C4''H$ ), 129,8

(C5H/C5''H), 126,1 (C3H/C3''H), 124,5 (C3'H/C5'H), 46,6 (CH<sub>2</sub> en), 45,7 (CH<sub>2</sub> en), 43,3 (CH<sub>3</sub> dms<sub>o</sub>-S). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3274 (m), 3191 (m), 3169 (m); ν<sub>tpy</sub> 3070 (m), 1598 (s), 1473 (m), 1425 (s), 1125 (s), 794 (s); ν<sub>S=O</sub> 1087 (s); ν<sub>OTf</sub> 1246 (vs), 1222 (vs), 1163 (vs), 1025 (vs); ν<sub>Ru-S</sub> 423 (s). UV/Vis спектар (H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 236 (45432), 273 (40473), 289 (45396), 329 (32826), 420 (8220).

**[Ru(Cl-tpy)(dach)(dms<sub>o</sub>-S)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (7<sub>OTf</sub>).** 25,0 mg (0,045 mmol) комплекса **2**<sub>Cl</sub> и 24,3 mg (0,095 mmol) AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> је додато у 6 ml раствора метанола који садржи 113,0 μL DMSO, што проузрокује стварање црвено-наранџасте плоче комплекса **7**<sub>OTf</sub>. Принос: 34,5 mg (89%). Израчунато за C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>ClF<sub>6</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>RuS<sub>3</sub> (859,24): C, 35,0; H, 3,52; N, 8,15. Нађено: C, 34,9; H, 3,59; N, 8,09. Комплекс **7**<sub>OTf</sub> је растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону и ацетонитрилу, док је нерастворан у хлороформу и дихлорметану. <sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): 9,32 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, C6H), 9,17 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, C6''H), 8,84 (s, 1H, C3'H), 8,83 (s, 1H, C5'H), 8,79 (dd, 2H, *J* = 7,9, 4,6 Hz, C3H/C3''H), 8,37 (dd, 2H, *J* = 13,9, 6,5 Hz, C4H/C4''H), 7,93 (dd, 2H, *J* = 12,6, 6,3 Hz, C5H/C5''H), 5,79 (d br, 1H, *J* = 9,5 Hz, NH dach), 5,09 (t br, 1H, *J* = 11,9 Hz, NH dach), 4,27 (d br, 1H, *J* = 10,0 Hz, NH dach), 3,94 (t, 1H, *J* = 11,6 Hz, NH dach), 2,95 (m, 1H, CH dach), 2,65 (m, 1H, CH dach), 2,56 (d br, 1H, *J* = 13,4 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 2,52 (s, 3H, CH<sub>3</sub> dms<sub>o</sub>-S), 2,46 (s, 3H, CH<sub>3</sub> dms<sub>o</sub>-S), 1,83 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> dach), 1,78 (d br, 1H, *J* = 15,3 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1,61 (d br, 1H, *J* = 12,2 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1,35 – 1,15 (m, 3H, CH<sub>2</sub> dach). <sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): 160,4 (C2'), 160,1 (C6'), 159,7 (C2), 159,4 (C2''), 155,2 (C6''H), 155,0 (C6H), 144,3 (C4'), 140,1 (C4H), 140,1 (C4''H), 129,9 (C5''H), 129,8 (C5H), 126,10 (C3H), 126,09 (C3''H), 124,5 (C3'H), 124,4 (C5'H), 61,4 (CH dach), 60,3 (CH dach), 43,6 (CH<sub>3</sub> dms<sub>o</sub>-S), 43,0 (CH<sub>3</sub> dms<sub>o</sub>-S), 35,1 (CH<sub>2</sub> dach), 34,8 (CH<sub>2</sub> dach), 25,2 (CH<sub>2</sub> dach), 24,8 (CH<sub>2</sub> dach). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3263 (m), 3186 (m), 3169 (m); ν<sub>tpy</sub> 3059 (m), 2932 (m), 1595 (s), 1472 (w), 1426 (m), 1122 (s), 786 (s), 574 (m); ν<sub>S=O</sub> 1085 (s); ν<sub>OTf</sub> 1253 (vs), 1224 (vs), 1160 (vs), 1028 (vs); ν<sub>Ru-S</sub> 419 (s). UV/Vis спектар (H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 236 (40275), 273 (34830), 294 (39110), 329 (28820), 421 (8027).

**[Ru(Cl-tpy)(bpy)(dms<sub>o</sub>-S)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (8<sub>OTf</sub>).** 25,0 mg (0,042 mmol) **3**<sub>Cl</sub> комплекса и 22,6 mg (0,088 mmol) AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> је додато у 6 ml раствора метанола који садржи 105,0 μL DMSO, при чему настају црвено-наранџасте плоче комплекса **8**<sub>OTf</sub> које су погодне за рендгенску структурну анализу. Принос: 32,9 mg (87%). Израчунато за C<sub>29</sub>H<sub>24</sub>ClF<sub>6</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>RuS<sub>3</sub> (901,24): C, 38,7; H, 2,68; N, 7,77. Нађено: C, 38,7; H, 2,69; N, 7,79.

Комплекс **8<sub>OTf</sub>** је растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону и ацетонитрилу, док је нерастворан у хлороформу и дихлорметану. <sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): 10,31 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, CaH), 9,12 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,95 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, CdH), 8,88 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, C3H/C3''H), 8,75 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, CgH), 8,51 (td, 1H, *J* = 7,9, 1,4 Hz, CcH), 8,30 (td, 2H, *J* = 7,9, 1,4 Hz, C4H/C4''H), 8,17 (d, 2H, *J* = 5,4 Hz, C6H/C6''H), 8,15 (t, 1H *J* = 8,1, CbH), 8,11 (td, 1H, *J* = 8,1, 1,4 Hz, ChH), 7,66 (ddd, 2H, *J* = 7,5, 5,5, 1,2 Hz, C5H/C5''H), 7,60 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, CjH), 7,38 (t, 1H, *J* = 6,7 Hz, CiH), 2,67 (s, 6H, CH<sub>3</sub> dms<sub>o</sub>-S). <sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): 159,3 (C2'/C6'), 157,8 (C2/C2''), 157,5 (Ce), 156,9 (Cf), 156,0 (CaH), 155,2 (C6H/C6''H), 150,2 (CjH), 147,2 (C4'), 140,7 (C4H/C4''H), 140,4 (ChH), 139,9 (CcH), 130,5 (C5H/C5''H), 128,9 (CbH), 128,6 (CiH), 127,1 (C3H/C3''H), 126,6 (C3'H/C5'H), 125,7 (CdH), 124,9 (CgH), 42,9 (CH<sub>3</sub> dms<sub>o</sub>-S). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>tpy</sub> 3073 (m), 3012 (m), 2923 (m), 1598 (s), 1472 (w), 1424 (m), 1123 (s), 791 (m), 570 (m); ν<sub>S=O</sub> 1093 (s); ν<sub>OTf</sub> 1260 (vs), 1222 (s), 1145 (s), 1028 (vs); ν<sub>Ru-S</sub> 430 (s). UV/Vis спектар (H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 236 (30530), 249 (27538), 274 (41680), 284 (39942), 314 (23230), 329 (26052), 405 (7996), 520 (428).

**[Ru(tpy)(en)(dms<sub>o</sub>-S)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**9<sub>OTf</sub>**). 25,0 mg (0,054 mmol) **4<sub>Cl</sub>** комплекса и 29,0 mg (0,113 mmol) AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> је додато у 6,5 ml раствора метанола који садржи 125,0 μL DMSO, при чему долази до формирања црвено-наранџастих иглица комплекса **9<sub>OTf</sub>**. Принос: 36,1 mg (87%). Израчунато за C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>F<sub>6</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>RuS<sub>3</sub> (770,71): C, 32,7; H, 3,27; N, 9,09. Нађено: C, 32,6; H, 3,23; N, 9,11. Комплекс **9<sub>OTf</sub>** је растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону и ацетонитрилу, док је нерастворан у хлороформу и дихлорметану. <sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): 9,22 (d, 2H, *J* = 5,1 Hz, C6H/C6''H), 8,72 (d, 2H, *J* = 7,8 Hz, C3H/C3''H), 8,71 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, C3'H/C5'H), 8,34 (td, 2H, *J* = 8,0, 1,5 Hz, C4H/C4''H), 8,32 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz, C4'H), 7,90 (ddd, 2H, *J* = 7,4, 5,6, 1,2 Hz, C5H/C5''H), 5,61 (m br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 4,20 (m br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 3,36 (dt, 2H, *J* = 11,4, 5,8 Hz, CH<sub>2</sub> en), 2,94 (dt, 2H, *J* = 11,0, 5,6 Hz, CH<sub>2</sub> en), 2,52 (s, 6H, CH<sub>3</sub> dms<sub>o</sub>-S). <sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): 160,4 (C2/C2''), 159,2 (C2'/C6'), 154,9 (C6H/C6''H), 140,0 (C4H/C4''H), 137,4 (C4'H), 129,3 (C5H/C5''H), 125,5 (C3H/C3''H), 124,2 (C3'H/C5'H), 46,6 (CH<sub>2</sub> en), 45,7 (CH<sub>2</sub> en), 43,5 (CH<sub>3</sub> dms<sub>o</sub>-S). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3243 (m), 3165 (m); ν<sub>tpy</sub> 3077 (m), 1603 (m), 1449 (m), 778 (s), 573 (s); ν<sub>S=O</sub> 1071 (m); ν<sub>OTf</sub> 1246 (vs), 1222 (vs), 1155 (vs), 1024 (vs); ν<sub>Ru-S</sub> 426 (s). UV/Vis спектар (H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 239 (33153), 272 (40851), 287 (46104), 330 (35481), 421 (8139).**

**[Ru(tpy)(dach)(dmsO-S)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (10<sub>OTf</sub>)**. 25,0 mg (0,048 mmol) комплекса **5<sub>Cl</sub>** и 26,0 mg (0,101 mmol) AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> је додато у 6 ml раствора метанола који садржи 120,0 μL DMSO, при чему настају црвено-наранцасте плоче комплекса **10<sub>OTf</sub>**. Принос: 32,4 mg (82%). Израчунато за C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>F<sub>6</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>RuS<sub>3</sub> (824,80): C, 36,4; H, 3,79; N, 8,49. Нађено: C, 36,3; H, 3,86; N, 8,52. Комплекс **10<sub>OTf</sub>** је растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону и ацетонитрилу, док је нерастворан у хлороформу и дихлорметану. <sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): 9,34 (d, 1H, *J* = 5,0 Hz, C6H), 9,20 (d, 1H, *J* = 5,0 Hz, C6''H), 8,74 – 8,61 (m, 4H, C3H/C3''H/C3'H/C5'H), 8,36 – 8,20 (m, 3H, C4H/C4''H/C4'H), 7,92 – 7,75 (m, 2H, C5H/C5''H), 5,85 (d, 1H, *J* = 10,8 Hz, NH dach), 5,04 (t, 1H, *J* = 11,2 Hz, NH dach), 4,35 (d, 1H, *J* = 10,7 Hz, NH dach), 3,93 (t, 1H, *J* = 11,6 Hz, NH dach), 2,90 – 2,82 (m, 1H, CH dach), 2,62 – 2,47 (m, 8H, CH dach + 2 × CH<sub>3</sub> dmsO-S + CH<sub>2</sub> dach), 1,89 – 1,70 (m, 3H, 3 × CH<sub>2</sub> dach), 1,60 (d, 1H, *J* = 9,6 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1,38 – 1,15 (m, 3H, 3 × CH<sub>2</sub> dach). <sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): 160,0 (C2'), 159,9 (C2), 159,7 (C6'), 159,6 (C2''), 155,5 (C6''H), 155,1 (C6H), 139,8 (C4H/C4''H), 137,3 (C4'H), 129,3 (C5''H), 129,1 (C5H), 125,41 (C3H), 125,36 (C3''H), 124,1 (C3'H), 124,0 (C5'H), 61,6 (CH dach), 60,1 (CH dach), 44,0 (CH<sub>3</sub> dmsO-S), 43,9 (CH<sub>3</sub> dmsO-S), 35,1 (CH<sub>2</sub> dach), 34,7 (CH<sub>2</sub> dach), 25,3 (CH<sub>2</sub> dach), 24,9 (CH<sub>2</sub> dach). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3282 (m), 3240 (m), 3157 (m); ν<sub>tpy</sub> 2936 (m), 2878 (m), 1603 (m), 1445 (s), 774 (s), 572 (m); ν<sub>S=O</sub> 1100 (s); ν<sub>OTf</sub> 1251 (vs), 1220 (vs), 1161 (vs), 1022 (vs); ν<sub>Ru-S</sub> 429 (s). UV/Vis спектар (H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 239 (36975), 272 (43410), 296 (51957), 330 (38535), 418 (8337).

Рутенијум(II) тритиа комплекс [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF<sub>6</sub>] је синтетисан по модификованом поступку за одговарајући CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> комплекс који је раније описан у литератури.<sup>76</sup>

**[Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF<sub>6</sub>]**. 100 mg комплекса [Ru([9]aneS<sub>3</sub>)(dmsO-S)<sub>2</sub>Cl][PF<sub>6</sub>]<sup>1</sup> (0,16 mmol) је делимично растворено у 10 ml метанола, затим је додата еквимоларна количина bpy (25,6 mg, 0,16 mmol) и реакциона смеша рефлугована око 1 сат. Током рефлуговања боја раствора је промењена из жуте у наранцасту, при чему је добијен тамно жут талог. Након хлађења раствора на собној температури, талог је сакупљен филтрирањем, испран етанолом и етром, и осушен под вакуумом. Принос: 69,4 mg (70%). Израчунато за C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>ClF<sub>6</sub>N<sub>2</sub>PRuS<sub>3</sub> (618,03): C, 31,09; H, 3,26; N, 4,53%. Нађено: C, 30,98; H, 3,07; N, 4,38%. Спектрални подаци овог комплекса се слажу са подацима за

одговарајуће  $\text{CF}_3\text{SO}_3$  једињење.<sup>76</sup>  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ,  $\delta$  ppm): 9,08 (d, 2H,  $J = 5,4$  Hz, C6H/C6'H), 8,48 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz, C3H/C3'H), 8,14 (t, 2H,  $J = 7,9$  Hz, C4H/C4'H), 7,63 (t, 2H,  $J = 7,9$  Hz, C5H/C5'H), 3,13 – 2,50 (m, 12H,  $\text{CH}_2$  [9]aneS3).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  ppm): 9,05 (d, 2H,  $J = 5,6$  Hz, C6H/C6'H), 8,47 (d, 2H,  $J = 8,3$  Hz, C3H/C3'H), 8,13 (t, 2H,  $J = 7,7$  Hz, C4H/C4'H), 7,63 (t, 2H,  $J = 6,5$  Hz, C5H/C5'H), 3,08 – 2,47 (m, 12H,  $\text{CH}_2$  [9]aneS3).

### 2.3. Инструменти

Моно-димензионални ( $^1\text{H}$  (200, 400 или 500 MHz),  $^{13}\text{C}$  (100,5 или 126 MHz),  $^{31}\text{P}$  (202 MHz)) и би-димензионални ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC) NMR спектри снимани су на Varian Gemini-200, JEOL Eclipse 400FT и Varian 500 спектрометру.  $^1\text{H}$  хемијска померања у  $\text{D}_2\text{O}$  су дата у односу на интерни стандард 2,2-диметил-2,2-силапентан-5-сулфонат (DSS) на  $\delta = 0,00$  ppm, у појединим случајевима у односу на натријум-триметилсилилпропан-3-сулфат (TSP) или у односу на додати 1,4-диоксан ( $\delta = 3,75$  ppm). У другим растварачима, хемијска померања су дата у односу на резидуални пик недеутерисаног растварача [ $\delta = 4,33$  ppm за  $\text{CD}_3\text{NO}_2$ , 2,05 ppm за  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , и 2,50 ppm за диметил сулфоксид (DMSO)- $d^6$ ].  $^{13}\text{C}$  хемијска померања у  $\text{D}_2\text{O}$  су дата у односу на екстерне раствараче ( $\delta = 17,5$  и 58,1 ppm за етанол, 39,4 ppm за DMSO), док су у другим растварачима дати у односу на резидуални пик недеутерисаног растварача ( $\delta = 62,8$  ppm за  $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ; 29,84 ppm за  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ; 39,52 ppm за DMSO- $d^6$ ).  $^{31}\text{P}$  хемијска померања су дата у односу на екстерни 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  стандард на 0,00 ppm. Сви NMR спектри су снимани на 298 K. рD мерења су вршена помоћу inoLab Sen Tix<sup>®</sup> Mic рН микроелектроде.

UV-Vis спектри снимани су помоћу Jasco V-500 UV-Vis спектрофотометра који је опремљен регулатором температуре Peltier или помоћу Perkin Elmer Lambda 35 спектофотометра са термостатираном 1,00 cm кварцном Suprasil киветом (3,0 ml).

IR спектри су снимани на Perkin Elmer 983G спектрометру.

Елементална анализа рађена је у Департменту за хемијске науке и технологију, Универзитета у Удинама, Италија.

Рендгенска структурна испитивања за кристале  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{dmsO-S})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (**6OTf**) и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(\text{dmsO-S})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (**8OTf**) комплекса су вршена на Oxford Diffraction SuperNova дифрактометру опремљеним оптичким огледалом и на Atlas



детектору користећи Мо и Си микрофокус извора X-зрака ( $T = 150(2)$  K). Рендгенска структурна испитивања за кристале  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}] \cdot 3\text{Cl}$  и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{dmsO-S})][\text{PF}_6]_2 \cdot 6\text{PF}_6$  су вршена на дифракционој линији снопа X-зрака синхротрона Elettra (Трст) на 100 K,  $\lambda = 0,7000$  и  $0,88560$  Å. Рендгенска структурна анализа за кристале  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ ,  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})(9\text{MeG-N7})][\text{PF}_6]_2$  и  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{pic})(9\text{MeG-N7})][\text{PF}_6]$  комплекса вршена је на Nonius DIP-1030H дифрактометру (Мо-К $\alpha$  радијација,  $\lambda = 0,71073$  Å,  $T = 293(2)$  K), на Nonius Каппа CCD дифрактометру (Мо-К $\alpha$  радијација,  $\lambda = 0,71073$  Å,  $T = 150(2)$  K) и на Си ротирајућој аноди опремљеној Bruker CCD2000 детектором ( $\lambda = 1,54178$  Å,  $T = 293(2)$  K).

За мерење рН раствора коришћен је Jenway 4330 рН-метар са комбинованом Jenway стакленом електродом стандардизованом помоћу Fischer стандардних пуфера чији је рН = 4,00; 7,00; 10,00.

## 2.4. Кинетичка мерења

### 2.4.1. Реакције хидролизе и супституције $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ и $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ комплекса

Кинетика реакција хидролизе  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  комплекса изучавана је UV-Vis спектрофотометријски на 298 K. Раствори комплекса (0,10 mM) припремани су у дестилованој води или у 25 mM Нерес пуферу (рН = 7,4). Радна таласна дужина одређена је снимањем спектра раствора испитиваних комплекса у одређеним временским интервалима. Као радна таласна дужина узима се она таласна дужина на којој је највећа промена у апсорбцији раствора са временом. Добијена промена апсорбанце је показала најбоље слагање када је посматрана као експоненцијална функција првог реда (једначина 2.4.1.1), при чему је добијена вредност константе брзине реакције хидролизе,  $k_{\text{H}_2\text{O}}$  (k).

$$A = C_0 + C_1 e^{-kt} \quad (2.4.1.1)$$

$C_0$  и  $C_1$  компјутерски обрађене константе,  $A$  је апсорбанца након времена  $t$ .

Кинетика реакција супституције ова два комплекса са дериватима гуанина (9MeG и 5'-GMP), као и са сумпор- (Tu, L-Cys и L-Met) и азот-донорским биомолекулима (Pz, Tz и

Ru) је такође изучавана спектрофотометријски. Реакције су проучаване на три различите температуре (288, 298 и 310 K) у 25 mM Нерес пуферу (pH = 7,4) уз додатак 30 mM NaCl. Кинетика испитиваних реакција је праћена под условима реакције *pseudo*-првог реда (концентрација лиганда је била најмање 10 пута у вишку у односу на концентрацију комплекса). Супституционе реакције су започете мешањем 0,3 cm<sup>3</sup> раствора комплекса (1,00 mM) са 2,7 cm<sup>3</sup> раствора лиганда (5,56 mM). Спектрофотометријско одређивање константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , врши се праћењем промене апсорбције раствора  $A_t$  са временом  $t$  на одређеној таласној дужини,<sup>96</sup> на основу једначине (2.4.1.2).

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - k_{\text{obsd}}t \quad (2.4.1.2)$$

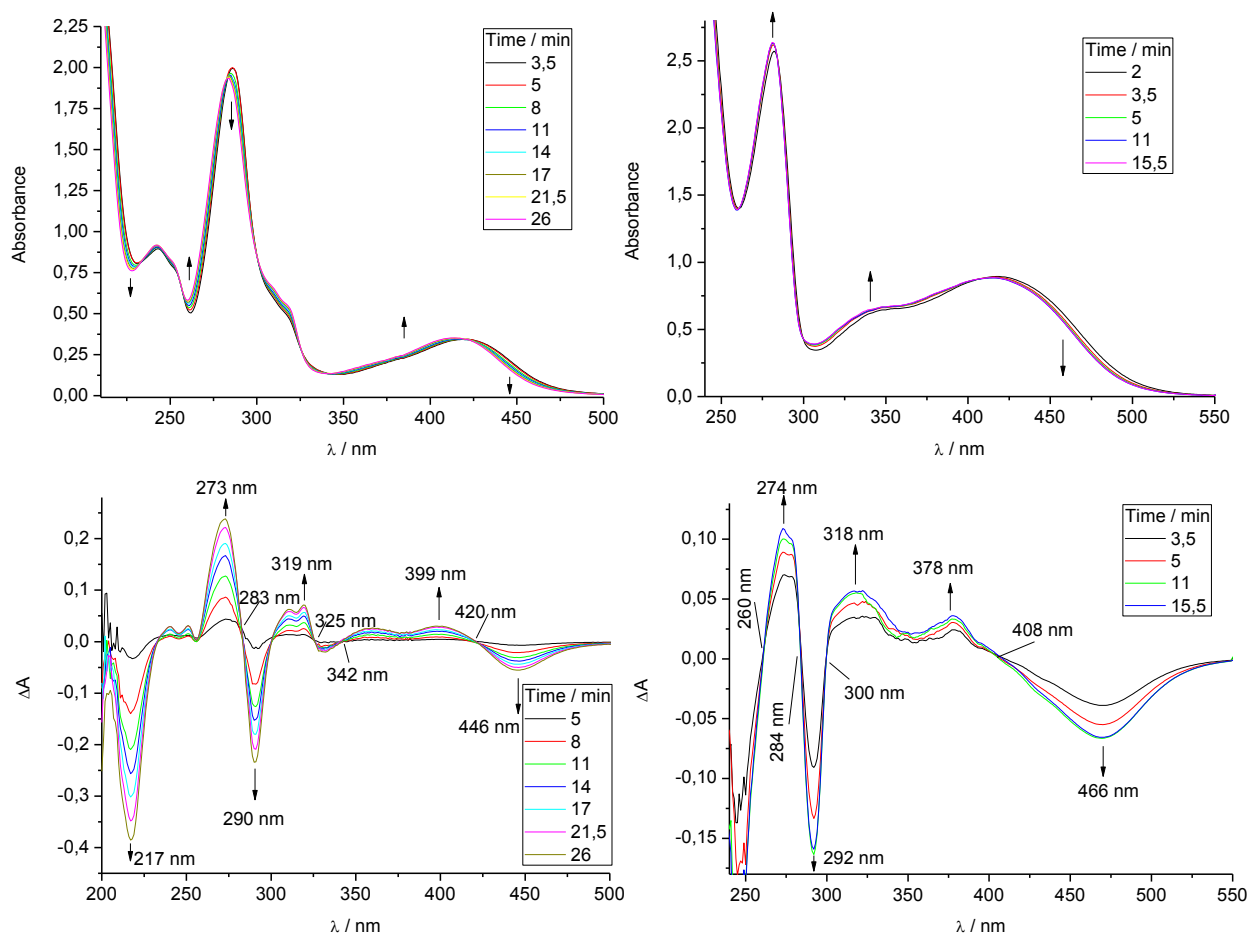
Зависност  $\ln(A_t - A_\infty)$  од времена  $t$  је линеарна, тако да се из нагиба праве добија вредност за  $k_{\text{obsd}}$ . Величина  $A_\infty$  представља апсорбцију раствора након „бесконечно” дугог времена.<sup>96</sup> Добијена вредност за константу брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , представља средњу вредност 2 до 3 независних кинетичких мерења. За обраду података коришћени су компјутерски програми Microsoft Excel 2007 и Origin 8.

#### 2.4.2. Реакције хидролизе и супституције [Ru([9]aneS3)(en)Cl][PF<sub>6</sub>], [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF<sub>6</sub>] и [Ru([9]aneS3)(pic)Cl] комплекса

Кинетика реакције хидролизе [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF<sub>6</sub>] и [Ru([9]aneS3)(pic)Cl] комплекса, као и реакције аниције одговарајућих аква врста [Ru([9]aneS3)(bpy)H<sub>2</sub>O]<sup>2+</sup> и [Ru([9]aneS3)(pic)H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> је изучавана помоћу UV-Vis спектрофотометрије, праћењем промене апсорбције раствора на одговарајућој таласној дужини у функцији времена. Радна таласна дужина за сваки проучавани систем је одређена на начин као што је описано у делу 2.4.1. (Слика 2.1). За реакцију хидролизе, која је извођена на 298 K, припремани су 0,1 mM раствори у 0,1 M NaClO<sub>4</sub>, при чему је апсорбанца снимана на одређеној таласној дужини сваких 30 s. Вредност константе брзине реакције хидролизе,  $k_{\text{H}_2\text{O}}$  ( $k$ ), је добијена на основу претходно описане једначине 2.4.1.1.

За испитивање реакција аниције припремљено је 10 ml раствора испитиваних комплекса концентрације 0,1 mM у 0,1M NaClO<sub>4</sub>. Аликвот запремине 2,5 ml овог раствора је пренет у кивету и коришћен за реакцију хидролизе. Остатак овог раствора, након

постигнуте равнотеже, тј. остварене хидролизе комплекса, подељен је у још три кивете и додата је одговарајућа концентрација NaCl у сваку кивету (50, 100, 200 и 300 mM). Апсорбанца ових раствора је мерена на одређеној таласној дужини сваких 30 s. Вредност константе брзине реакције другог реда,  $k_{Cl}$ , добијена је из нагиба праве зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{Cl'}$ , од концентрације хлорида [Cl<sup>-</sup>].



**Слика 2.1.** Промена апсорбанце са временом за реакцију хидролизе комплекса  $[Ru([9]aneS_3)(bpy)Cl][PF_6]$  (2, лева страна) и  $[Ru([9]aneS_3)(pic)Cl]$  (3, десна страна) у 0,1 M NaClO<sub>4</sub> на 298 K. ( $\Delta A = A_t - A_0$ , где је  $A_t$  = апсорбанца након времена  $t$  и  $A_0$  = апсорбанца након времена које је потребно за снимање првог спектра)

Вредност константе равнотеже  $K_{aq}$  реакције хидролизе испитиваних комплекса добија се на основу једначине (2.4.2.1):

$$K_{aq} = k_{H_2O} / k_{Cl} \quad (2.4.2.1)$$

Кинетика реакција супституције  $[Ru([9]aneS3)(en)Cl][PF_6]$ ,  $[Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF_6]$  и  $[Ru([9]aneS3)(pic)Cl]$  комплекса са 5'-GMP је такође изучавана спектрофотометријски на начин као што је описано у одељку 2.4.1.

### 2.4.3. Супституционе реакције рутенијум(II) арена $[(\eta^6-p-cym)Ru(pydc)Cl]$ комплекса

Кинетика и механизам супституционих реакција  $[(\eta^6-p-cym)Ru(pydc)Cl]$  комплекса са 5'-GMP, Guo и L-His изучавани су UV-Vis спектрофотометријски праћењем промене апсорбције раствора са временом на радној таласној дужини. Реакције су изучаване на pH = 2,5 (0,1 M NaClO<sub>4</sub>) и на pH = 7,2 (25 mM Hepes пуфер) у присуству 10 mM NaCl на 310 K, изузев реакције са 5'-GMP, која је изучавана и на 298 K и 318 K. У свим системима концентрација лиганда била је у великом вишку (најмање 10 пута) у односу на концентрацију полазног комплекса, како би се обезбедили услови реакције *pseudo*-првог реда.

### 2.5. <sup>1</sup>H NMR мерења

Кинетика реакције супституције  $[(\eta^6-p-cym)Ru(pydc)Cl]$  комплекса са 5'-GMP, Guo и L-His изучавана је <sup>1</sup>H NMR спектроскопијом у моларном односу 1:1, при чему су почетне концентрације реактанта биле 8 mM. Раствори комплекса и лиганда су припремани у 300  $\mu$ L D<sub>2</sub>O непосредно пре почетка снимања спектра. Сви спектри су снимани на 295 K, а добијени резултати су анализирани помоћу компјутерских програма Origin 8, Microsoft Excel 2007 и MestReNova .

### 2.6. pH титрације

pH титрације аква комплексних јона  $[Ru(Cl-tpy)(en)(H_2O)]^{2+}$ ,  $[Ru(Cl-tpy)(dach)(H_2O)]^{2+}$  и  $[Ru(Cl-tpy)(bpy)(H_2O)]^{2+}$ , као и титрације производа комплекса са дериватима гуанина,  $[Ru(Cl-tpy)(en)(9MeG-N7)]^{2+}$  и  $[Ru(Cl-tpy)(en)(5'-GMP-N7)]^{2+}$ , вршене су помоћу <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P NMR спектроскопије. Раствори испитиваних комплекса су припремани у 10% D<sub>2</sub>O/90% H<sub>2</sub>O у концентрацији 4 mM и то 24 сата пре почетка

титрације како би се постигла потпуна хидролиза комплекса. Раствори  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(9\text{MeG-N7})]^{2+}$  и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(5'-\text{GMP-N7})]^{2+}$  комплекса су припремани у  $\text{D}_2\text{O}$ , при чему су комплекс и лиганд у молском односу 1:1,3 за 9MeG (4 mM), и 1:1 за 5'-GMP (10 mM). Титрације ових раствора су извођене 6 дана након мешања комплекса и одговарајућег лиганда.

pH вредност NMR узорака је мерена на 298 K директно у NMR кивети користећи AMEL (модел 334B) pH метар опремљен Ingold микрокомбинованом електродом стандардизованом помоћу Ingold пуферских раствора чији је pH = 4,0; 7,0; 10,0. pH вредност раствора је подешавана разблаженим раствором  $\text{DClO}_4$  и NaOD.

## 2.7. Квантно хемијска метода

B3LYP/LANL2DZp, хибридна теорија функционала густине, са псеудо-потенцијалом примењена је на метал.<sup>111,112</sup> Током оптимизације структура само се симетрија узимала као константа. Поред тога, добијене структуре су окарактерисане израчунавањем вибрационих фреквенција. Релативне енергије су кориговане за нулту тачку вибрационих енергија (ZPE). За израчунавања коришћен је GAUSSIAN 03 пакет програма.<sup>113</sup> Утицај растварача коригован је коришћењем „single-point calculations” метода а уз помоћ CPCM формализма тј. B3LYP(CPCM)/LANL2DZp//B3LYP/LANL2DZp.<sup>114</sup>

## 2.8. Рендгенска структурна анализа

Рендгенска структурна анализа  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**3<sub>Cl</sub>**),  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{dmsO-S})][\text{PF}_6]_2$  (**6<sub>PF6</sub>**),  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{dmsO-S})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (**6<sub>OTf</sub>**),  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(\text{dmsO-S})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (**8<sub>OTf</sub>**) и  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{dmsO-S})][\text{PF}_6]_2$  (**10<sub>PF6</sub>**) комплекса је урађена помоћу директних метода имплементираних у SIR92.<sup>115</sup> Утачњавање структуре је вршено коришћењем методе најмањих квадрата,  $F^2$ , помоћу програма SHELXL-97.<sup>116</sup> Сви атоми, осим водоникових, су одређени анизотропно. Водоникови атоми су постављени на израчунатим позицијама и третирани употребом одговарајућих „riding” модела. За анализу добијених података и припрему слика коришћени су програми Mercury, ORTEP, Platon и Diamond Crystal. Кристалографски подаци за поменуте комплексе су дати у Табели 2.1.

Табела 2.1. Кристалографски подаци за **3<sub>Cl</sub>**, **6<sub>PF6</sub>**, **6<sub>OTf</sub>** и **8<sub>OTf</sub>** комплексе.

Комплекс	<b>3<sub>Cl</sub></b> <sup>1</sup>	<b>6<sub>PF6</sub></b>	<b>6<sub>OTf</sub></b> <sup>2</sup>	<b>8<sub>OTf</sub></b>
Емпиријска формула	C <sub>50</sub> H <sub>49</sub> Cl <sub>6</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6,50</sub> Ru <sub>2</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> ClF <sub>12</sub> N <sub>5</sub> OP <sub>2</sub> RuS	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> RuS <sub>3</sub>	C <sub>29</sub> H <sub>24</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> RuS <sub>3</sub>
M	1308,83	796,95	805,15	901,23
Температура (К)	100(2)	100(2)	150(2)	150(2)
Кристал	Моноклиничан	Триклиничан	Триклиничан	Моноклиничан
Просторна група	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>P</i> -1	<i>P</i> -1	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>
<i>a</i> (Å)	14,3440(9)	10,2101(12)	12,6542(3)	20,1168(5)
<i>b</i> (Å)	14,6880(10)	11,1212(15)	14,7584(3)	8,8764(2)
<i>c</i> (Å)	27,2930(14)	13,4013(18)	18,2199(4)	21,5672(5)
$\alpha$ (°)	90,0	89,420(11)	72,481(2)	90
$\beta$ (°)	98,020(11)	72,275(13)	83,636(2)	116,406(3)
$\gamma$ (°)	90,0	70,412(13)	82,552(2)	90
Запремина, <i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	5694,0(6)	1358,4(3)	3208,17(12)	3449,33(14)
<i>Z</i>	4	2	4	4
<i>D</i> <sub>израчуната</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	1,527	1,948	1,667	1,735
Величина кристала (mm)	0,33 x 0,26 x 0,22	0,35 x 0,30 x 0,30	0,20 x 0,10 x 0,05	0,30 x 0,20 x 0,20
Боја	Жут	Наранџаст	Црвен	Црвен
Сакупљени подаци	27961 / 14608	14621 / 3921	22228 / 13037	21948 / 7037
<i>R</i> <sub>int</sub>	0,0477	0,0340	0,0326	0,0327
Број ограничења / број параметара	0 / 715	0 / 381	105 / 816	0 / 471
<i>F</i> <sup>2</sup>	1,079	1,038	1,076	1,154
<i>R</i> <sub>1</sub> , <i>wR</i> <sub>2</sub> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	0,0599 / 0,1771	0,0359 / 0,1005	0,0636 / 0,1825	0,0745 / 0,2288
<i>R</i> <sub>1</sub> , <i>wR</i> <sub>2</sub> (сви)	0,0680 / 0,1844	0,0373 / 0,1018	0,0959 / 0,1976	0,0773 / 0,2301
Највећи дифракц. пик (eÅ <sup>-3</sup> )	4,017 / -1,643	0,427 / -0,440	1,738 / -1,276	3,083 / -1,301

Рендгенска структурна анализа [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF<sub>6</sub>], [Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)][PF<sub>6</sub>]<sub>2</sub> и [Ru([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)][PF<sub>6</sub>] комплекса је урађена помоћу директних метода имплементираних у SIR92<sup>117</sup> и SIR97<sup>115</sup>, и subsequent Fourier analyses. Утачњавање структуре је вршено коришћењем методе најмањих квадрата, *F*<sup>2</sup>.<sup>116</sup> Водоникови атоми су постављени на израчунатим позицијама и третирани употребом одговарајућих „riding” модела. Сва израчунавања вршена су помоћу WinGX

System, Ver 1.80.05.<sup>118</sup> Кристалографски подаци за поменуте комплексе су дати у Табели 2.2.

Табела 2.2. Кристалографски подаци за проучаване комплексе.

Комплекс	[Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF <sub>6</sub> ]	[Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)][PF <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	[Ru([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)][PF <sub>6</sub> ] <sub>2</sub> ·1.5(H <sub>2</sub> O)
Формула	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>2</sub> PRuS <sub>3</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> F <sub>12</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> P <sub>2</sub> RuS <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> F <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4,50</sub> PRuS <sub>3</sub>
М	618,01	814,63	740,67
Кристал	Моноклиничан	Триклиничан	Моноклиничан
Просторна група	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> /с	<i>P</i> -1	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> /с
<i>a</i> , Å	16,6200(14)	8,5941(2)	10,3000(10)
<i>b</i> , Å	9,6130(9)	11,3013(2)	14,2830(11)
<i>c</i> , Å	14,6900(11)	14,8054(3)	18,1920(14)
$\alpha$ , °	90	99,263(1)	90
$\beta$ , °	111,888(9)	91,080(1)	91,741(11)
$\gamma$ , °	90	92,016(1)	90
Запремина, V, Å <sup>3</sup>	2177,8(3)	1417,90(5)	2675,1(4)
<i>Z</i>	4	2	4
<i>D</i> <sub>израчуната</sub> , g cm <sup>-3</sup>	1,885	1,908	1,839
$\mu$ (Mo-K $\alpha$ ), mm <sup>-1</sup>	1,262	0,995	8,272 <sup>[2]</sup>
<i>F</i> (000)	1232	816	1496
$\theta$ опсег, deg	2,59 – 26,42	3,05 – 27,45	3,94 – 64,35
Број сакупљених рефлексија	33504	11707	24838
Број независних рефлексија	4201	6449	4125
<i>R</i> <sub>int</sub>	0,0341	0,0198	0,0760
Број рефлексија <i>I</i> > 2 $\sigma$ ( <i>I</i> )	3347	6449	2995
Број параметара	297	386	369
<i>F</i> <sup>2</sup>	0,992	1,131	0,961
<i>R</i> <sub>1</sub> , <i>wR</i> <sub>2</sub> ( <i>I</i> > 2 $\sigma$ ( <i>I</i> )) <sub>[a]</sub>	0,0361, 0,0986	0,0271, 0,0585	0,0571, 0,1421
<i>R</i> <sub>1</sub> , <i>wR</i> <sub>2</sub> (сви подаци)	0,0451, 0,1016	0,0354, 0,0612	0,0759, 0,1503
Највећи дифракц. пик, e/Å <sup>3</sup>	0,616, -0,426	0,409, -0,679	1,056, -1,530

## 2.9. Испитивање цитотоксичности

### 2.9.1. Ћелијске културе

Тестови су извођени на ћелијској линији тумора миша CT26 (ATCC® CRL-2638). Залеђена крио вајлица са 1 ml ћелијске суспензије је одлеђена, садржај је пребачен у епрувету са 9 ml комплетног медијума (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, са 10% фетусног говеђег серума (Fetal bovine serum, FBS), 100 јединица/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина и центрифугиран 10 минута на 125 G. Супернатант је одливен, исталожене ћелије су ресуспендоване у 5 ml комплетног медијума и пребачене у T-25 нормални суд (BD Falcon, Сједињене Државе). Ћелије су гајене у инкубатору са стандардним условима (температура 37°C и процентуални удео угљен-диоксида, CO<sub>2</sub>, у ваздуху 5%). Пошто ћелије постану субконфлуентне пресејаване су у нове флашкове у односу 1:3.

*Пресејавање ћелија:* покупљен је медијум из нормалног суда и ћелије су више пута опране PBS-ом, из нормалног суда је покупљен и PBS и додато 1ml трипсина (0,25% трипсин са EDTA), нормални суд је враћен у инкубатор на 2 до 5 минута, како би се ћелије одлепиле. Ћелије су после одлепљивања покупљене и пребачене у епрувету која садржи 14 ml комплетног медијума, ресуспендоване су и пребачене у 3 нова T25 нормална суда (по 5 ml у сваки). Све горе наведене процедуре су извођене у стерилним условима у ламинару.

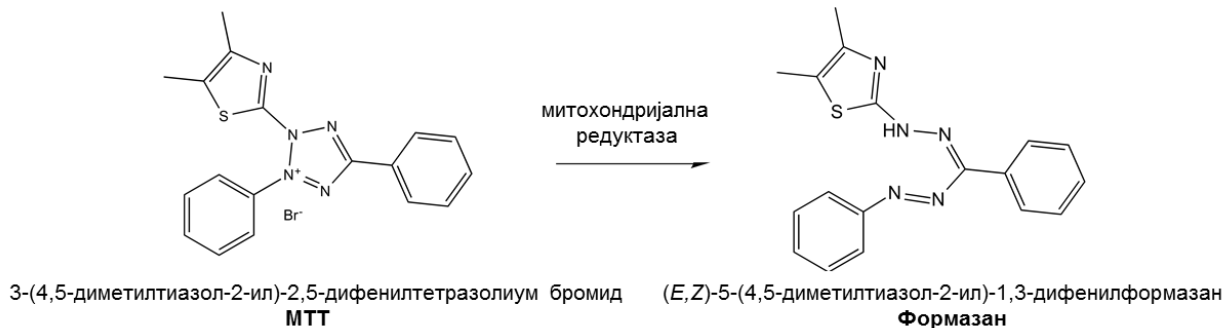
Ћелије су прикупљене из нормалног суда на претходно описан начин, али су после центрифугирања ресуспендоване у 3 ml FBS-а са 10% DMSO-а и пребачене у крио вајлице. Залеђене су на -80°C и после 24 сата су пребачене у течни азот.

### 2.9.2. МТТ тест

МТТ тест је метода којом се индиректно одређује проценат преживелих ћелија. МТТ или 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид, је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама МТТ се редукује до нерастворних љубичастих кристала формазана. Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа),



која је активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија.



**Слика 2.2.** Редукција 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (MTT) до формазана помоћу митохондријалне редуктазе.

Ћелије у експоненцијалној фази раста су прикупљене из нормалног суда на претходно описан начин и број је одређен коришћењем *Neubauer*-ове коморе уз искључење мртвих ћелија, тј. ћелија обојених трипан плавим. Трипан плаво је боја која може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена. Ћелије су разблажене до густине  $5 \times 10^4$  ћелија/ml. У микротитар плоче са 96 отвора је сипано 100  $\mu$ l (5000 ћелија) суспензије по отвору. У посебне отворе је сипан медијум без ћелија како би се одредила оптичка густина самог медијума. Плоча се преко ноћи инкубирала на температури од 37°C и у присуству 5% CO<sub>2</sub>. После 24 сата медијум је одливен и замењен са 100  $\mu$ l комплекса раствореног у медијуму у одговарајућој концентрацији. За сваку концентрацију рађен је трипликат. У контролне отворе је поново сипан чист медијум. Плоча је инкубирана 24 или 72 сата под истим условима. По истеку 72 сата, из свих бунарчића је уклоњена течност и додато је по 100  $\mu$ l чистог DMEM-а са 15 % MTT раствора (5 mg/ml у PBS-у, Phosphate buffer saline). Плоче су инкубиране још 2 до 4 сата. По истеку инкубације медијум је уклоњен и у сваки отвор је сипано по 150  $\mu$ l DMSO и 20  $\mu$ l глицинског пуфера (pH = 10,5). Плоче су мућкане до растварања кристала формазана, око 10 минута. Оптичка густина узорака је одређена мултифункционалним читачем микротитар плоча, Zenyth 3100.

Ефекат испитиване супстанце се одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. Продуковани формазан се раствара у органским рстварачима и интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 570 nm. Процент преживелих ћелија је израчунат помоћу формуле (2.9.2.1):

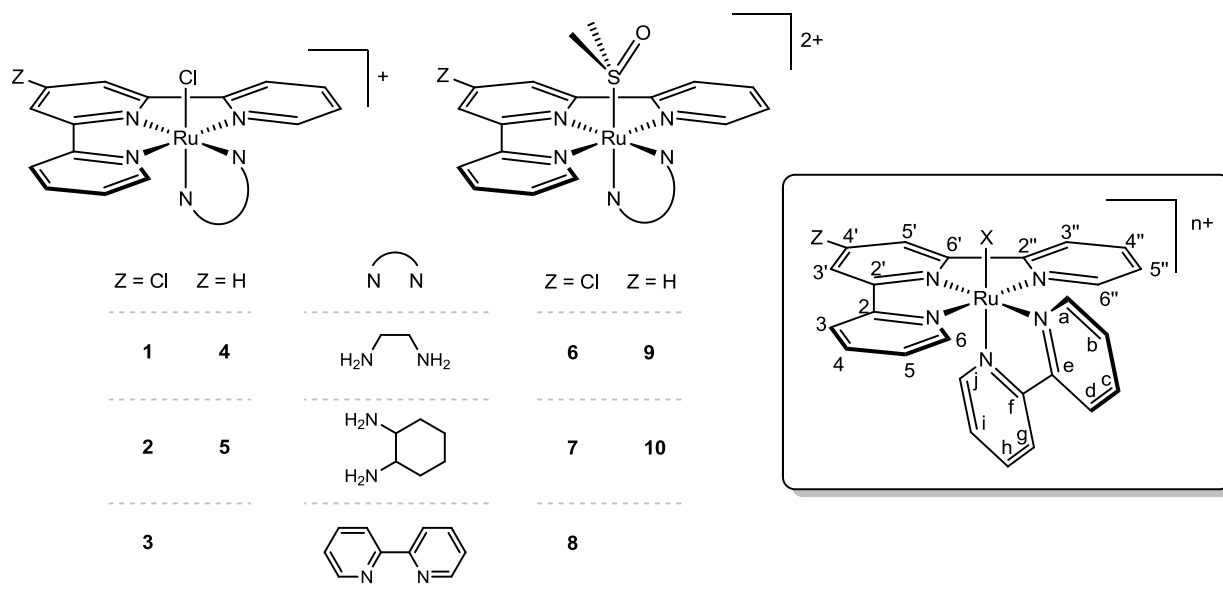
$$\% \text{ вијабилних ћелија} = (E - B) / (K - B) \times 100 \quad (2.9.2.1)$$

у којој Е означава отвор са испитиваним супстанцама, Б бланк, а К отвор са нетретираним ћелијама.

### 3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

#### 3.1. Нови рутенијум(II) терпиридин комплекси: синтеза, карактеризација, активациона кинетика и интеракција са дериватима гуанина

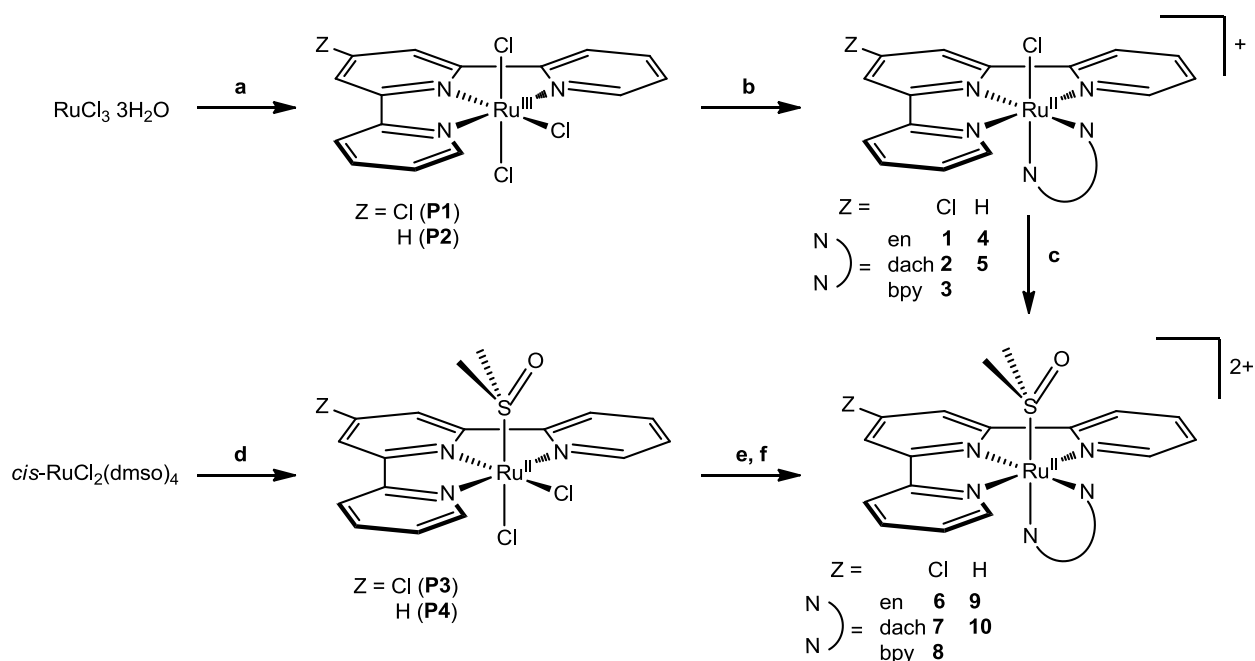
Монофункционални рутенијум(II) комплекси опште формуле  $[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{N-N})\text{X}]_n$  фацијалне геометрије су широко истраживани у погледу антитуморске активности, док су комплекси са меридијалном геометријом скоро потпуно занемарени. Типичан тридентатни лиганд који се координује у меридијалном положају за јон метала је терпиридин. Већина рутенијум(II) терпиридин комплекса, која има такође и *N-N* полипиридил лиганд (нпр. *bpy*), има веома ниску растворљивост у воденом раствору, што ограничава биолошки релевантна истраживања. Овај проблем је довео до смањеног интересовања у области антиканцерогене активности *mer* комплекса у односу на комплексе фацијалне геометрије.<sup>24,82,83,89,119</sup> Имајући то у виду, било је од значаја усмерити испитивања ка синтези и карактеризацији рутенијум(II) терпиридин комплекса меридијалне геометрије и њиховој интеракцији са ДНК нуклеобазама. Синтетизована је серија рутенијум(II) комплекса опште формуле *mer*- $[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{N-N})\text{X}][\text{Y}]_n$ , где је  $\text{L}_3$  *tpy* или *Cl-tpy* (4'-хлоро-2,2':6',2"-терпиридин), *X* је *Cl* или *dmsO-S*, *N-N* је бидентатни хелатни лиганд који има способност водоничног везивања са нуклеобазама (*N-N* = *en* или *dach*), *Y* је *Cl*,  $\text{PF}_6$  или  $\text{CF}_3\text{SO}_3$ , *n* = 1 или 2 у зависности од природе лиганда *X* (Слика 3.1). Бидентатни хелатни лиганди, *en* и *dach*, изабрани су ради побољшања растворљивости њихових комплекса у води, као и због њихове способности за формирањем водоничних веза са координованим нуклеобазама. Ова последња особина појавила се као предуслов за посматрање антитуморске активности код монофункционалних „half sandwich” рутенијум(II) комплекса. Ради поређења направљен је и одговарајући *Ru(Cl-tpy)* комплекс са *N-N* = *bpy* (Слика 3.1). Фокусирали смо се углавном на *Cl-tpy* деривате, због присуства *Cl* који може учествовати у формирању додатних водоничних веза, као што су  $\text{O-H}\cdots\text{Cl}$ ,  $\text{N-H}\cdots\text{Cl}$ ,  $\text{C-H}\cdots\text{Cl}$ , затим са протеинима и ДНК.<sup>110</sup>



Слика 3.1. Шематски приказ рутенијум(II) терпиридин комплекса 1-10. Нумеричка шема лиганада *tru* и *bpu* која је коришћена за NMR карактеризацију

### 3.1.1. Синтеза и карактеризација рутенијум(II) терпиридин комплекса

Катјонски рутенијум(II) комплекси  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}][\text{Cl}]$  [ $\text{N-N} = \text{en}$  (**1**), *dach* (**2**) и *bpu* (**3**)] и  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{N-N})\text{Cl}][\text{Cl}]$  [ $\text{N-N} = \text{en}$  (**4**) и *dach* (**5**)] су синтетизовани у веома добрим приносима полазећи од неутралног рутенијум(III) прекурсора *mer*- $[\text{Ru}(\text{L}_3)\text{Cl}_3]$  [ $\text{L}_3 = \text{Cl-tpy}$  (**P1**) или *tpy* (**P2**)] у реакцијама са неутралним *N-N* хелатним лигандом, као што су *en*, *dach* или *bpu*, у присуству  $\text{Et}_3\text{N}$  као редукционог средства и вишка  $\text{LiCl}$ , који је потребан како би се спречила дисоцијација  $\text{Cl}^-$  из финалног производа као и због њиховог таложења (Шема 3.1). Одговарајуће  $\text{PF}_6^-$  соли су добијене из етанолних раствора  $\text{Cl}^-$  соли додавањем  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  у вишку. Синтеза одговарајућих дикатјонских деривата *mer*- $[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{N-N})(\text{dmsO-S})][\text{Y}]_2$  (**6-10**,  $\text{Y} = \text{PF}_6$  или  $\text{CF}_3\text{SO}_3$ ), у којима је  $\text{Cl}$  лиганд замењен молекулом *dmsO*, изведена је помоћу две алтернативне методе (Шема 3.1): једна је измена  $\text{Cl}/\text{dmsO}$  из одговарајућих хлоридо деривата (уз помоћ  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$ ), а друга метода је деловање прекурсора **P3** или **P4** са *N-N* бидентатним лигандом у присуству  $\text{NH}_4\text{PF}_6$ . Пронашли смо да изоловање производа у чистом облику помоћу друге методе често захтева пречишћавање што доводи до смањења приноса.



Шема 3.1. Пuteви за синтезу комплекса 1-10<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Реагенси и услови: (а) Cl-тпу или тпу (0,9 eq), EtOH, рефлуковање; (б) N-N (1,2 eq; N-N = en, dach или bpy), етанол/вода (3:1), Et<sub>3</sub>N (3,0 eq), LiCl (10,0 eq), рефлуковање; (ц) DMSO (35 eq), AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> (2,1 eq), MeOH, рефлуковање; (д) Cl-тпу или тпу (1,1eq), CH<sub>3</sub>Cl; (е) N-N (1,2 eq; N-N = en, dach или bpy), CHCl<sub>3</sub>/EtOH (2:3), рефлуковање; (ф) вишак NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>

Сви комплекси су карактерисани помоћу 1D (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C) или 2D (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC и <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBSC) NMR и IR спектроскопије, UV-Vis спектрофотометрије и елементалне анализе.

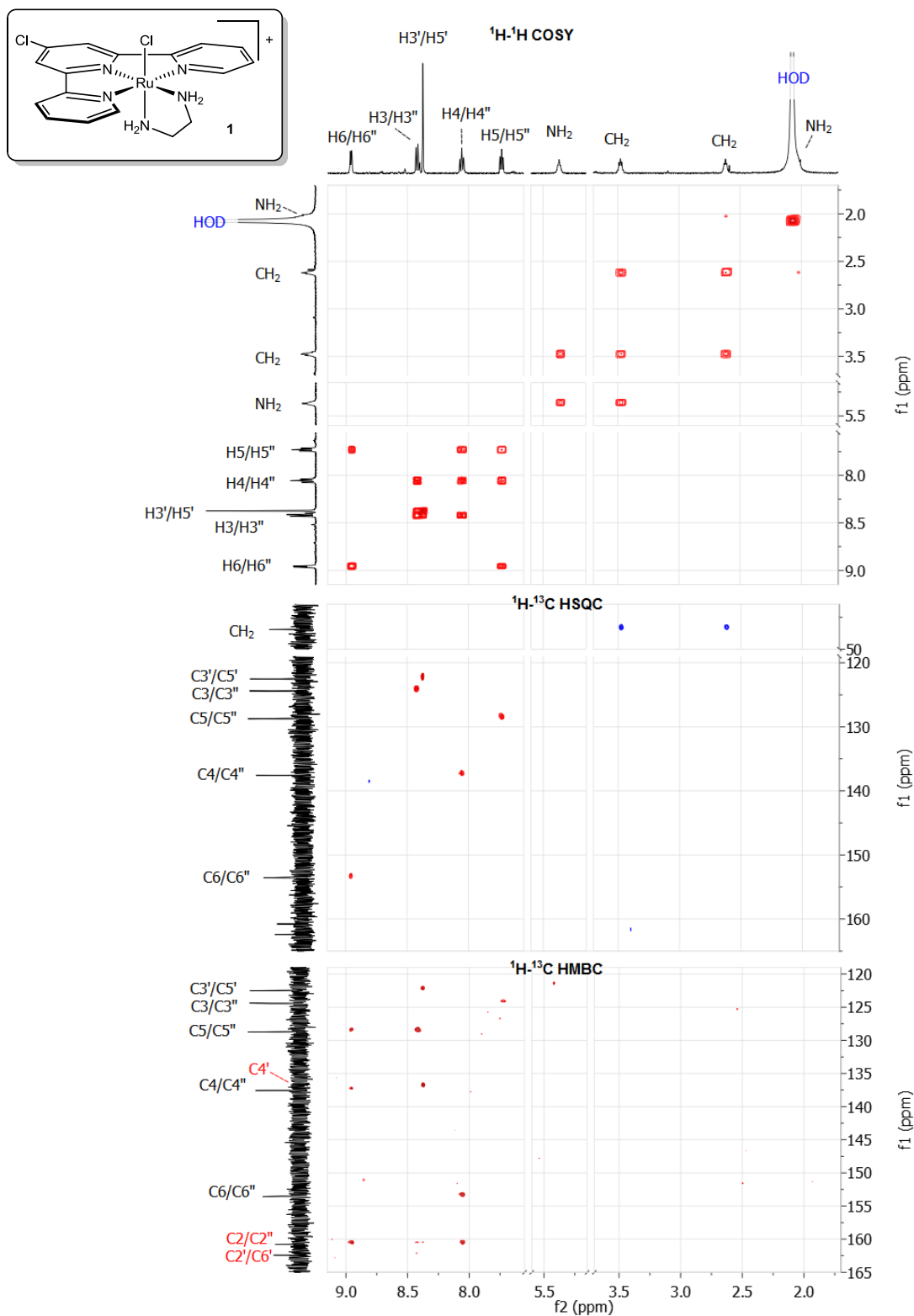
<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектри [Ru(Cl-тпу)(en)Cl][Cl] комплекса (1) у CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> су у складу са C<sub>s</sub> симетријом у раствору због конформацијске мобилности етилендиаминa. На <sup>1</sup>H NMR спектру могу се уочити пет сигнала у ароматичној области који одговарају једнаким половинама Cl-тпу лиганда и три мултиплета која се приписују en. Четврти мултиплет који потиче од en и који је преклопљен са широким сигналом HOD, може се уочити у <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY NMR спектру. Овај сигнал је приписан NH<sub>2</sub> протонима који су под заштитним утицајем суседног Cl-тпу лиганда (Слика 3.2). <sup>13</sup>C NMR спектар показује осам сигнала у области нижег поља који су додељени ароматичним угљениковим атомима и два, делимично преклопљена, у области вишег поља, приписана угљениковим атомима из en.

Утврђивање кватернерних угљеникових атома (C2'/C6', C2/C2'' и C4') је постигнуто помоћу 2D хетеронуклеарног  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBSC NMR експеримента (Слика 3.2).

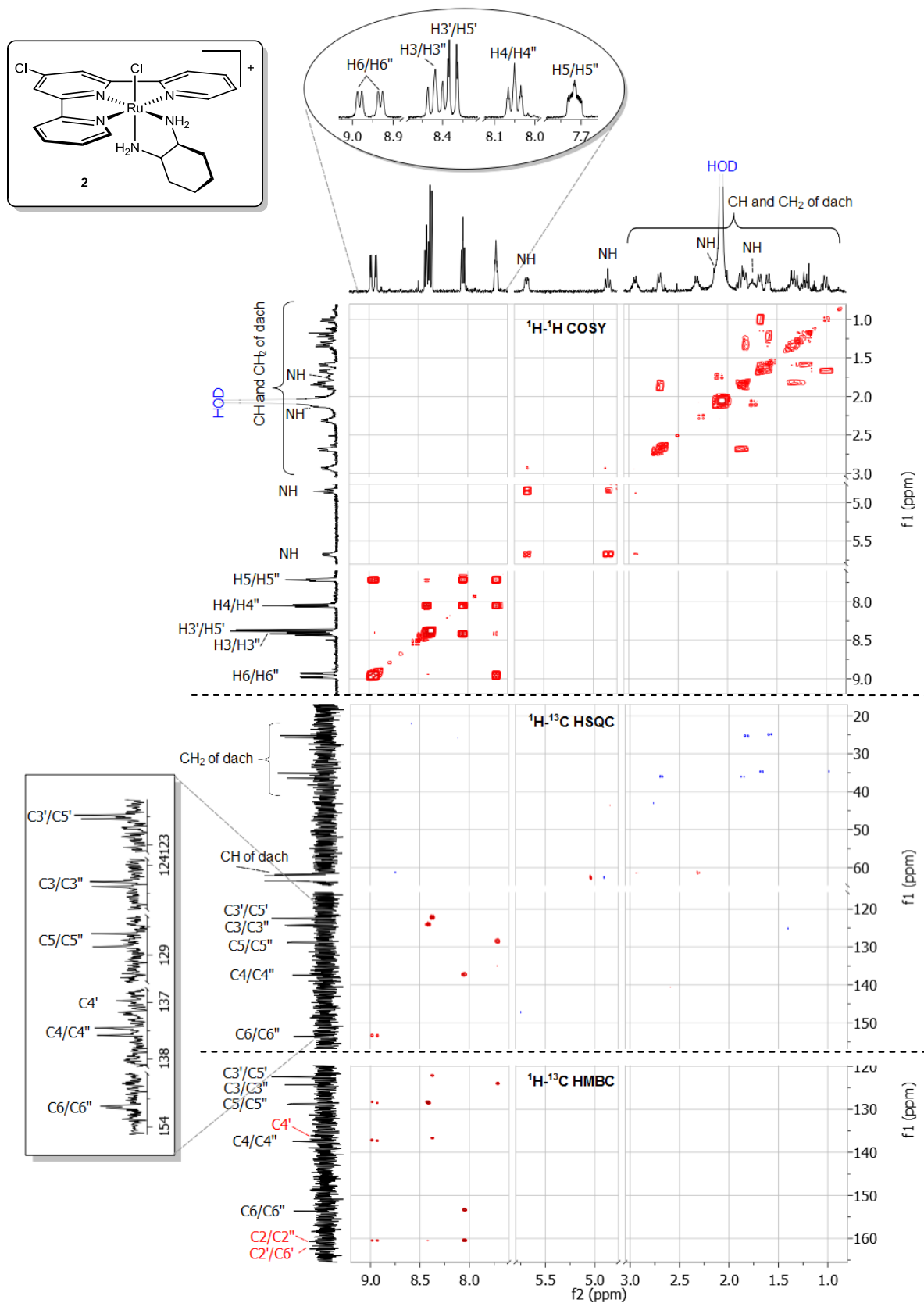
$^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектри  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  комплекса (**2**) у  $\text{CD}_3\text{NO}_2$  су компликованији у односу на одговарајуће NMR спектре комплекса **1**, због конформационе крутости координованог dach лиганда, која доводи до губитка симетричности Cl-tpy лиганда. Тако да, на  $^1\text{H}$  NMR спектру, сигнали који потичу од протона две сада неједнаке половине Cl-tpy лиганда су делимично преклопљени осим за H6/H6'' (два дублета на  $\delta = 8,98$  и  $8,93$  ppm) и H3'/H5' (два дублета на  $\delta = 8,39$  и  $8,36$  ppm), који су јасно раздвојени (Слика 3.3). На  $^{13}\text{C}$  NMR спектру можемо уочити за сваки угљеников атом Cl-tpy и dach јасно раздвојен сигнал (Слика 3.3).

$^1\text{H}$  NMR спектар  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$  комплекса (**3**) у  $\text{D}_2\text{O}$  (за разлику од комплекса **1** и **2**, довољно стабилан) је у складу са симетријом комплекса: пет сигнала приписано симетричном Cl-tpy лиганду и осам мултиплета који потичу од нееквивалентних половина bpy лиганда (Слика 3.4). Треба напоменути да сваки пик који потиче од протона аксијалног прстена bpy лиганда је значајно померен ка нижим вредностима хемијског померања у односу на пикове одговарајућих протона другог прстена (нпр.  $\delta = 6,95$  ppm за H<sub>i</sub>, а  $\delta = 7,99$  ppm за H<sub>b</sub>) због заштитног ефекта Cl-tpy. Сходно томе, протони терминалних ароматичних прстенова Cl-tpy су под утицајем bpy, тако да су и њихови сигнали значајно померени ка вишем пољу, а нарочито сигнал H6/H6'' протона који се налази на  $\delta = 7,79$  ppm, што је за око 1 ppm више него код комплекса **1** и **2**.

$^1\text{H}$  (Слика 3.5) и  $^{13}\text{C}$  NMR спектри  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**4**) и  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  комплекса (**5**) у  $\text{CD}_3\text{NO}_2$  су веома слични спектрима комплекса **1** и **2**, са очекиваним разликама због присуства протона на позицији 4' уместо хлора.



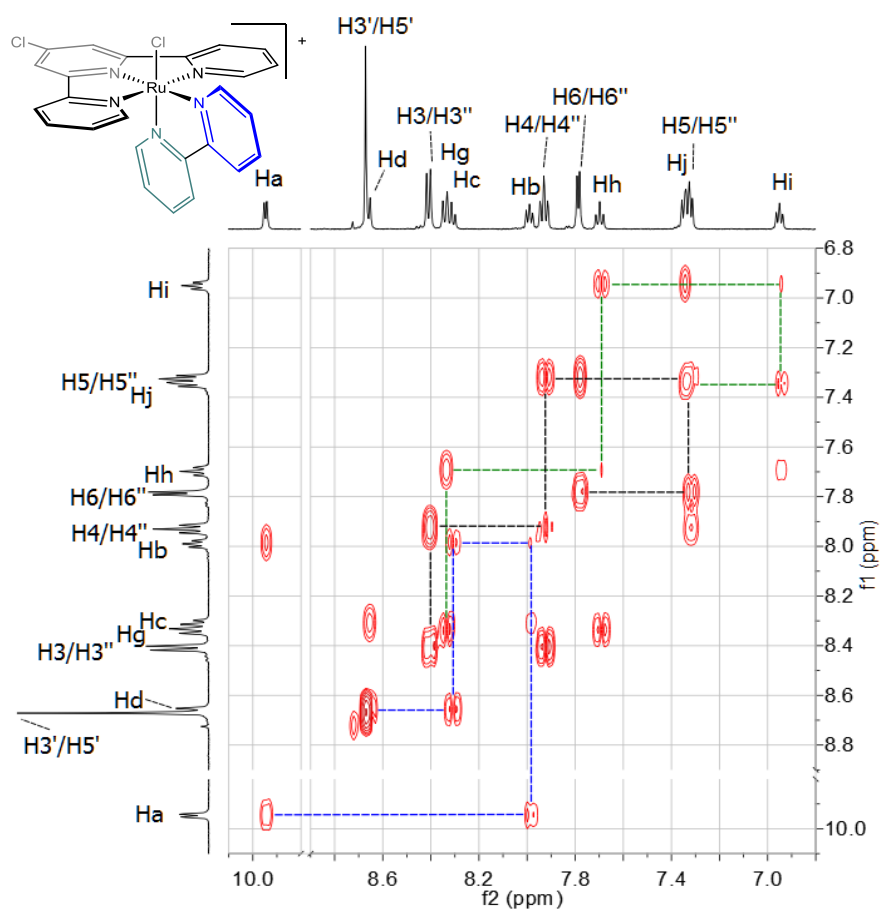
Слика 3.2. Дводимензионални хомонуклеарни  $^1H-^1H$  COSY и хетеронуклеарни  $^1H-^{13}C$  HSQC (црвени cross-пикови = CH, плави cross-пикови = CH<sub>2</sub>) и  $^1H-^{13}C$  HMBC NMR спектри  $[Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl]$  комплекса (**1**) у  $CD_3NO_2$  на 298 K



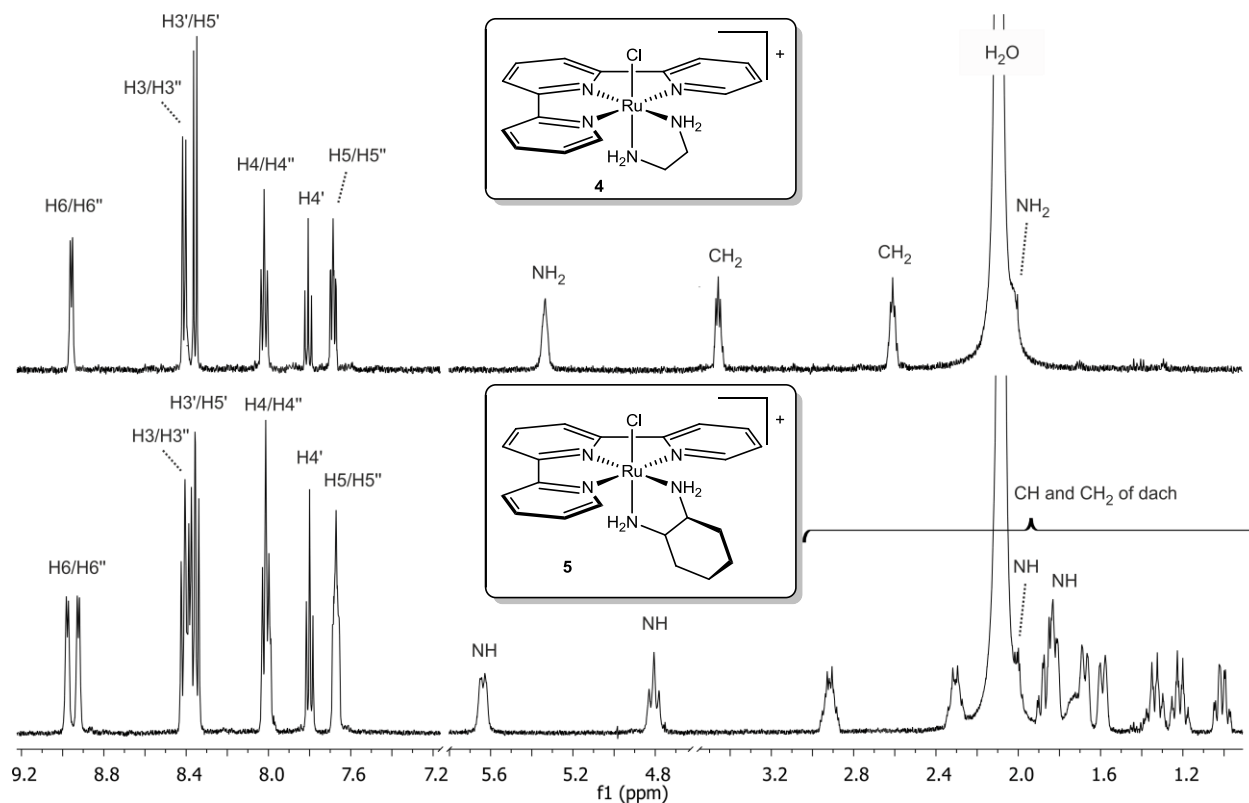
Слика 3.3. Дводимензионални хомонуклеарни  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY и хетеронуклеарни  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC



(црвени cross-пикови = CH, плави cross-пикови = CH<sub>2</sub>) и <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR спектри [Ru(Cl-try)(dach)Cl][Cl] комплекса (2) у CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> на 298 K. Уметнути график: Увећане области 1D спектра

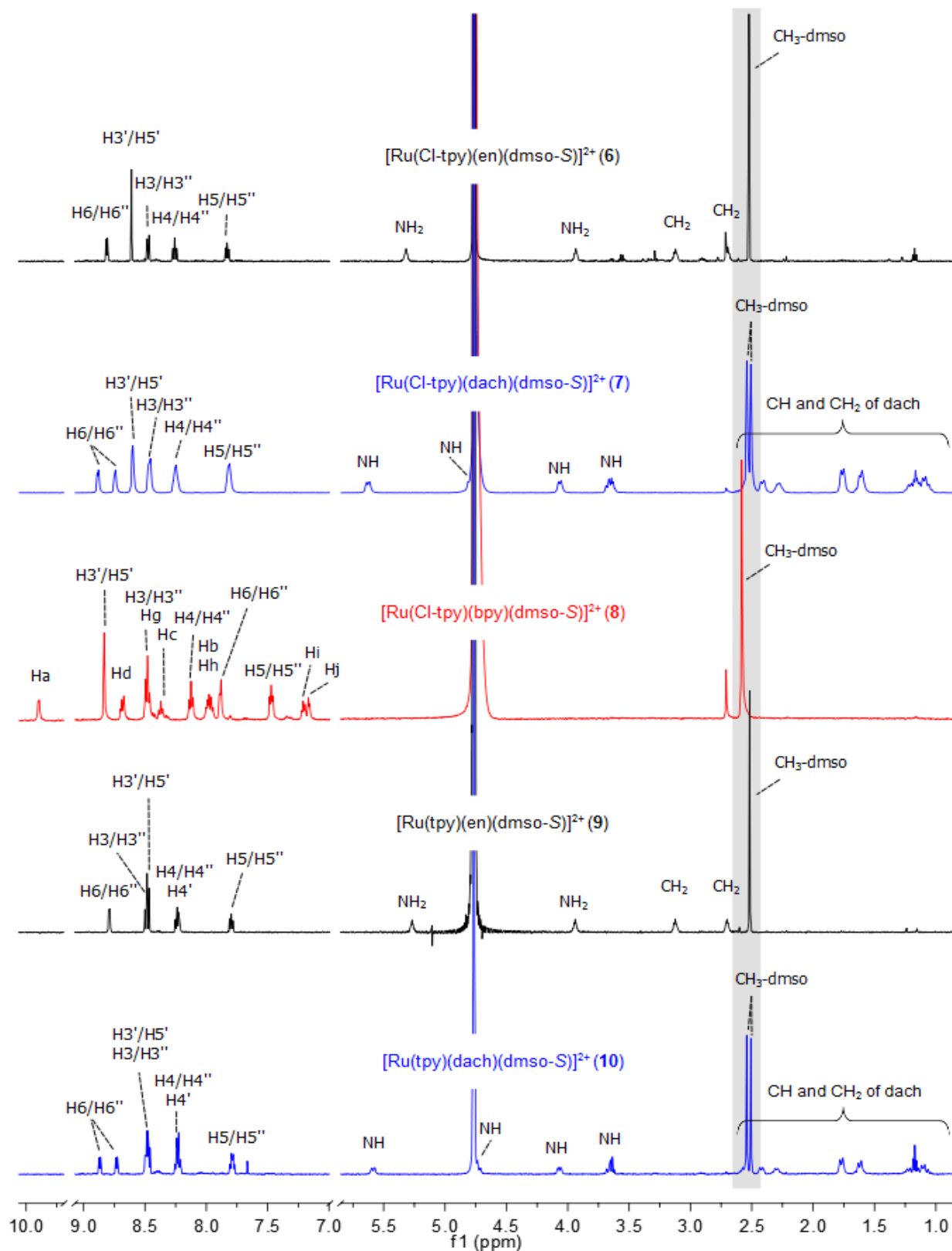


Слика 3.4. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY NMR спектар комплекса 3<sub>Cl</sub> у D<sub>2</sub>O на 298 K



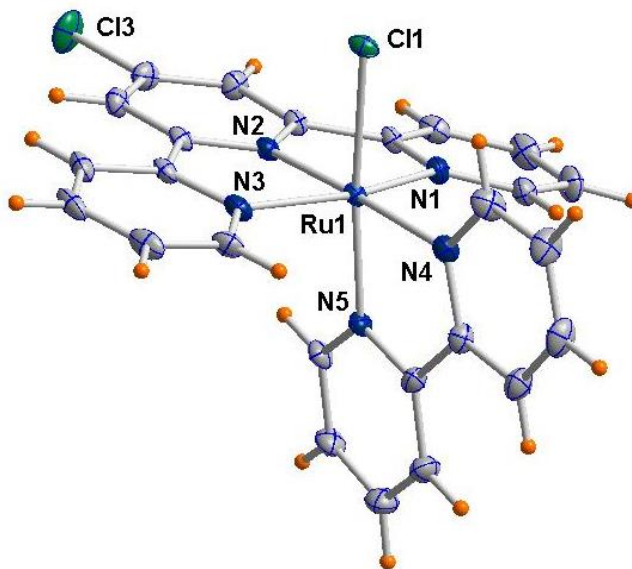
Слика 3.5.  $^1\text{H}$  NMR спектар  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**4**) и  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**5**) комплекса у  $\text{CD}_3\text{NO}_2$  на 298 K

$^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектри комплекса **6–10** у  $\text{D}_2\text{O}$  или деутерисаном ацетону су веома слични спектрима одговарајућих хлоридо деривата, са јасним присуством сигнала који потиче од *dms*-*S*: синглет за комплексе **6**, **8** и **9** и два синглета једнаких интензитета која потичу од дијастереоизомernih метил група у мање симетричним *dach* комплексама **7** и **10** (Слика 3.6). У свим комплексима сигнал који одговара *dms*-*S* је значајно померен ка нижим вредностима хемијског померања ( $\delta = 2,50\text{--}2,55$  ppm) у односу на типично хемијско померање ( $\delta = 3,00\text{--}4,00$  ppm) због тога што су метил групе под заштитним утицајем ароматичних прстенова *tpy*. Интересантно је да измена *Cl* са *dms*-*S* изазива значајно померање аксијалних  $\text{NH}_2$  протона *en* и *dach* ка нижем пољу ( $\Delta\delta = 1,30$ ).

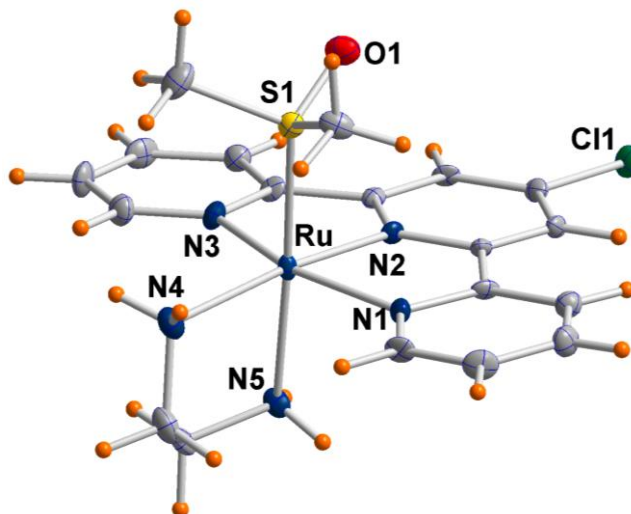


Слика 3.6.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $\text{dmsO}$  деривата 6 – 10 у  $\text{D}_2\text{O}$  на 298 K

Молекулске структуре катјонског  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**3<sub>Cl</sub>**) (Слика 3.7) и дикатјонских комплекса  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{dmsO-S})][\text{Y}]_2$  ( $\text{Y} = \text{PF}_6$  (**6<sub>PF6</sub>**), Слика 3.8;  $\text{Y} = \text{CF}_3\text{SO}_3$  (**6<sub>OTf</sub>**), Слика 3.9) и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(\text{dmsO-S})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (**8<sub>OTf</sub>**, Слика 3.10) су одређене у чврстом стању помоћу рендгенске структурне анализе. Такође, одређена је и структура комплекса  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{dmsO-S})][\text{PF}_6]_2$  (**10<sub>PF6</sub>**) (Слика 3.11), али због лошег квалитета кристала, нису дати кристалографски подаци за ову анализу.



**Слика 3.7.** Молекулска структура (ORTEP view, елипсоиди са 50% степеном вероватноће) за један од два независна катјонска комплекса  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**3<sub>Cl</sub>**) са ознакама за хетероатом. Изабране дужине веза (Å) и углови (°): Приказан молекул:  $\text{Ru}(1)\text{--N}(1)$  2,067(3),  $\text{Ru}(1)\text{--N}(2)$  1,953(3),  $\text{Ru}(1)\text{--N}(3)$  2,064(3),  $\text{Ru}(1)\text{--N}(4)$  2,079(3),  $\text{Ru}(1)\text{--N}(5)$  2,032(3),  $\text{Ru}(1)\text{--Cl}(1)$  2,4205(9),  $\text{N}(3)\text{--Ru}(1)\text{--N}(1)$  158,84(12),  $\text{N}(2)\text{--Ru}(1)\text{--N}(4)$  177,28(12),  $\text{N}(5)\text{--Ru}(1)\text{--Cl}(1)$  172,05(9). Неприказан молекул:  $\text{Ru}(2)\text{--N}(6)$  2,072(3),  $\text{Ru}(2)\text{--N}(7)$  1,961(3),  $\text{Ru}(2)\text{--N}(8)$  2,065(3),  $\text{Ru}(2)\text{--N}(9)$  2,084(3),  $\text{Ru}(2)\text{--N}(10)$  2,031(3),  $\text{Ru}(2)\text{--Cl}(2)$  2,4162(9),  $\text{N}(8)\text{--Ru}(2)\text{--N}(6)$  158,89(12),  $\text{N}(7)\text{--Ru}(2)\text{--N}(9)$  176,53(12),  $\text{N}(10)\text{--Ru}(2)\text{--Cl}(2)$  172,09(9)

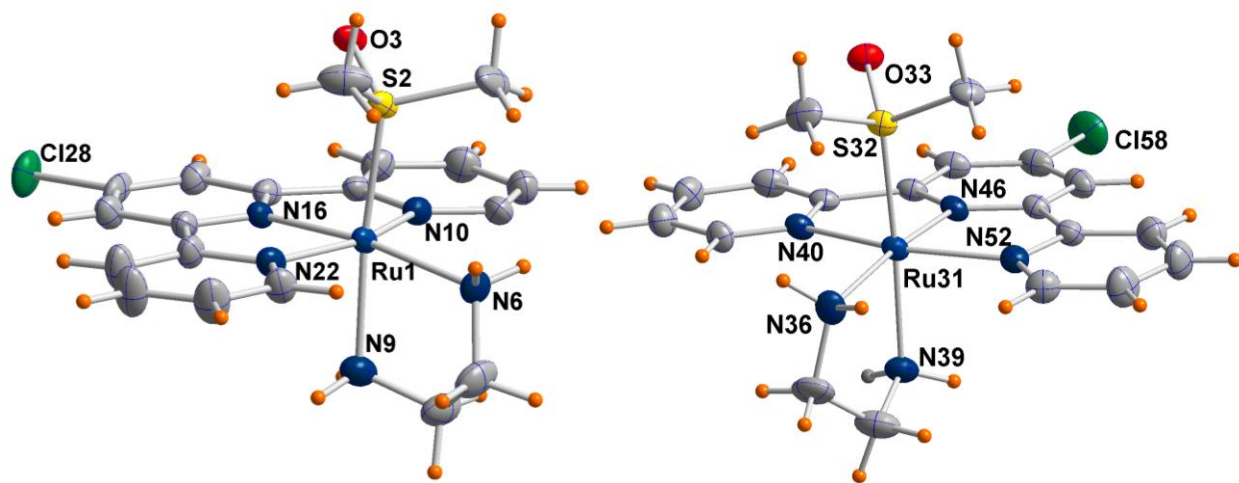


**Слика 3.8.** Молекулска структура (ORTEP view, елипсоиди са 50% степеном вероватноће) за катјон комплекса  $[Ru(Cl-tpy)(en)(dmsO-S)][PF_6]_2$  (**6PF6**) са ознакама за хетероатом. Изабране дужине веза (Å) и углови (°):  $Ru-N(1)$  2,087(3),  $Ru-N(2)$  1,967(3),  $Ru-N(3)$  2,092(3),  $Ru-N(4)$  2,162(4),  $Ru-N(5)$  2,146(3),  $Ru-S(1)$  2,2453(11),  $N(1)-Ru-N(3)$  159,17(15),  $N(2)-Ru-N(4)$  171,94(13),  $N(5)-Ru-S(1)$  177,30(9)

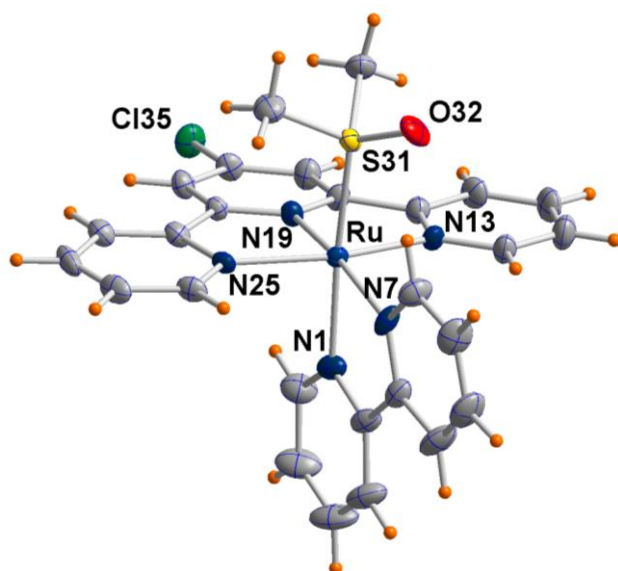
Резултати рендгенске структурне анализе су показали да комплекси имају типичну издужену октаедарску структуру, који садрже тридентатни Cl-tpy или tpy лиганд у очекиваном меридијалном положају, N-N бидентатни хелатни лиганд и шесто место окупирано је јоном хлора (у комплексу **3Cl**) или молекулом dmsO-S координованог преко сумпора (у комплексима **6**, **8** и **10**). Асиметрична јединица комплекса **3Cl** се састоји из два кристалографски независна комплексна молекула који имају приближно упоредиве геометрије. Два кристалографски независна комплексна молекула који се незнатно разликују у оријентацији молекула dmsO у односу на екваторијалну раван tpy, такође су пронађени у асиметричној јединици комплекса **6OTf** (Слика 3.9).

Комплексни катјони **3Cl** и **8OTf** показују упоредиве структурне карактеристике са централним азотовим атомом tpy који има најкраће Ru-N растојање (средња вредност 1,96 Å), што је и очекивано због геометријских ограничења тридентатног лиганда. Насупрот томе, Ru-N(Cl-tpy) растојање у *trans* положају износи 2,071 Å. На дужину веза пиридилских прстенова bpy лиганда утиче природа монодентатног лиганда. Дужина везе Ru-N(bpy) *trans* у односу на Cl<sup>-</sup> (2,031(3) Å) је знатно краћа од дужине везе Ru-N(bpy) *trans*

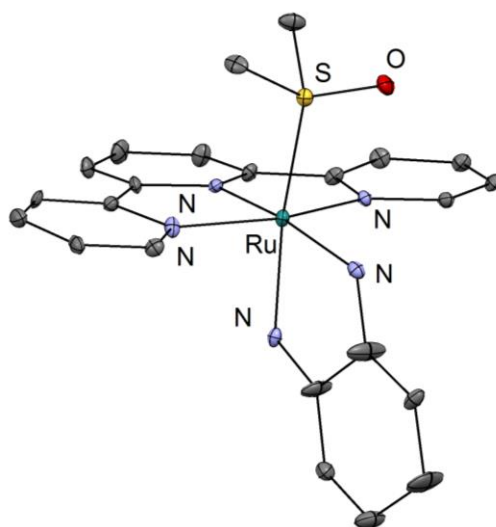
у односу на *dmsO-S* (2,097(7) Å). Исти ефекат се манифестује и код екваторијалне Ru-N(bpy) везе: 2,126(6) Å у **8<sub>OTf</sub>** и 2,082(3) Å средња вредност у **3<sub>Cl</sub>**. Равни које чине хелатни лиганди Cl-tpy и bpy су скоро ортогоналне, формирајући диҳедралне углове 81,12(5)° и 84,15(5)° у два **3<sub>Cl</sub>** комплекса и 86,40(1)° у комплексу **8<sub>OTf</sub>**. Структурне карактеристике **3<sub>Cl</sub>** и **8<sub>OTf</sub>** комплекса су сличне карактеристикама које су пронађене за одговарајуће tpy деривате [Ru(tpy)(bpy)Cl][PF<sub>6</sub>] и [Ru(tpy)(bpy)(*dmsO-S*)] [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub>.<sup>120-125</sup>



**Слика 3.9.** Молекулске структуре (ORTEP view, елипсоиди са 50% степеном вероватноће) за два кристалографски независна катјона у асиметричној јединици [Ru(Cl-tpy)(en)(*dmsO-S*)] [OTf]<sub>2</sub> (**6<sub>OTf</sub>**) са ознакама за хетероатом. Изабране дужине веза (Å) и углови (°): Леви молекул: Ru(1)–N(10) 2,101(4), Ru(1)–N(16) 1,975(4), Ru(1)–N(22) 2,089(4), Ru(1)–N(6) 2,148(4), Ru(1)–N(9) 2,129(4), Ru(1)–S(2) 2,241(1), N(22)–Ru(1)–N(10) 158,81(17), N(16)–Ru(1)–N(6) 171,17(16), N(9)–Ru(1)–S(2) 174,58(14). Десни молекул: Ru(31)–N(40) 2,078(4), Ru(31)–N(46) 1,963(4), Ru(31)–N(52) 2,086(4), Ru(31)–N(36) 2,143(4), Ru(31)–N(39) 2,125(4), Ru(31)–S(32) 2,238(1), N(40)–Ru(31)–N(52) 158,65(17), N(36)–Ru(31)–N(46) 172,10(16), N(39)–Ru(31)–S(32) 175,87(13)



**Слика 3.10.** Молекулска структура (ORTEP view, елипсоиди са 50% степеном вероватноће) за катјон комплекса  $[Ru(Cl-try)(bpy)(dmsO-S)][CF_3SO_3]_2$  (**8OTf**) са ознакама за хетероатом. Изабране дужине веза (Å) и углови (°):  $Ru-N(13)$  2,083(7),  $Ru-N(19)$  1,971(7),  $Ru-N(25)$  2,078(7),  $Ru-N(1)$  2,097(7),  $Ru-N(7)$  2,126(6),  $Ru-S(31)$  2,268(2),  $N(13)-Ru(1)-N(25)$  158,9(3),  $N(7)-Ru(1)-N(19)$  170,1(3),  $N(1)-Ru(1)-S(31)$  175,2(2)



**Слика 3.11.** Молекулска структура комплекса  $[Ru(try)(dach)(dmsO-S)][PF_6]_2$  (**10PF6**) добијена за кристал недовољно доброг квалитета

Комплекси **6PF<sub>6</sub>** и **6OTf** имају слично координационо окружење са дужинама веза Ru-N(Cl-тру) које се могу поредити са дужинама код бру комплекса **8OTf**. Мало дужа Ru-N растојања, типична за Ru-N<sub>sp<sup>3</sup></sub> везе, су примећена код ен лиганда: 2,162(4) и 2,146(3) Å у комплексу **6PF<sub>6</sub>** и у области од 2,125(4) до 2,148(4) Å за два независна катјона комплекса **6OTf**, са најкраћим вредностима за оне који се налазе *trans* у односу на dmsO-S. Растојања Ru-S су већа у комплексу **8OTf** у односу на комплекс **6** (нпр. 2,268(2) Å у **8OTf**, а 2,241(1)/2,238(1) Å у **6OTf**). Ово је у сагласности са чињеницом да је dmsO-S слаб π акцептор, као и да је ен бољи σ дозор у односу на бру (који је такође и π акцептор).

Карактеризација нових рутенијум(II) терпиридин комплекса је вршена и помоћу IR спектроскопије. IR спектри свих комплекса показују типичне траке које потичу од терпиридина, при чему је карактеристична јака трака у области од 1594-1616 cm<sup>-1</sup>, која одговара симетричној вибрацији C=N везе.<sup>120-122</sup> Дикатјонски комплекси (**6-10**) показују траке у области од 1106 до 1071 cm<sup>-1</sup>, које потичу од валенционих вибрација S=O везе dmsO-S, као и у области од 430 до 419 cm<sup>-1</sup>, које потичу од вибрација Ru-S<sub>dmsO</sub>.<sup>108,123-125</sup> Присуство CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> као контра јона је потврђено помоћу два јака сигнала на 1250 и 1025 cm<sup>-1</sup> од SO<sub>3</sub>, и два сигнала на 1223 и 1163-1145 cm<sup>-1</sup> од CF<sub>3</sub>. Присуство контра јона PF<sub>6</sub><sup>-</sup> је потврђено јаким сигнаlima на 844-833 cm<sup>-1</sup> и на 558 cm<sup>-1</sup>.<sup>79,126</sup>

Електронски апсорбциони спектри нових рутенијум(II) комплекса имају неколико интензивних апсорбционих максимума у ултраљубичастој области (200 < λ < 330 nm), који припадају π → π\* прелазима лиганда. Такође, постоје и широки интензивни апсорбциони максимума у видљивој области, који припадају метал-лиганд dπ(Ru) → π\*(полипиридил) прелазима. Апсорбциони максимума последњих прелаза су под снажним утицајем наелектрисања: замена Cl<sup>-</sup> са молекулом dmsO изазива померање са око 500 nm у комплексима **1-5** на око 420 nm у комплексима **6-10**.<sup>108,124,125</sup>

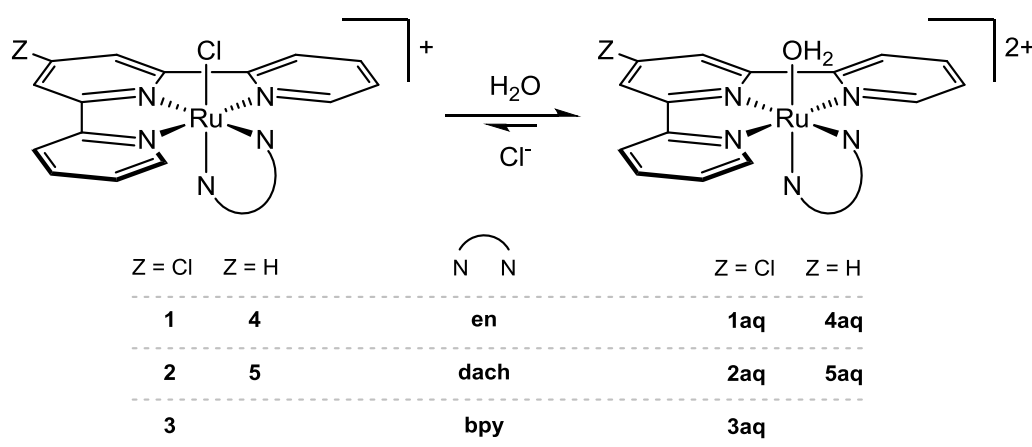
### 3.1.2. Хемијско понашање у воденом раствору

Супротно ономе што је предходно примећено код већине рутенијум терпиридин комплекса, наши нови комплекси се добро растварају у води (посебно соли хлорида, > 25 mg/ml) изузев дикатјонског бру комплекса **8** (и у облику OTf и у облику PF<sub>6</sub><sup>-</sup> соли) који има ограничену растворљивост (5 mg/ml).



### 3.1.2.1. NMR испитивања

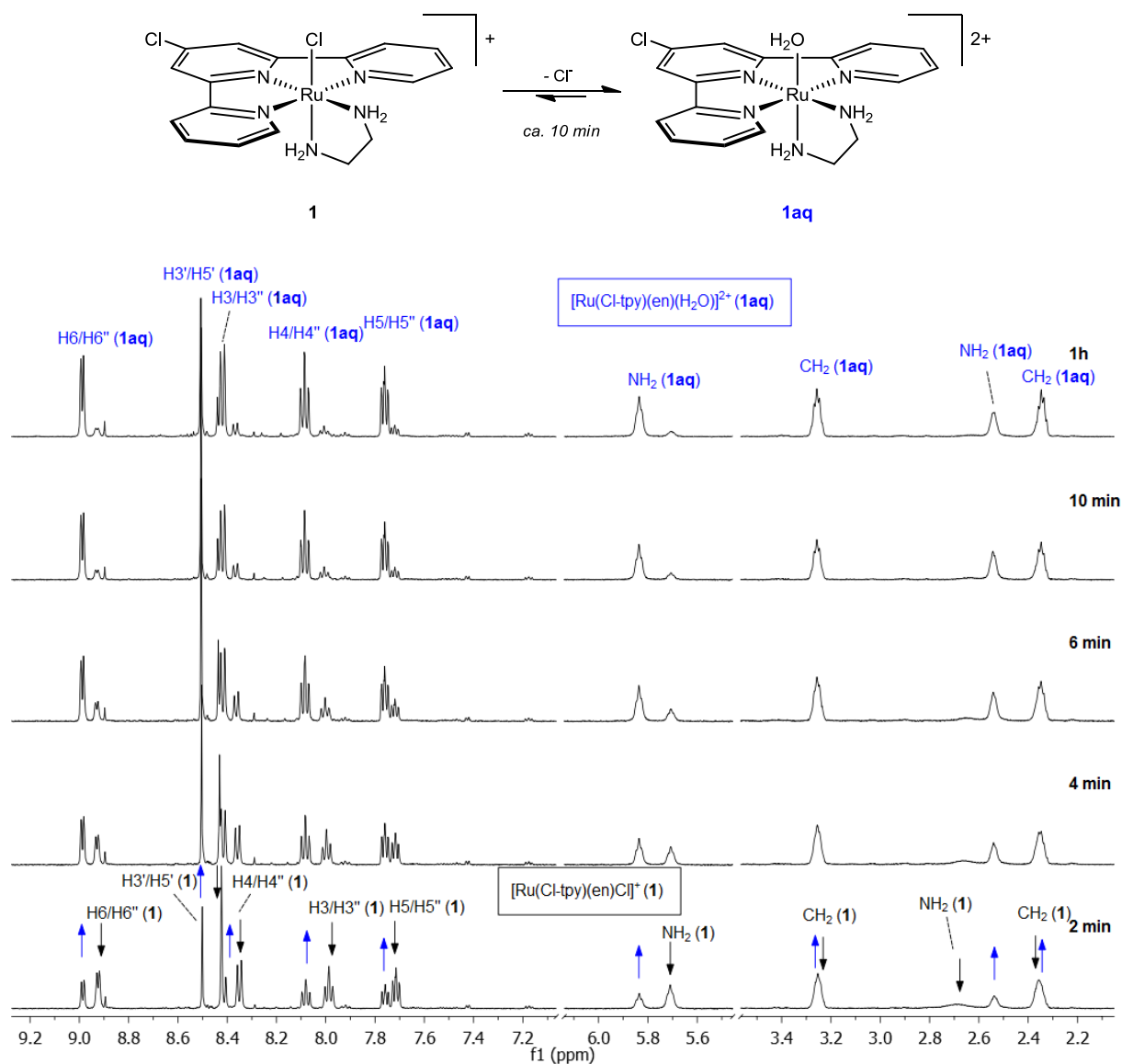
Хидролиза нових комплекса у воденом раствору, која је веома битна за потенцијалну антитуморску активност, прво је проучавана квалитативно помоћу NMR спектроскопије. Показало се да је хлоридо лиганд у катјонским комплексима **1** и **2** веома лабилан у воденом раствору. Одмах након растварања у D<sub>2</sub>O, у <sup>1</sup>H NMR спектру примећен је нов сет сигнала у ароматичној области, који потичу од тпу лиганда, као и у области вишег поља који потичу од en и dach лиганда. Ови нови сигнали приписани су аква комплексима [Ru(Cl-tpy)(en)(OH<sub>2</sub>)]<sup>2+</sup> (**1aq**) и [Ru(Cl-tpy)(dach)(OH<sub>2</sub>)]<sup>2+</sup> (**2aq**) (Шема 3.2).



Шема 3.2. Хидролиза комплекса **1** – **5** у воденом раствору

На основу интеграљења NMR спектра, можемо видети да, већ након 2 минута од растварања, 40% комплекса **1** је прешло у аква комплекс **1aq**. Равнотежа се постуже у току 1 сата у односу 1:9 између **1** и **1aq** (Слика 3.12). Додавање великог вишка NaCl (1,00 М) у овај раствор проузрокује брзо померање равнотеже ка првобитном хлоридо комплексу **1** и његово делимично таложење (у облик Cl<sup>-</sup> соли). Хемијско понашање у воденом раствору dach комплекса **2**, као и одговарајућих тпу комплекса **4** и **5**, је слично понашању као што је већ описано за комплекс **1**.

Насупрот томе, бру комплекс **3** ослобађа Cl лиганд знатно спорије у односу на предходна два комплекса, формирајући аква врсту [Ru(Cl-tpy)(bpy)(OH<sub>2</sub>)]<sup>2+</sup> (**3aq**). Равнотежа се постиже након 8 сати од растварања. Додавање великог вишка NaCl у овај раствор проузрокује брзо таложење хлоридо деривата **3**.



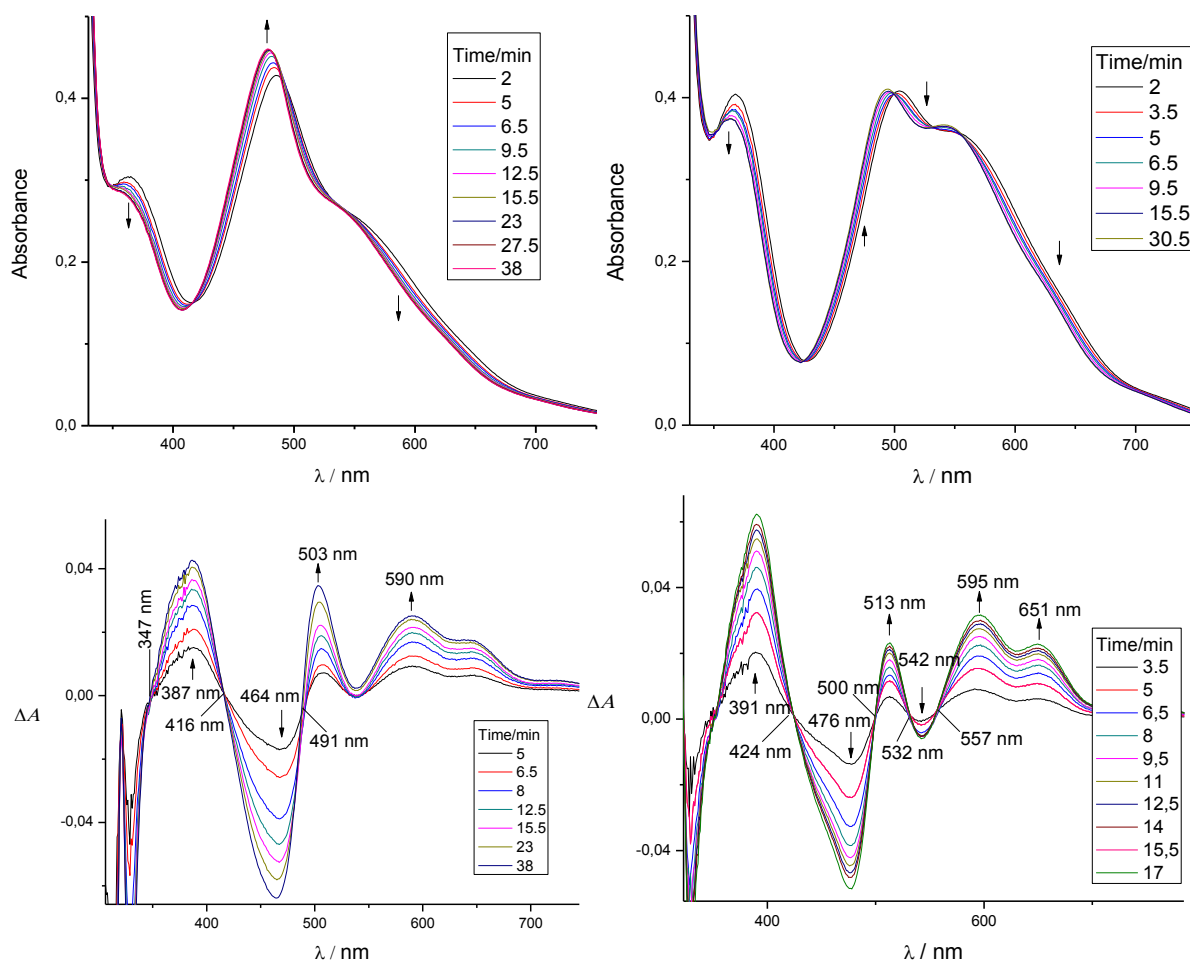
Слика 3.12.  $^1\text{H}$  NMR спектар  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  комплекса (**1**) након растварања у  $\text{D}_2\text{O}$  при различитим временским интервалима на собној температури

Већа лабилност  $\text{Cl}^-$  лиганда у комплексима **1** и **2** се приписује јачем *trans* утицају  $\sigma$ -донорских лиганата, ен и *dach*, у односу на  $\pi$ -акцепторски лиганд, бру, у комплексу **3**.

Супротно резултатима добијеним за хлоридо деривате, дикатјонски *dms*о деривати **6-10**, су веома стабилни у воденом раствору. Њихови  $^1\text{H}$  NMR спектри остају непромењени неколико сати након растварања и није примећено ослобађање *dms*о лиганда. Овај закључак је у складу са јаком Ru-S везом због присуства јаких  $\sigma$ -донорских лиганата, ен и *dach*, који се налазе у *trans* положају у односу на *dms*о.

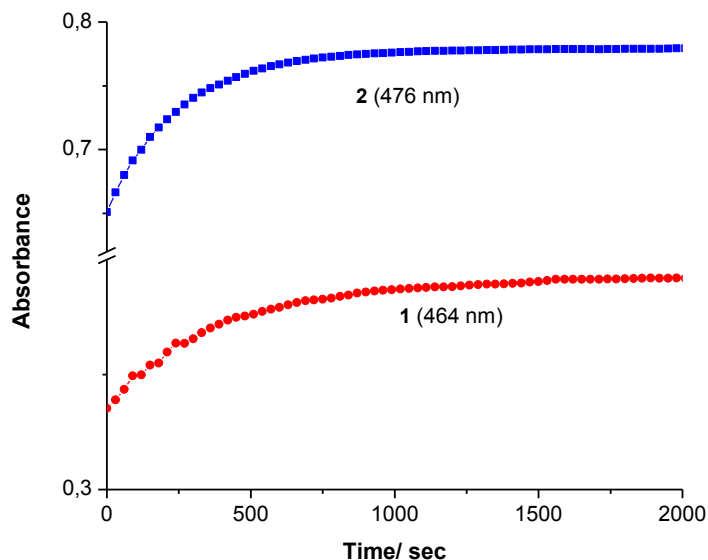
### 3.1.2.2. Кинетичка испитивања реакције хидролизе

Кинетика реакције хидролизе комплекса **1** и **2** је квантитативно проучавана помоћу UV-Vis спектрофотометрије на 298 К у 0,1 М растворима. На основу NMR резултата, за комплексе **4** и **5** се очекује да имају сличне константе брзина реакције хидролизе, док врзу комплекс **3** хидролизује доста спорије. Брзо померање равнотеже ка хлоридо врсти и делимично таложење комплекса након додавања NaCl недозвољава кинетичка испитивања реакције аниције, а самим тим и израчунавање константе равнотеже  $K_{aq}$ .



**Слика 3.13.** Промена апсорбанце са временом за реакцију хидролизе комплекса  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**1**, лева страна) и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**2**, десна страна) у  $\text{H}_2\text{O}$  на 298 К. ( $\Delta A = A_t - A_0$ , где је  $A_t$  = апсорбанца након времена  $t$  и  $A_0$  = апсорбанца након времена које је потребно за снимање првог спектра)

На основу UV-Vis спектра оба комплекса, можемо видети промене апсорбанце са временом у области од 200 до 800 nm са јасним изобестичким тачкама, које у сагласности са NMR резултатима, указују на то да се реакција хидролизе одвија у једном ступњу формирајући одговарајуће аква комплексе, **1aq** и **2aq**. Као радна таласна дужина узета је она таласна дужина на којој је највећа промена у апсорбцији раствора са временом (464 nm за **1** и 476 nm за **2**) (Слика 3.13). Добијена промена апсорбанце је показала најбоље слагање када је посматрана као експоненцијална функција првог реда помоћу компјутерског програма Origin 8 (Слика 3.14). На тај начин, за оба изучавана система добијене су вредности константи брзина реакције хидролизе,  $k_{H_2O}$ , које су дате у Табели 3.1. Комплекс **1** (en) хидролизује око 1,5 пута спорије у односу на *dach* комплекс **2**. Слични резултати су добијени када је реакција хидролизе извођена у раствору пуфера (25 mM Нерес пуфер; pH = 7,4; Табела 3.1 и Слика 3.14). Важно је напоменути да су брзине реакције хидролизе за комплексе **1** и **2** мало веће у односу на антиканцерогене органометалне комплексе  $[Ru(\eta^6\text{-арена})(en)Cl][PF_6]$  ( $1,23 - 2,26 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )<sup>63</sup>, и за око 2 реда величине веће у односу на цисплатину ( $6,32 \times 10^{-5}$  и  $2,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  за први и други ступањ реакције хидролизе)<sup>127</sup>.



**Слика 3.14.** График зависности апсорбанце од времена за реакцију хидролизе комплекса **1** (на 464 nm, 0,1 mM) и комплекса **2** (на 476 nm, 0,1 mM) у  $H_2O$  на 298 K

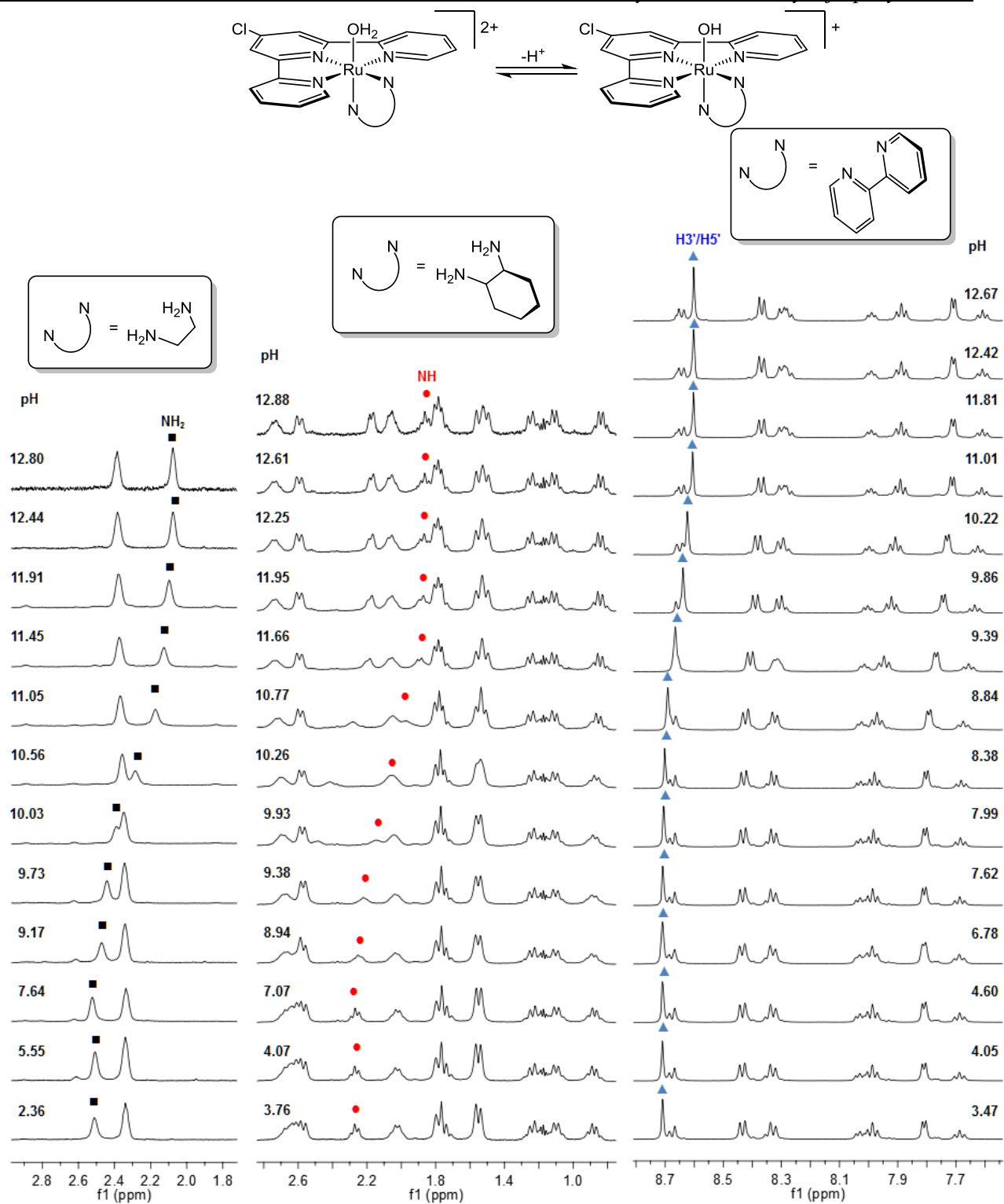
**Табела 3.1.** Константе брзине реакције хидролизе и полувреме реакције на 298 К у  $\text{H}_2\text{O}$  и раствору пуфера за комплексе **1** и **2**

Комплекс	Изобестичке тачке [nm]	$\text{H}_2\text{O}$		пуфер <sup>a</sup>	
		$k_{\text{H}_2\text{O}}$ [ $10^{-3}\text{s}^{-1}$ ]	$(t_{1/2})_{\text{H}_2\text{O}}$ [min]	$k_{\text{H}_2\text{O}}$ [ $10^{-3}\text{s}^{-1}$ ]	$(t_{1/2})_{\text{H}_2\text{O}}$ [min]
<b>1</b>	347, 416, 491	$2,52 \pm 0,01$	$4,58 \pm 0,03$	$2,82 \pm 0,01$	$4,10 \pm 0,03$
<b>2</b>	424, 500, 532, 557	$3,94 \pm 0,02$	$2,93 \pm 0,02$	$4,00 \pm 0,02$	$2,90 \pm 0,02$

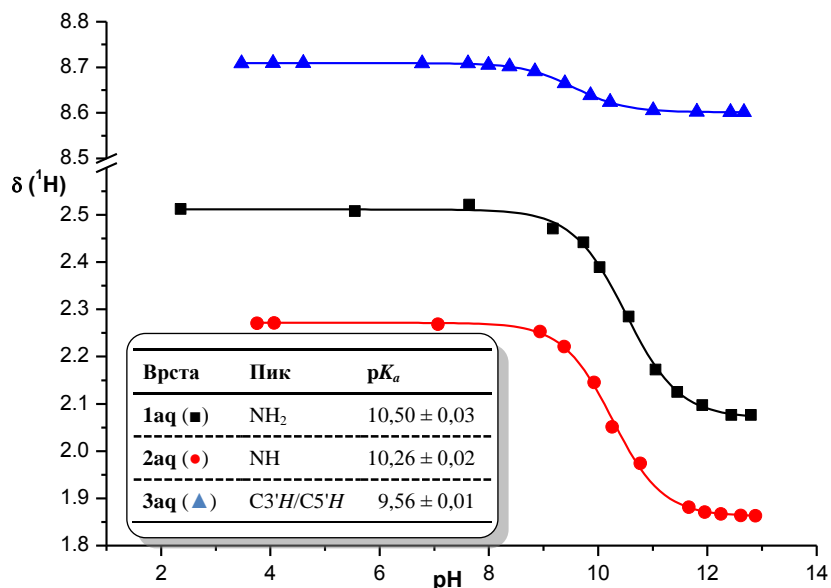
<sup>a</sup> у 25 mM Нерес пуферу, рН = 7,4

### 3.1.2.3. Одређивање $\text{pK}_a$ вредности

Да би смо потврдили да ли су комплекси **1**, **2** и **3** присутни као аква адукти или као мање реактивне хидроксо врсте у физиолошким условима (рН = 7,2 - 7,4), вршене су рН титрације аква комплекса **1aq**, **2aq** и **3aq** помоћу NMR спектроскопије. На основу NMR спектара можемо видети да постоје значајне промене услед варијације рН од 2 до 13. За сваку врсту, сигнал који је показао највећу промену хемијског померања у зависности од рН вредности је изабран за анализу: сигнали NH протона на најнижем хемијском померању за **1aq** и **2aq**, и синглет који потиче од  $\text{C3}'\text{H}/\text{C5}'\text{H}$  за **3aq**. С обзиром да је рН вредност расла током титрације, одговарајући сигнали су се померали ка вишем пољу као што је приказано на Слици 3.15. На основу анализе NMR титрационе криве добијене су  $\text{pK}_a$  вредности:  $10,50 \pm 0,03$  за **1aq**,  $10,26 \pm 0,02$  за **2aq** и  $9,56 \pm 0,01$  за **3aq** (Слика 3.16). Последња вредност се може упоредити са вредношћу која је раније добијена за одговарајући тпу комплекс,  $[\text{Ru}(\text{tpu})(\text{bpy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  ( $\text{pK}_a \approx 9,7$ ).<sup>128</sup> Може се закључити да депротонација аква комплекса зависи од природе *N-N* хелатног лиганда: присуство ароматичног bpy повећава киселост аква лиганда, док измена en са dash лигандом има веома мали утицај. Међутим, добијене  $\text{pK}_a$  вредности јасно показују да се сва три комплекса, **1-3**, налазе у активнијем аква облику у раствору при физиолошкој рН вредности. Израчунато је да се само 0,15% **1aq** и **2aq**, и 0,75% **3aq** налазе у хидроксо облику на рН = 7,4.



Слика 3.15. Делови  $^1\text{H}$  NMR спектра добијени током титрације  $1\text{aq}$ ,  $2\text{aq}$  и  $3\text{aq}$  комплексних јона у рН области од 2 до 13 (10%  $\text{D}_2\text{O}$ /90%  $\text{H}_2\text{O}$ , 298 K). (■)  $\text{NH}_2$  протони за  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{OH}_2)]^{2+}$  ( $1\text{aq}$ ), (●)  $\text{NH}$  протон за  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{OH}_2)]^{2+}$  ( $2\text{aq}$ ), (▲)  $\text{C3'/H5'}$  за  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  ( $3\text{aq}$ )

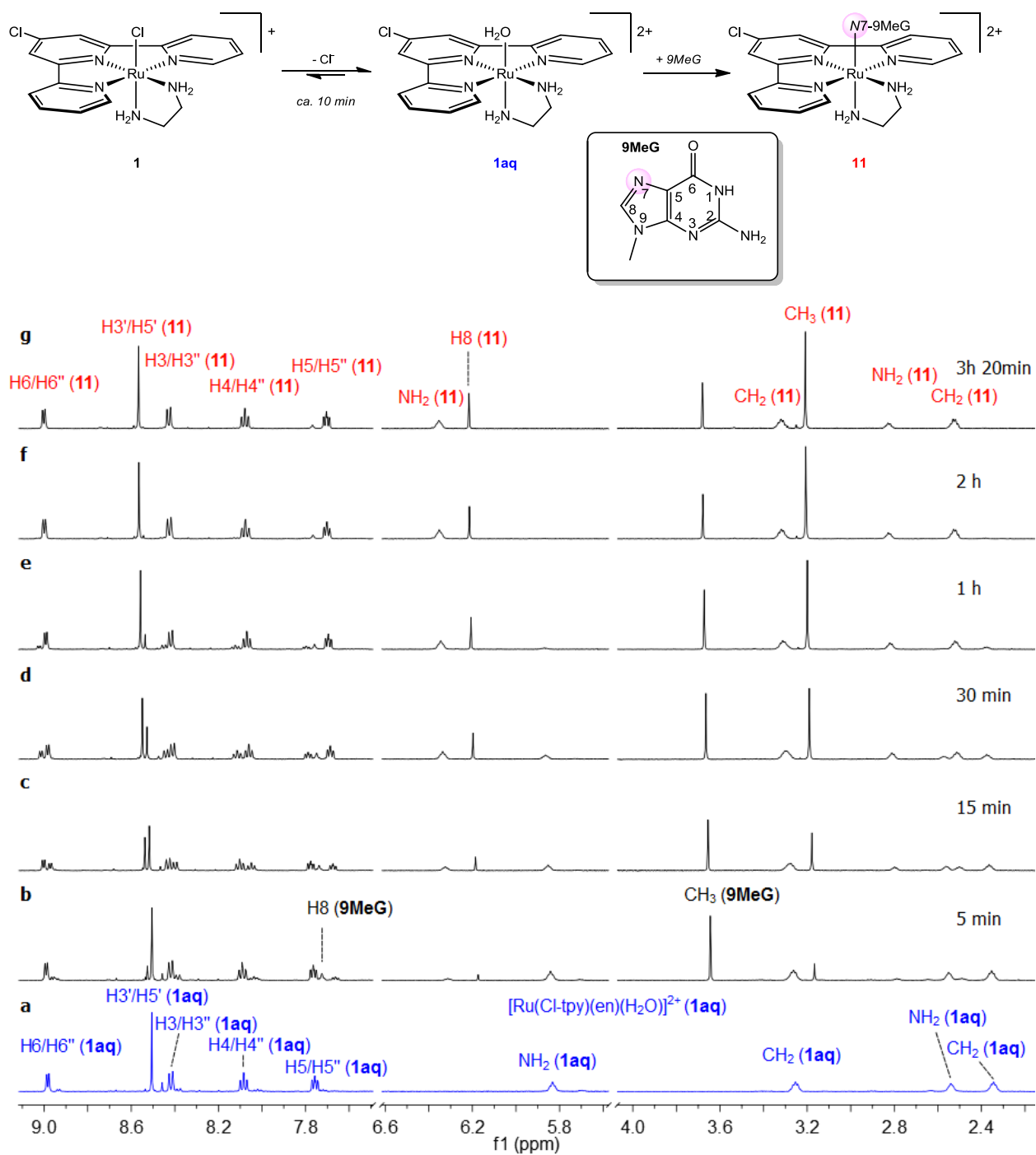


Слика 3.16.  $^1\text{H}$  NMR pH титрационе криве за  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{OH}_2)]^{2+}$  (**1aq**, ■),  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{OH}_2)]^{2+}$  (**2aq**, ●) и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  (**3aq**, ▲) на 298 K

### 3.1.3 Интеракције са дериватима гуанина

Реактивност комплекса **1**, **2** и **3** са дериватима гуанина, 9-MeG и 5'-GMP, је испитивана помоћу  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  NMR спектроскопије у  $\text{D}_2\text{O}$  на собној температури.

Додатак благог вишка 9-MeG (1,3 eq) у равнотежни раствор комплекса **1** (4 mM, pH = 7,78 ppm) у  $\text{D}_2\text{O}$  узрокује веома брзе промене у  $^1\text{H}$  NMR спектру (Слика 3.17). Нов сет сигнала који потиче од производа  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(9\text{MeG-N7})]^{2+}$  (**11**) почео је да расте након неколико минута. Иако везивање рутенијум(II) јона за N7 азотов атом пуринског остатка индукује типично померање H8 протона ка нижем пољу у односу на некоординован лиганд, у нашем случају, везивање комплекса **1** за N7 атом 9MeG доводи до значајног померања синглета H8 протона ка вишем пољу ( $\delta = 6,20$  у односу на 7,77 ppm,  $\Delta\delta = -1,57$ ) због заштитног ефекта суседног Cl-tpy. Сличан помак, иако мање изражен, примећен је и за  $\text{CH}_3$  синглет ( $\delta = 3,18$  у односу на 3,68 ppm). Исто понашање је детектовано за све испитиване системе и неће бити даље коментарисано. Квантитативно формирање комплекса **11** се дешава за око 3 сата, након чега није било спектралних промена.

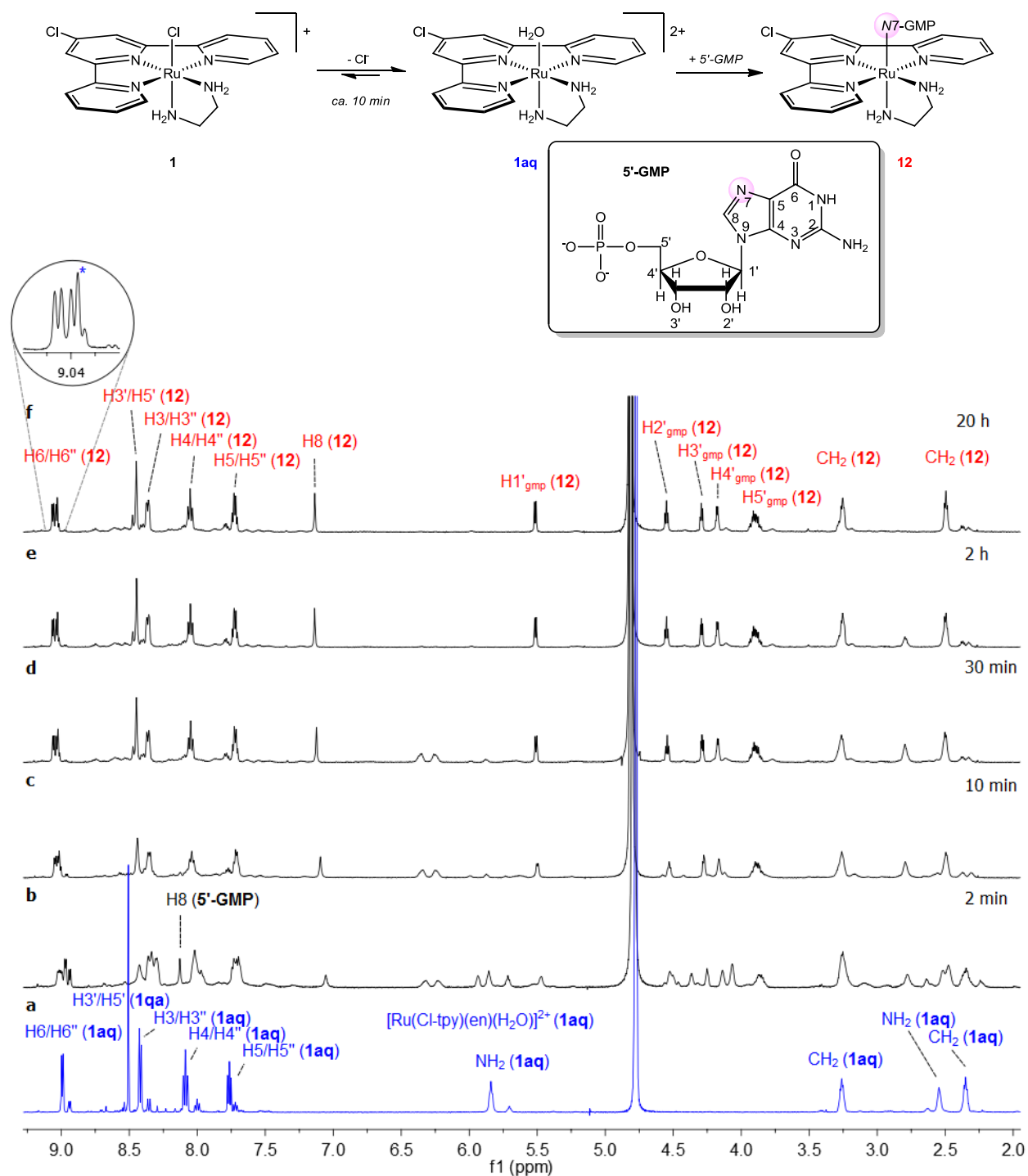


Слика 3.17.  $^1\text{H}$  NMR спектар  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}]^+$  комплекса (**1**, 4 mM) 10 минута након растварања у  $\text{D}_2\text{O}$  (a) и у различитим временским интервалима (б-г) након додатка  $9\text{MeG}$  (1,3eq, pH = 7,78)

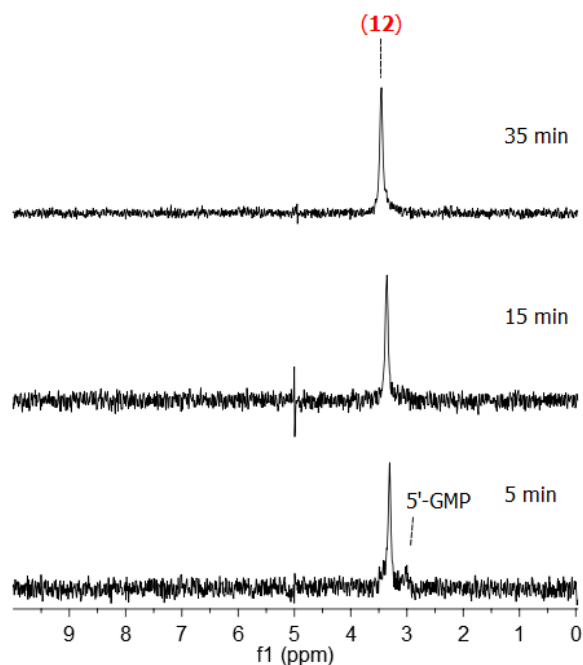


Реакција комплекса **1** са 5'-GMP (1:1, 10 mM, D<sub>2</sub>O, pH = 7,03) доводи до квантитативног формирања једног финалног производа [Ru(Cl-try)(en)(5'-GMP-N7)] (**12**), који је идентификован помоћу <sup>1</sup>H (Слика 3.18) и <sup>31</sup>P (Слика 3.19) NMR спектроскопије. Реакција је релативно брза, на шта указује брза појава сигнала производа **12** одмах након мешања. Квантитативно формирање производа се дешава у року од 2 сата и након тога није било спектралних промена. Интересантно је да је сваки Cl-try сигнал раздвојен на два сигнала једнаких интензитета (делимично преклопљена осим сигнали протона H6/H6''): стереогени центар координованог 5'-GMP узрокује губитак равни симетрије коју чине две једнаке половине Cl-try у **1** и **1aq**. Такође, у <sup>31</sup>P NMR спектру може се видети само један нов синглет који расте у току реакције и приписан је производу **12** (Слика 3.19). Овај сигнал је благо померен ка вредностима вишег хемијског померања ( $\delta = 3,31$  ppm) у односу на сигнал слободног 5'-GMP ( $\delta = 2,99$  ppm), што је и типично за N7 везивање.<sup>62,129</sup> Важно је напоменути да нису детектовани интермедијери као у случају „half sandwich” рутенијум(II) комплекса (на пр. везивање 5'-GMP преко кисеоника фосфатне групе).<sup>62,129</sup>

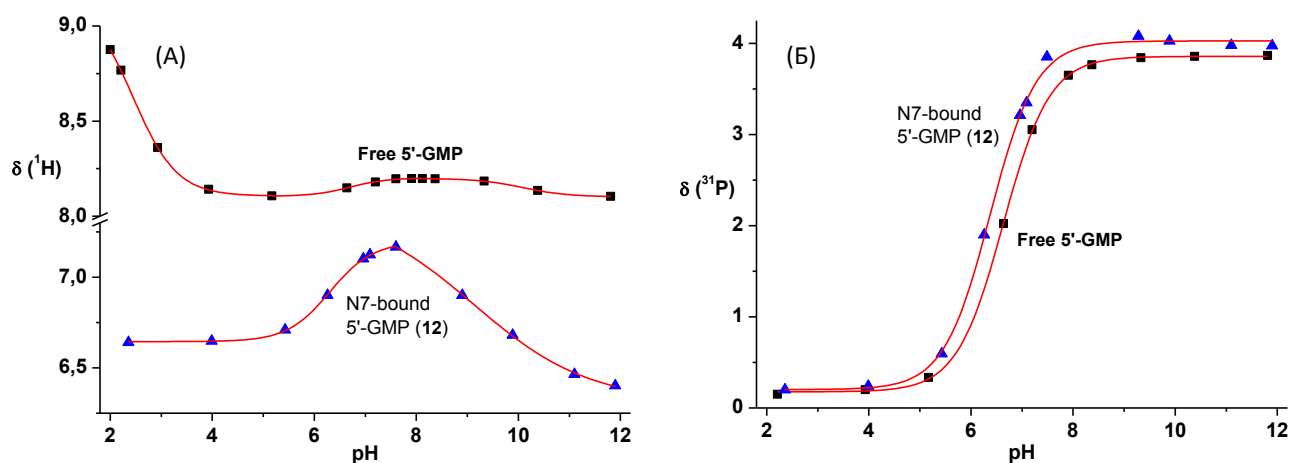
За проверу идентитета производа **11** и **12**, односно да се координовање деривата гуанина за {Ru(Cl-try)(en)}<sup>2+</sup> фрагмент дешава преко N7 атома, урађене су pH титрације раствора након завршене сваке реакције и ради поређења у еквимоларним растворима слободних нуклеобаза. pH зависност је праћена померањем H8 синглета у <sup>1</sup>H NMR спектру и померањем сигнала PO<sub>3</sub>H у <sup>31</sup>P NMR спектру, који су посебно осетљиви на протонацију N7 атома и депротонацију фосфатне групе. <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P NMR титрационе криве су представљене на Сликама 3.20 и 3.21. pKa вредности, које су добијене помоћу Henderson-Hasselbalch-ове једначине, су дате у Табели 3.2. За 9MeG су одређене две pKa вредности, 9,90 и 2,88, приписане депротонацији N1H и протонацији N7 атома, док су за 5'-GMP добијене три вредности, 10,09, 6,71 и 2,44, приписане депротонацији N1H и PO<sub>3</sub>H, и протонацији N7 атома. Наше експерименталне вредности су веома блиске вредностима које су раније публиковане.<sup>130,131</sup> На основу добијених титрационих криви, може се видети да комплекс **11** подлеже депротонацији N1H (pKa = 9,47), али не и протонацији N7 атома (Слика 3.21). Комплекс **12** подлеже депротонацији само PO<sub>3</sub>H (pKa = 6,31) и N1H (pKa = 9,12) (Слика 3.20). Ови резултати дају јасне доказе да се деривати гуанина везују за рутенијум(II) преко N7 азотовог атома.



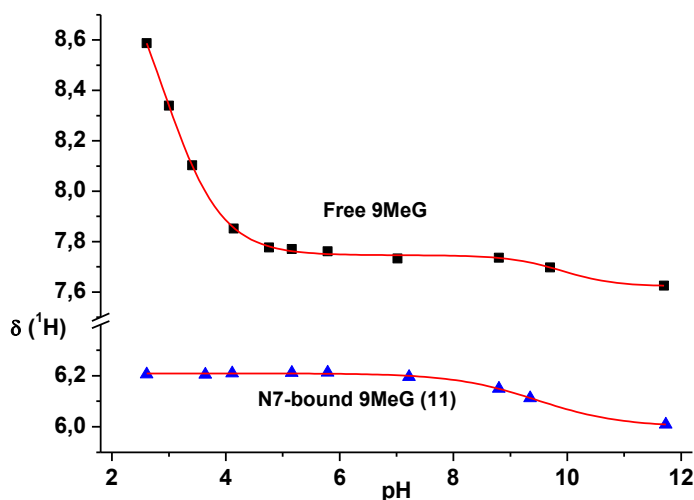
Слика 3.18.  $^1H$  NMR спектар  $[Ru(Cl-tpy)(en)Cl]^+$  комплекса (**1**, 10 mM) 10 минута након растварања у  $D_2O$  (a) и у различитим временским интервалима (б-ф) након додатка 5'-GMP (1 eq, pH = 7,03)



Слика 3.19.  $^{31}\text{P}$  NMR спектралне промене током реакције  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}]^+$  комплекса (1) са 5'-GMP (1:1,10 mM, pH = 7,03) у  $\text{D}_2\text{O}$  у различитим временским интервалима



Слика 3.20. Зависност хемијског померања  $\text{H8}$  (А) и  $\text{PO}_3\text{H}$  (Б) од pH за слободан 5'-GMP (■) и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(5'\text{-GMP-N7})]$  комплекс (12, ▲) на собној температури

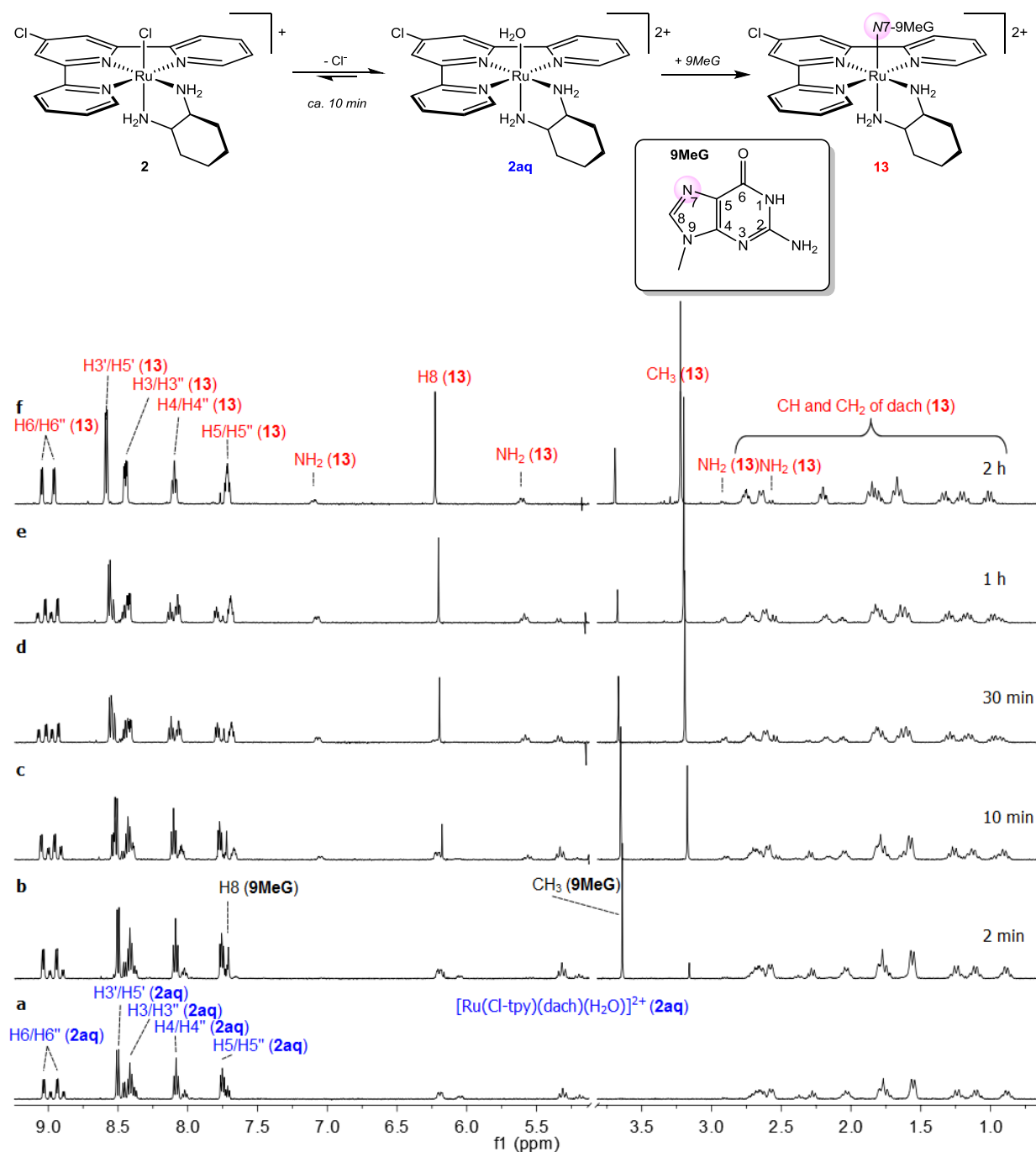


Слика 3.21. Зависност хемијског померања  $H8$  од  $pH$  за слободан  $9MeG$  (■) и  $[Ru(Cl-tpy)(en)(9MeG-N7)]$  комплекс (11, ▲) на  $298 K$

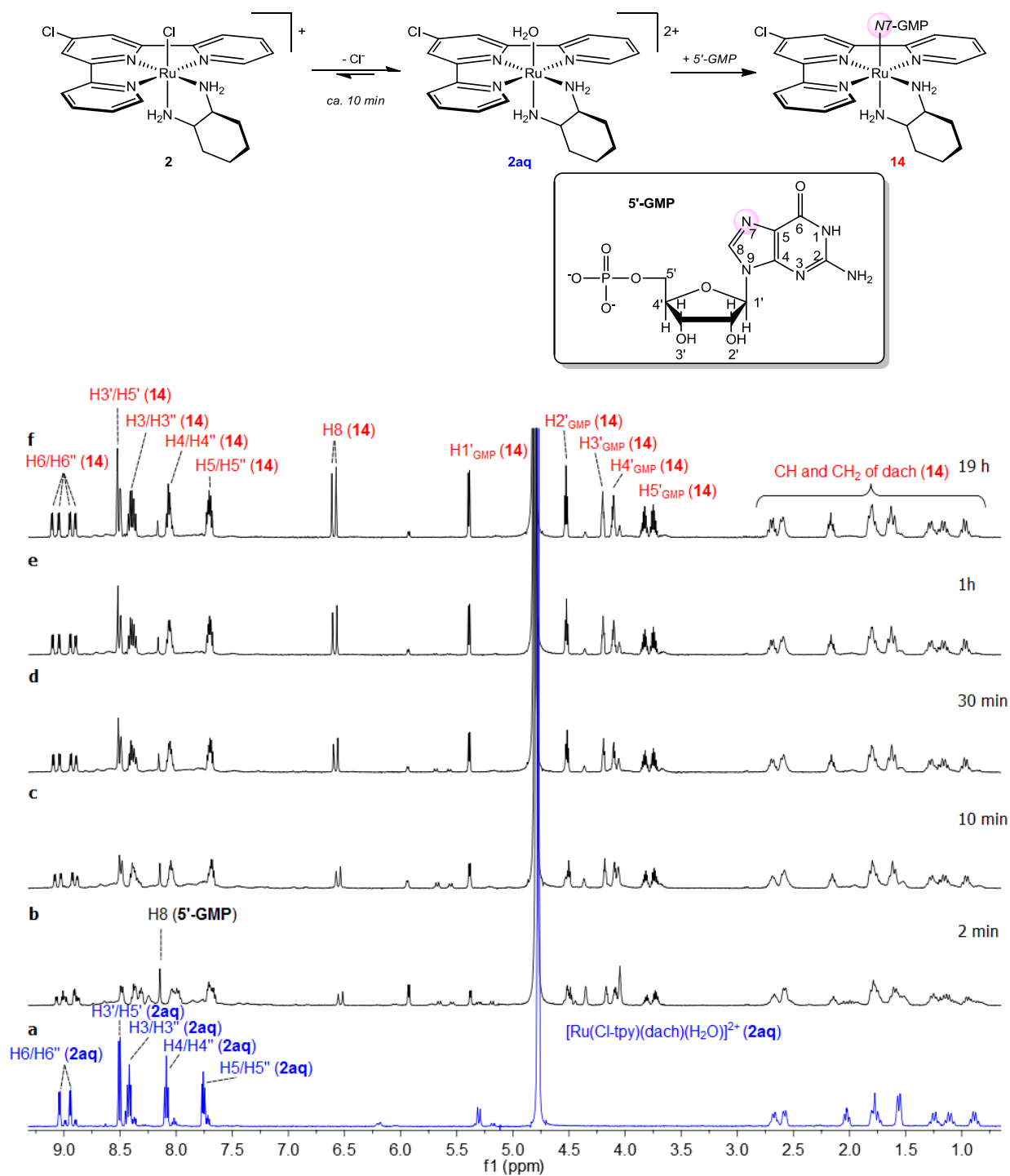
Табела 3.2.  $pK_a$  вредности за  $9MeG$  и  $5'$ -GMP и њихових  $\{Ru(Cl-tpy)(en)\}^{2+}$  производа на собној температури

врсте	група	$pK_a$ ( $^1H$ )	$pK_a$ ( $^{31}P$ )
9MeG	N7	$2,88 \pm 0,10$	
	N1H	$9,90 \pm 0,26$	
$[Ru(Cl-tpy)(en)(9MeG-N7)]$ (11)	N1H	$9,47 \pm 0,10$	
5'-GMP	N7	$2,44 \pm 0,04$	
	$-OP_3H$	$6,71 \pm 0,04$	$6,63 \pm 0,01$
	N1H	$10,09 \pm 0,02$	
$[Ru(Cl-tpy)(en)(5'-GMP-N7)]$ (12)	$-OP_3H$	$6,31 \pm 0,02$	$6,37 \pm 0,03$
	N1H	$9,12 \pm 0,15$	

Слични резултати су добијени и за  $[Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]^+$  (2) са квантитативним формирањем  $[Ru(Cl-tpy)(dach)(9MeG-N7)]^{2+}$  (13) у току 2 сата (Слика 3.22) и  $[Ru(Cl-tpy)(dach)(5'-GMP-N7)]^{2+}$  (14) у току једног сата (Слика 3.23).

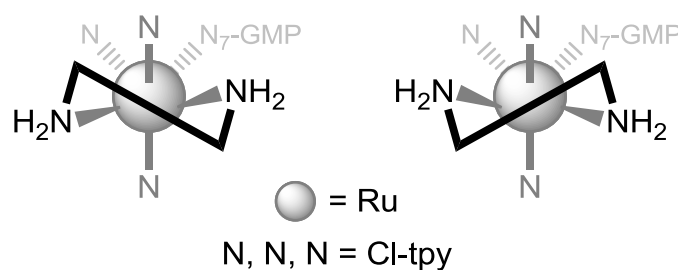


Слика 3.22.  $^1\text{H}$  NMR спектар  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}]^+$  комплекса (**2**, 4 mM) 5 минута након растварања у  $\text{D}_2\text{O}$  (a) и у различитим временским интервалима (б-ф) након додатка 9MeG (1,1eq, pH = 7,91)

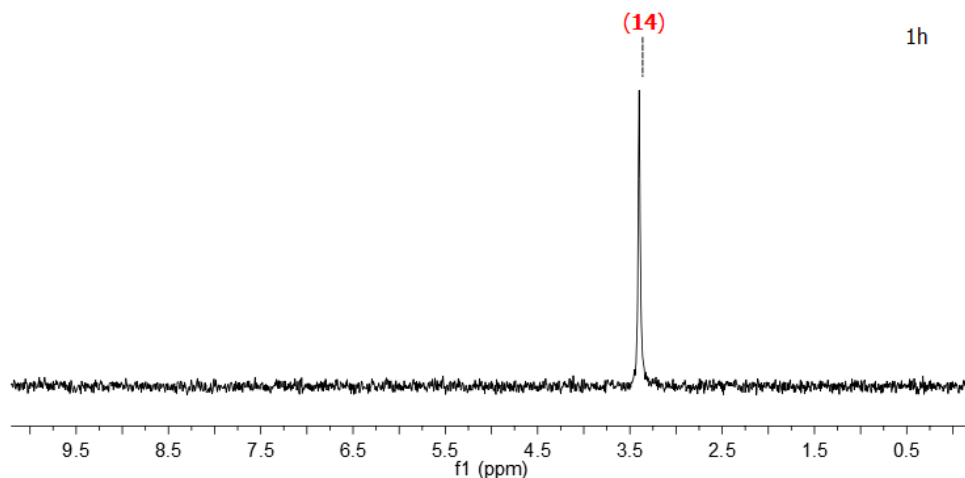


Слика 3.23.  $^1\text{H}$  NMR спектар  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}]^+$  комплекса (**2**, 10 mM) 5 минута након растварања у  $\text{D}_2\text{O}$  (a) и у различитим временским интервалима (б-ф) након додатка 5'-GMP (1 eq, pH = 7,12)

Комплекс **14** се јавља у облику два дијастереоизомера подједнако заступљена, због конформационе крутости координаног *dach* лиганда и стереогеног центра на 5'-GMP (Слика 3.24). Многи сигнали су делимично преклопљени, међутим, два синглета Н8 ( $\delta = 6,57$  и  $6,54$  ppm) и четири дублета Н6/Н6" протона ( $\delta = 9,08$ ,  $9,03$ ,  $8,93$  и  $8,88$  ppm) су јасно раздвојена. На основу  $^{31}\text{P}$  NMR спектра можемо видети само један нов сигнал ( $\delta = 3,37$  ppm), иако се очекују два синглета за два дијастереоизомера (Слика 3.25). Сматрамо да су њихова хемијска померања веома близу да би се могла уочити, с обзиром да је  $\text{PO}_3\text{H}$  група далеко од стереогених центара.

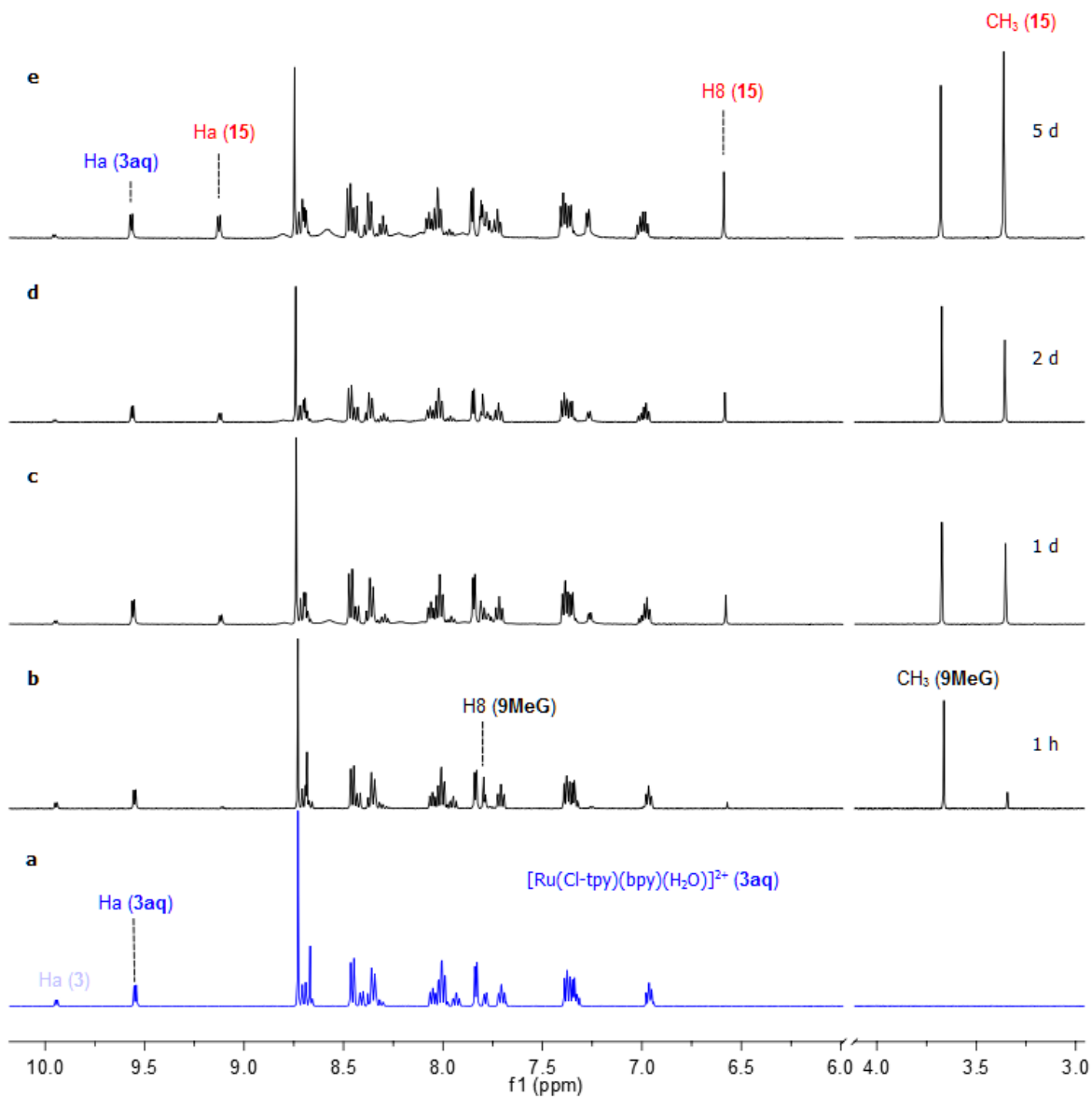


**Слика 3.24.** Конформациони изомери  $\text{Ru}(\text{NH}_2\text{-CH-CH-NH}_2)$  прстена који је формиран везивањем хелатног лиганда *dach* за рутенијум(II) центар у  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(5'\text{-GMP-N7})]^{2+}$  (**14**)



**Слика 3.25.**  $^{31}\text{P}$  NMR спектар  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(5'\text{-GMP-N7})]^{2+}$  (**14**) снимљен један сат након реакције комплекса **2** са 5'-GMP у  $\text{D}_2\text{O}$  на собној температури

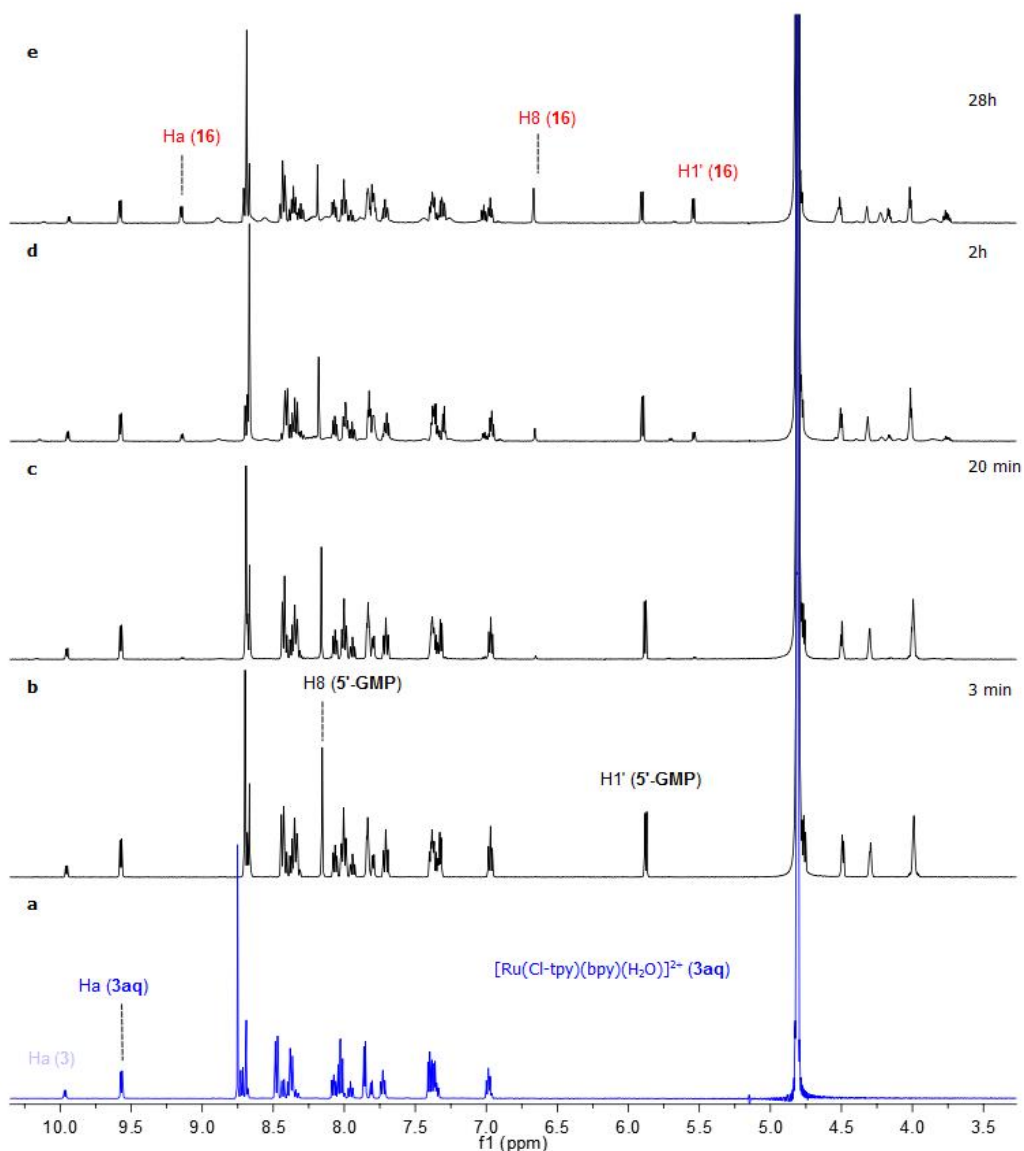
За разлику од **1** и **2** комплекса, реакција  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  комплекса (**3**) (1:1, 4 mM, pH = 6,87) са 9MeG је веома спора: нов сет сигнала, приписан производу  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(9\text{MeG-N7})]^{2+}$  (**15**), је постао видљив у  $^1\text{H}$  NMR спектру за неколико сати. Систем је постигао равнотежу након 5 дана, са 45% 9MeG координаног за рутенијум (**15**), 50% **3aq** и 5% комплекса **3** (Слика 3.26).



**Слика 3.26.**  $^1\text{H}$  NMR спектар  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  комплекса (**3**, 4 mM) 24 сата након растварања у  $\text{D}_2\text{O}$  (a) и у различитим временским интервалима (б-е) након додатка 9MeG (1,0 eq, pH = 6,87)



Реакција комплекса **3** са 5'-GMP (1:1, 10 mM, pH = 7,23) је такође веома спора у поређењу са реакцијама комплекса **1** и **2**. У  $^1\text{H}$  NMR спектру, 20 минута након додатка 5'-GMP у равнотежни раствор комплекса **3**, примећен је пораст новог сета сигнала, који је приписан  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(5'\text{-GMP-N7})]^{2+}$  (**16**) (Слика 3.27). Систем постиже равнотежу након 24 сата са 40% производа **16**, 47% **3aq** и 13% комплекса **3**. У складу са  $^1\text{H}$  NMR резултатима, само један нов сигнал ( $\delta = 3,45$  ppm) је детектован на  $^{31}\text{P}$  NMR спектру током реакције.



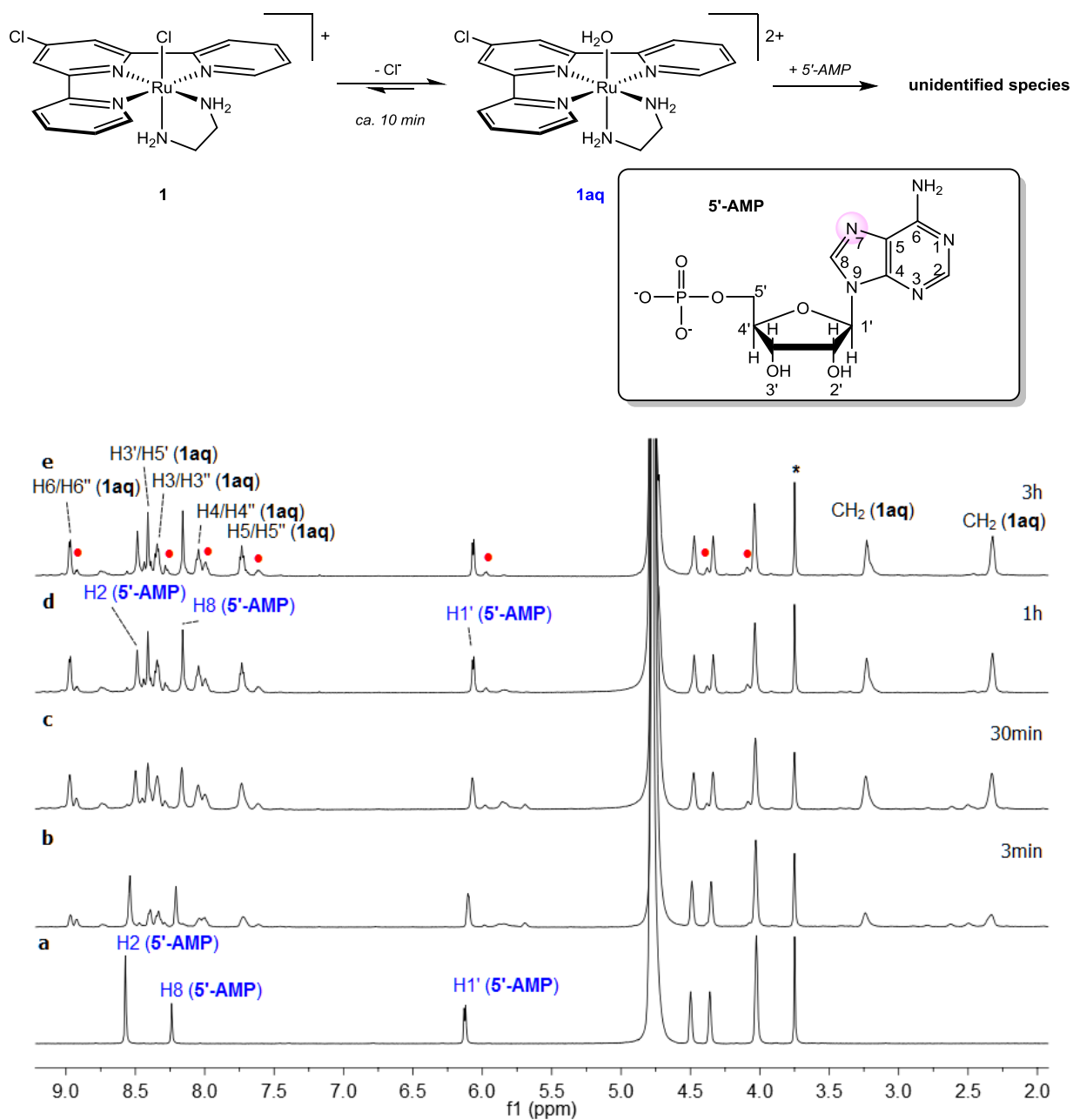
Слика 3.27.  $^1\text{H}$  NMR спектар  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  комплекса (**3**, 10 mM) 24 сата након растварања у  $\text{D}_2\text{O}$  (a) и при различитим временским интервалима (б-е) након додатка 5'-GMP (1,0 eq, pH = 7,23)

На основу NMR спектроскопских резултата, закључено је да комплекси **1** и **2**, који садрже алифатичне диамине као хелатне лиганде, реагују са 9MeG и 5'-GMP много брже у односу на bpy комплекс **3**. Реакције комплекса **1** и **2** са дериватима гуанина су квантитативне, док реакције комплекса **3** нису. Чињеница да су Ru(II)-tpy комплекси који садрже пиридил лиганде спори у својим реакцијама са ДНК базама је примећена и раније. На пример, за реакцију  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{Me}_2\text{bpy})\text{Cl}]^+$  комплекса са 5'-GMP потребно је 4 сата на 310 K, док у реакцији  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{apy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  комплекса са 9EtG формира се након 5 дана само 20% производа  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{apy})(9\text{EtG-N7})]^{2+}$  на истој температури.

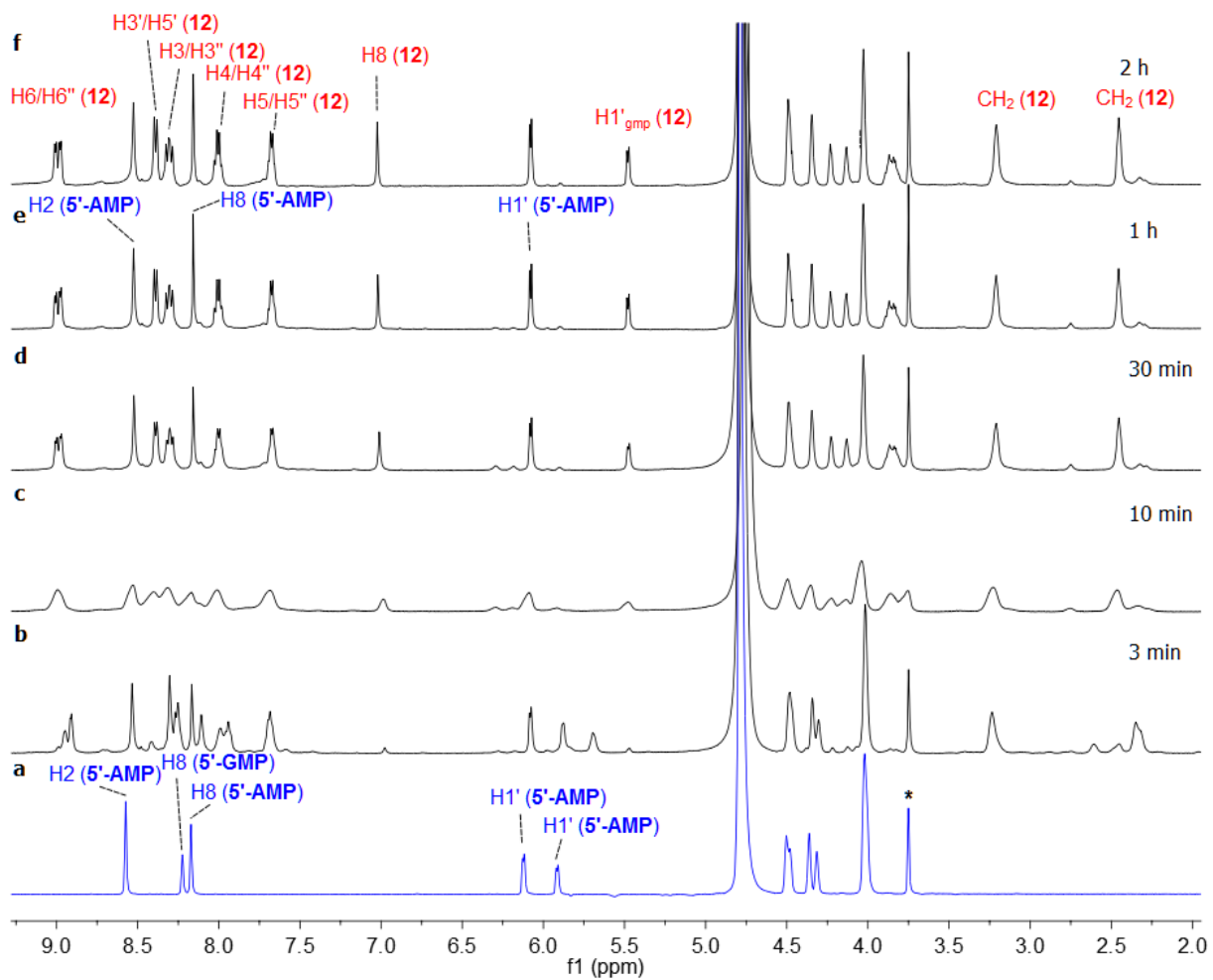
#### 3.1.4. Интеракције $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}]^+$ комплекса (**1**) са 5'-AMP и конкурентне реакције са мешом 5'-AMP и 5'-GMP

Да би испитали афинитет координовања нових комплекса са нуклеобазама, проучавали смо интеракције комплекса **1** са дериватом аденозина, 5'-AMP, као и конкурентне реакције комплекса **1** са мешом 5'-GMP и 5'-AMP. Ове реакције су испитиване применом  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  NMR спектроскопије у  $\text{D}_2\text{O}$  на собној температури (Слика 3.28).

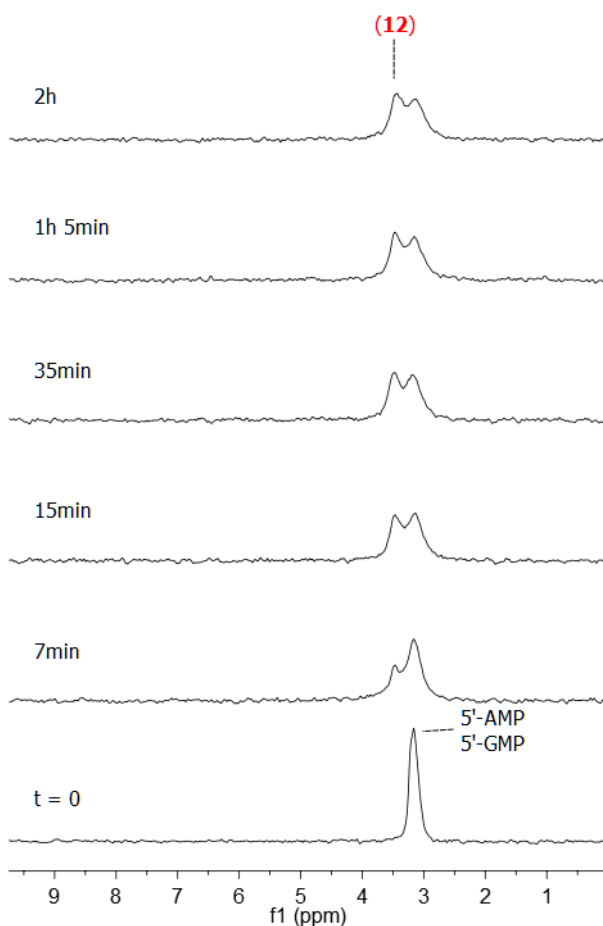
Додавањем равнотежног раствора комплекса **1** у раствор 5'-AMP ( $C_{\text{final}} = 10 \text{ mM}$ , 1:1,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{pH} = 7,00$ ) долази до брзих, али веома малих, промена у NMR спектру (Слика 3.28). Многе нове резонанце су се појавиле одмах након мешања, при чему је равнотежа постигнута у току једног сата. На основу интеграције, мање од 10% реактаната је прешло у производ, тако да није било могуће урадити интерпретацију нових резонанци.  $^{31}\text{P}$  NMR спектар у сагласности са  $^1\text{H}$  NMR резултатима, показује формирање нових врста, као што је приказано проширеним сигналом слободног 5'-AMP ( $\delta = 3,04 \text{ ppm}$ ), због делимичног преклапања са новим сигнаlima. Ови резултати јасно показују да комплекс **1** има веома мали афинитет за 5'-AMP. У конкурентној реакцији са мешом 5'-AMP и 5'-GMP у моларном односу 1:1, комплекс **1** показује велики афинитет према 5'-GMP. Применом  $^1\text{H}$  (Слика 3.29) и  $^{31}\text{P}$  (Слика 3.30) NMR спектроскопије уочено је формирање искључиво  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(5'\text{-GMP-N7})]$  производа (**12**) у току неколико сати након додатка комплекса **1aq** у раствор еквимоларних количина 5'-AMP и 5'-GMP ( $C_{\text{final}} = 10 \text{ mM}$ , 1:1,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{pH} = 7,07$ ).



**Слика 3.28.**  $^1\text{H}$  NMR спектар у  $\text{D}_2\text{O}$  слободног 5'-AMP (10 mM, pH = 7,00) (a) и након додавања  $[\text{Ru}(\text{Cl-trpy})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  (**1aq**, 1,0 eq, 298 K) при различитим временским интервалима (б-е). Сигнали приписани новим неидентификованим врстама су означени са (●). Резонанца на 3,75 ppm (означена као \*) потиче од 1,4-диоксана који је коришћен као интерни стандард



Слика 3.29.  $^1\text{H}$  NMR спектар смеше 5'-AMP и 5'-GMP (1:1, 10 mM, pH = 7,07) у  $\text{D}_2\text{O}$  (a) и након додавања  $[\text{Ru}(\text{Cl-trp})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  (**1aq**, 1,0 eq, 298 K) при различитим временским интервалима (б-ф). Резонанца на 3,75 ppm (означена као \*) потиче од 1,4-диоксана који је коришћен као интерни стандард

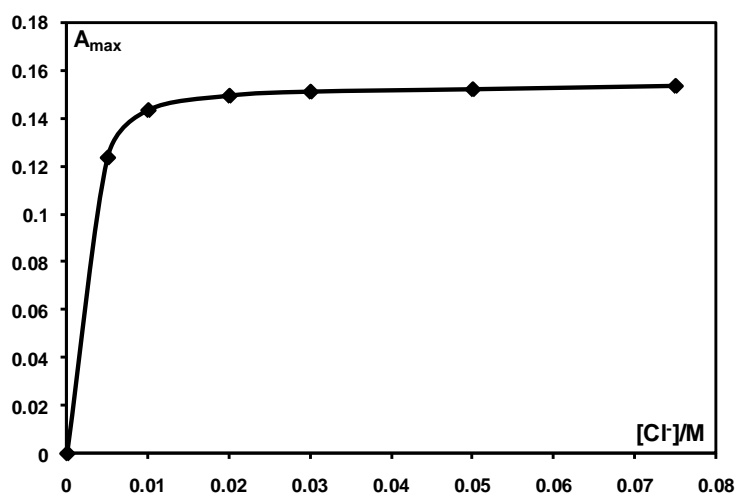


**Слика 3.30.**  $^{31}\text{P}$  NMR спектралне промене током реакције  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^+$  (**1aq**) са 5'-AMP и 5'-GMP (1:1:1, 10 mM, pH = 7,07, 298 K) у  $\text{D}_2\text{O}$  у различитим временским интервалима

### 3.1.5. UV-Vis испитивања реакције комплекса **1** и **2** са дериватима гуанина

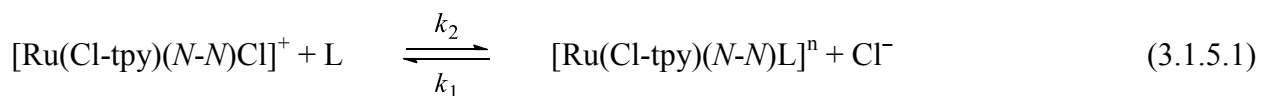
Кинетика супституционих реакција комплекса **1** и **2** са 9MeG и 5'-GMP испитивана је спектрофотометријски праћењем промене апсорбције раствора на одговарајућој таласној дужини у функцији времена. Реакције су изучаване као реакције *pseudo*-првог реда, при чему је концентрација лиганда била најмање 10 пута већа у односу на концентрацију полазног комплекса. Све супституционе реакције изучаване су у присуству 30 mM NaCl, како би се сузбила хидролиза комплекса. Ова вредност је одређена пре кинетичких мерења као минимална концентрација хлорида за коју нису уочене спектралне промене (Слика 3.31). Добијена промена апсорбанце је показала најбоље слагање када је

посматрана као експоненцијална функција првог реда помоћу компјутерског програма Origin 8.



**Слика 3.31.** Промена апсорбанце у зависности од концентрације хлорида,  $[Cl^-]$ , за  $[Ru(Cl-tpy)(en)Cl]^+$  комплекс (**1**) на 401 nm у 0,1M  $NaClO_4$  (310 K)

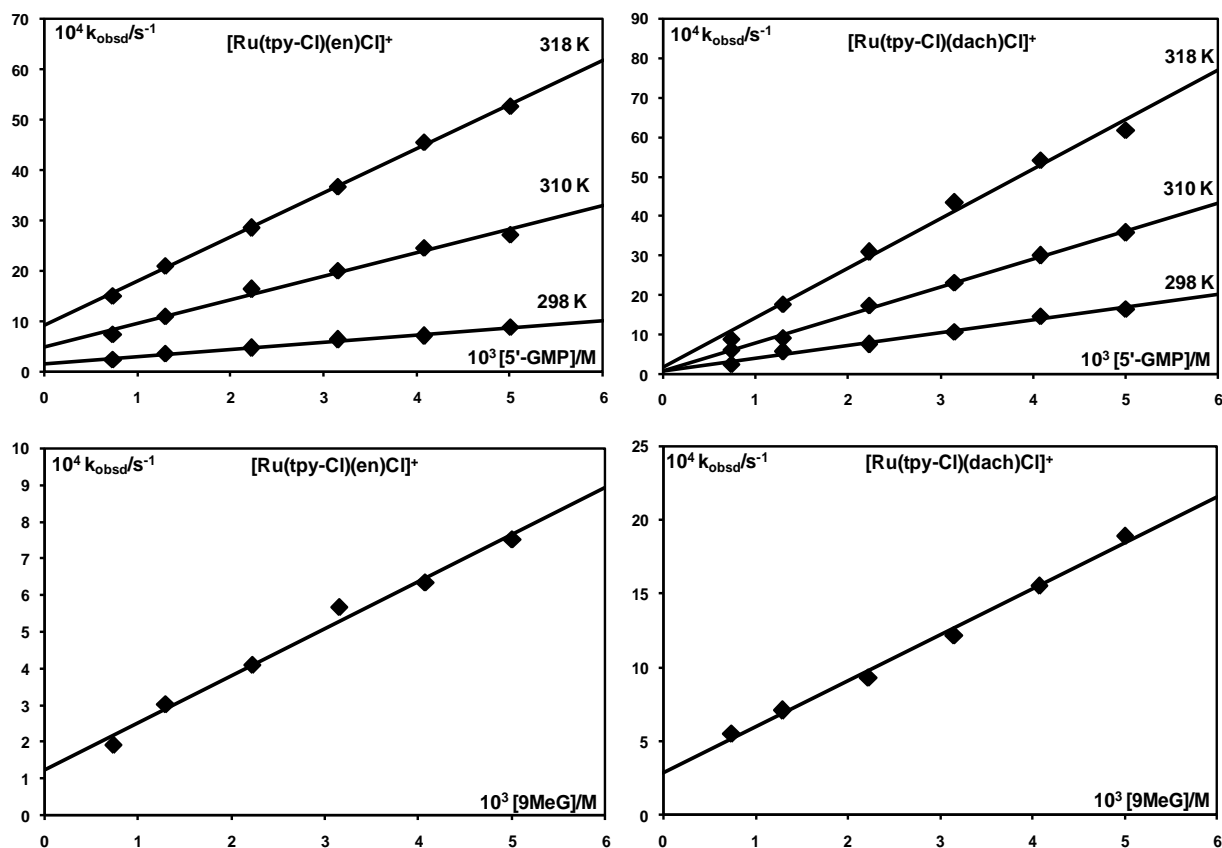
Супституционе реакције комплекса **1** и **2** са дериватима гуанина могу бити представљене једначином (3.1.5.1), у којој  $N-N$  означава бидентатни инертни лиганд ( $en$  или  $dach$ ), а  $L$  улазни лиганд (9MeG или 5'-GMP), при чему  $n = +2$  или  $0$  у зависности од наелектрисања улазног лиганда. Константа  $k_2$  је константа брзине реакције другог реда и карактерише реакцију директне супституције, док константа  $k_1$  карактерише реверзибилни процес.



Повезаност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , са поменутиим константама за директан и повратан процес супституције дата је једначином (3.1.5.2):

$$k_{obsd} = k_1[Cl^-] + k_2[L] \quad (3.1.5.2)$$

На Слици 3.32 приказана је експериментално добијена зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , у односу на концентрацију улазног лиганда и температуру.



**Слика 3.32.** Зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , од концентрације лиганда и температуре за реакције супституције комплекса  $[Ru(tpy-Cl)(en)Cl]^+$  и  $[Ru(tpy-Cl)(dach)Cl]^+$  са дериватима гуанина у 25 mM *Hepes* пуферу (30 mM NaCl, pH = 7,4)

На основу Слике 3.32 може се видети да је у свим случајевима добијена линеарна зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда од концентрације улазног лиганда. Константа брзине директне реакције супституције,  $k_2$ , је израчуната из нагиба добијених права, док је константа која карактерише повратни процес  $k_1$  израчуната из одсечка, подељена са концентрацијом хлорида,  $[Cl^-]$ , (30 mM NaCl). Добијене вредности за константе брзине дате су у Табели 3.3.

**Табела 3.3.** Константе брзине и активациони параметри за реакције супституције комплекса **1** и **2** са 5'-GMP и 9MeG (25 mM Hepes пуфер, 30 mM NaCl, pH = 7,4)

	T [K]	$k_2 [10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	$k_1 [10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	$\Delta H_2^\ddagger [\text{kJmol}^{-1}]$	$\Delta S_2^\ddagger [\text{JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}]$
<b>1</b>					
5'-GMP	298	$1,5 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,9$	$69 \pm 3$	$-45 \pm 8$
	310	$4,7 \pm 0,3$	$16,0 \pm 3,0$		
	318	$8,8 \pm 0,2$	$30,0 \pm 2,0$		
9MeG	310	$1,3 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,8$		
<b>2</b>					
5'-GMP	298	$3,3 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$51 \pm 3$	$-101 \pm 9$
	310	$7,1 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,2$		
	318	$12,6 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,7$		
9MeG	310	$3,1 \pm 0,2$	$10,0 \pm 2,0$		

Испитивање реакција супституције изучаваних комплекса са 5'-GMP на различитим температурама омогућило је одређивање вредности термодинамичких параметара које су дате у Табели 3.3. Мале вредности за  $\Delta H^\ddagger$  и негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују на асоцијативни механизам супституције. Овај механизам је предложен и за реакције супституције органометалних рутенијум арена комплекса и „half sandwich” Ru-[9]aneS3 комплекса, које смо претходно проучавали са биолошки релевантним лигандима, 9MeG, гуанозином (Guo), 5'-GMP и L-хистидином (L-His).<sup>129,132</sup>

На основу вредности приказаних у Табели 3.3 може се видети да константа брзине  $k_2$  зависи од природе бидентатног хелатног лиганда: комплекс **2** реагује од 1,5 до 2,5 пута брже у односу на комплекс **1**. Такође, зависи и од наелектрисања улазног лиганда: реакције са 5'-GMP су 2,3 до 3,7 пута брже у односу на реакције супституције са 9MeG. Већа реактивност 5'-GMP се може објаснити дејством јаким електростатичких интеракција између полазног комплекса и 5'-GMP који је при одабраним експерименталним условима наелектрисан 2-,<sup>133</sup> док је 9MeG неутралан.

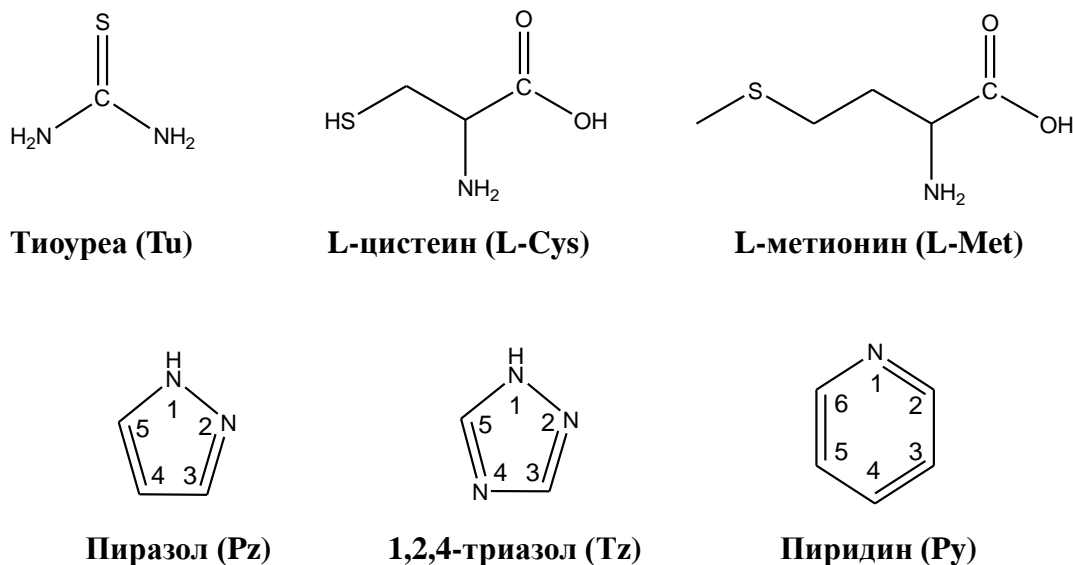
Ради поређења, испитивани су и „half sandwich” Ru-[9]aneS3 комплекси опште формуле  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{N-N})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ , који имају вредности за константу брзине реакције директне супституције,  $k_2$ , од 1,2 до 4 пута мању у односу на вредности  $k_2$  добијене за испитиване Ru(II)-trp комплексе при интеракцији са 5'-GMP под истим условима.<sup>129</sup>



### **3.2. Интеракција рутенијум(II) терпиридин комплекса са сумпор- и азот-донорским биомолекулима**

Последњих година велики број истраживања је усмерен ка испитивању интеракција рутенијум(II/III) комплекса са серум протеинима и аминокиселинама које садрже сумпор. Ове интеракције су веома важне јер након интравенског уношења комплекса рутенијума, протеини плазме постају потенцијалне мете за координовање рутенијум(II/III) комплекса. Експериментални подаци прикупљени до сада пружају информацију о нижој реактивности аминокиселина и протеина према рутенијум(II) комплексима.<sup>67,70,73,134</sup> Релативно слаба веза аминокиселина и протеина са овим комплексима може бити одговорна за транспорт и допремање комплекса рутенијума до канцерогених ћелија, односно неке аминокиселине, пептиди и протеини могу да служе као резервоари рутенијума. Ово може бити и узрок мањих споредних нежељених ефеката комплекса рутенијума у односу на комплексе платине.

Имајући у виду да су ове интеракције од изузетне важности за разумевање механизма антитуморске активности комплекса рутенијума, у овом раду проучавали смо реакције рутенијум(II) терпиридин комплекса са тиоуреом (Tu), аминокиселинама које садрже сумпор (L-Cys и L-Met) и хетероциклима који садрже азот (Pz, Tz и Py). Структурне формуле  $[Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl]$  (**1**) и  $[Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl]$  (**2**) комплекса су већ приказане у одељку 3.1. (Слика 3.1), док су структурне формуле испитиваних лиганата дате на Слици 3.33.

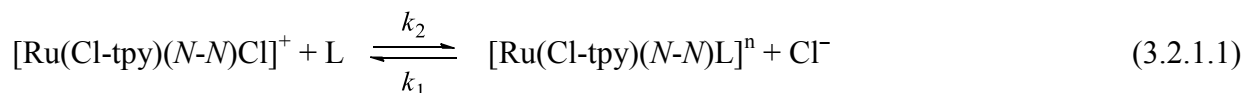


Слика 3.33. Структурне формуле испитиваних лигананда

### 3.2.1. UV-Vis испитивања реакције комплекса 1 и 2 са сумпор- и азот-донорским биомолекулима

Кинетика реакције супституције  $Cl^-$  лиганда са сумпор- и азот-донорским лигандима у комплексима **1** и **2** испитивана је спектрофотометријски праћењем промене апсорбције раствора на одговарајућој таласној дужини у функцији времена. Сва кинетичка мерења су вршена под условима реакције *pseudo*-првог реда у односу на нуклеофил. Како би се спречила спонтана хидролиза рутенијум(II) терпиридин комплекса, све реакције су проучаване у присуству 30 mM NaCl. Ова вредност је одређена на начин који је већ описан у одељку 3.1.5. (Слика 3.31). Супституционе реакције су започете мешањем 0,3 ml раствора комплекса (1,00 mM) са 2,7 ml раствора лиганда (5,56 mM), на 298 K у 25 mM Нерес пуферу (pH = 7,4). Интеракције испитиваних комплекса са Tu и Py су изучаване и на 288 и 310 K. Добијена промена апсорбанце је показала најбоље слагање када је посматрана као експоненцијална функција првог реда помоћу компјутерског програма Origin 8.

Супституционе реакције комплекса **1** и **2** са одговарајућим биомолекулима могу бити представљене једначином (3.2.1.1), у којој *N-N* означава бидентатни инертни лиганд (en или dach), а L улазни лиганд (Tu, L-Cys, L-Met, Pz, Tz или Py), при чему је  $n = +2$  или  $+1$  у зависности од наелектрисања улазног лиганда.



Константа  $k_2$  је константа брзине реакције другог реда и карактерише реакцију директне супституције, док константа  $k_1$  карактерише реверзибилни процес. Добијене вредности за константе брзине дате су у Табели 3.4.

Повезаност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , са поменутиим константама за директан и повратан процес супституције дата је једначином (3.2.1.2):

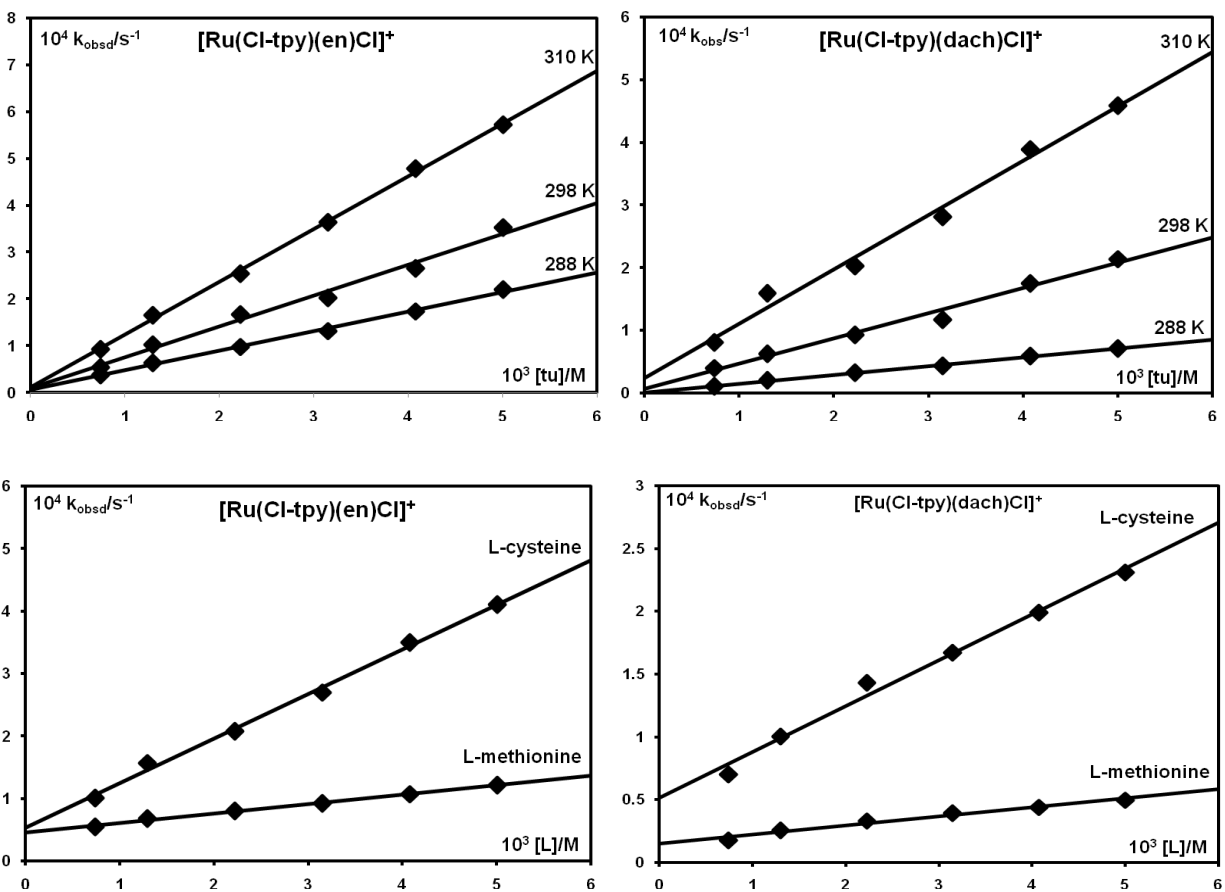
$$k_{\text{obsd}} = k_1[\text{Cl}^-] + k_2[\text{L}] \quad (3.2.1.2)$$

На Сликама 3.34 и 3.35 приказана је експериментално добијена зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , у односу на концентрацију улазног лиганда, при чему је за све реакције добијена линеарна зависност. Испитивање реакција супституције изучаваних комплекса са  $\text{Ti}$  и  $\text{Ru}$  на различитим температурама омогућило је одређивање вредности термодинамичких параметара које су дате у Табели 3.4. Мале вредности за  $\Delta H^\ddagger$  и негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују на асоцијативни механизам супституције. Овај механизам је предложен и за реакције супституције органометалних рутенијум арена комплекса, „half sandwich”  $\text{Ru-}[9]\text{aneS}_3$ , као и рутенијум(II)-*tpy* комплекса које смо претходно проучавали са билошки релевантним лигандима,  $9\text{MeG}$ ,  $\text{Guo}$ ,  $5'\text{-GMP}$  и  $\text{L-His}$ .<sup>129,132,135</sup>

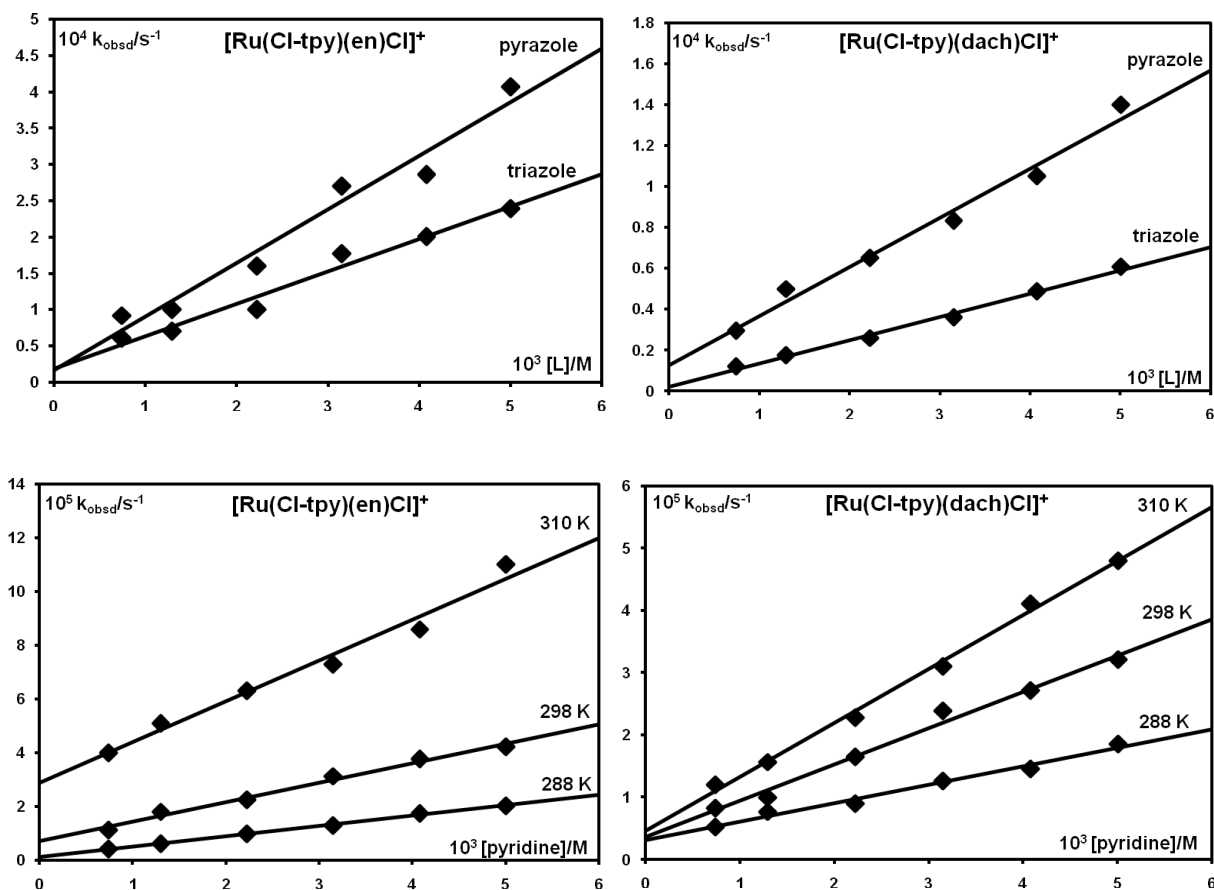
**Табела 3.4.** Константе брзине и активациони параметри за реакције супституције комплекса **1** и **2** са испитиваним лигандима (25 mM Hepes пуфер, 30 mM NaCl, pH = 7,4)

	T [K]	$k_2$ [ $10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_1$ [ $10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$\Delta H_2^\ddagger$ [kJmol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_2^\ddagger$ [JK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
<b>1 (en)</b>					
L-Cys	310	7,20 ± 0,30	18,00 ± 3,00		
L-Met	310	1,50 ± 0,05	15,00 ± 0,60		
Py	288	0,40 ± 0,02	0,50 ± 0,20	44 ± 1	-155 ± 3
	298	0,80 ± 0,05	3,00 ± 0,50		
	310	1,60 ± 0,20	10,00 ± 2,00		
Tz	310	4,60 ± 0,20	3,40 ± 0,10		
Pz	310	6,60 ± 0,30	6,00 ± 2,00		
Tu	288	4,20 ± 0,20	2,00 ± 0,20	32 ± 1	-179 ± 3
	298	7,00 ± 0,40	3,00 ± 0,40		
	310	11,30 ± 0,20	4,00 ± 0,20		
<b>2 (dach)</b>					
L-Cys	310	3,70 ± 0,20	17,00 ± 2,00		
L-Met	310	0,80 ± 0,07	5,00 ± 0,70		
Py	288	0,30 ± 0,02	1,10 ± 0,20	38 ± 4	-178 ± 12
	298	0,60 ± 0,04	1,30 ± 0,40		
	310	0,90 ± 0,03	1,60 ± 0,30		
Tz	310	1,20 ± 0,04	1,80 ± 0,40		
Pz	310	2,40 ± 0,20	1,90 ± 0,10		
Tu	288	1,40 ± 0,04	0,20 ± 0,02	59 ± 5	-155 ± 14
	298	4,10 ± 0,30	2,00 ± 0,06		
	310	8,70 ± 0,50	7,60 ± 0,50		

На основу добијених вредности за константу брзине  $k_2$  (Табела 3.4) може се видети да ен комплекс **1** показује већу реактивност према одабраним лигандима у односу на dach комплекс **2**. Ово се може објаснити присуством позитивног индуктивног ефекта циклохексановог прстена, који смањује електрофилност јона метала, а самим тим и реактивност комплекса.<sup>133</sup> Може се закључити да природа инертног хелатног лиганда утиче на брзину реакције супституције испитиваних комплекса.

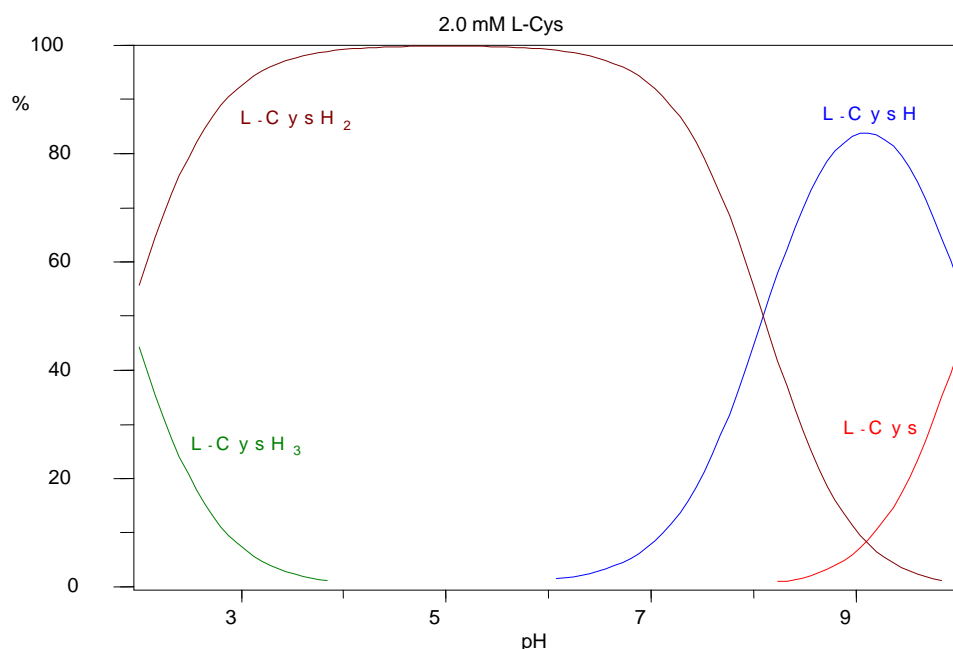


Слика 3.34. Зависност константе брзине реакције pseudo-првог реда,  $k_{obsd}$ , од концентрације лиганда и температуре за реакције супституције  $[Ru(tpy-Cl)(en)Cl]^+$  и  $[Ru(tpy-Cl)(dach)Cl]^+$  комплекса са сумпор-донорским биомолекулима (Tu, L-Cys, L-Met) у 25 mM *Hepes* пуферу (30 mM NaCl, pH = 7,4)



**Слика 3.35.** Зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{obs}$ , од концентрације лиганда и температуре за реакције супституције  $[Ru(tpy-Cl)(en)Cl]^+$  и  $[Ru(tpy-Cl)(dach)Cl]^+$  комплекса са азот-донорским биомолекулима (Pz, Tz, Py) у 25 mM *Neres* пуферу (30 mM NaCl, pH = 7,4)

Експериментално добијени резултати јасно показују да констане брзина зависе и од природе и наелектрисања улазног лиганда. На основу вредности константе  $k_2$  за супституционе реакције комплекса **1** и **2** са одговарајућим сумпор-донорским лигандима добијен је следећи ред реактивности: Tu > L-Cys > L-Met. Најреактивнији лиганд је тиоуреа, с обзиром да поседује особине и  $\sigma$ -донора и  $\pi$ -акцептора.<sup>136,137</sup> Реакције са тиолом (L-Cys) су око 5 пута брже у односу на реакције са тиетром (L-Met). Већа реактивност L-Cys може се приписати различитој нуклеофилности тиола и тиетра, али и чињени да су тиоли на испитиваној рН вредности депротоновани (Слика 3.36).<sup>138</sup> Тиолатни јон ( $RS^-$ ) има јачи афинитет координовања и захваљујући његовој бољој  $\sigma$ -донаторској способности.



Слика 3.36. Дистрибуциони дијаграм за аминокиселину L-Cys у функцији pH

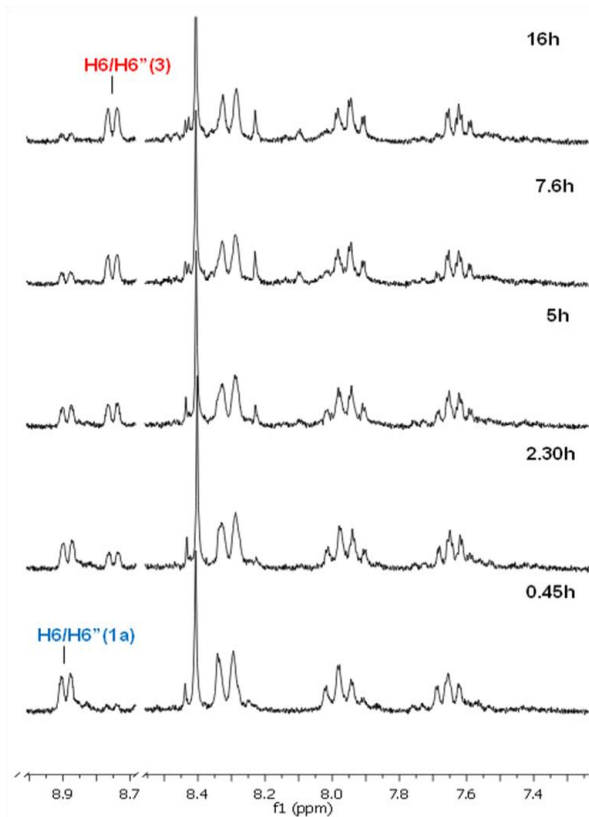
Реактивност азот-донорских лиганата опада у следећем низу: Pz > Tz > Py. Већа реактивност Pz у односу на Tz може се објаснити помоћу базности координаних азотових атома: базнији Pz (pKa = 2,52) реагује 2 пута брже у односу на Tz (pKa = 2,19), због додатних азотових атома.<sup>139,140</sup> Са друге стране, најмања реактивност Py може се објаснити делокализацијом електрона са азотовог атома који учествују у формирању везе са рутенијум(II) јоном.<sup>139</sup> Такође, мала реактивност Py се може објаснити и стерним ефектом, имајући у виду да Py садржи шесточлани прстен, за разлику од Pz и Tz који су петочлани. С обзиром да се реакција супституције одвија по А механизму, како јони метала поседују могућност да приме електронски пар улазног лиганда, наградиће се интермедијер са повећаним координационим бројем 7. Као последица тога волуминознији Py теже прилази јону метала у односу на мање волуминозан Pz и Tz.

Добијене вредности константе  $k_2$  за реакције комплекса **1** и **2** са сумпор- и азот-донорским лигандима су за један ред величине мање у односу на реакције са 5'GMP ( $0,13-1,26 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>135</sup> при истим условима. Ово указује да су деривати гуанина бољи улазни нуклеофили од испитиваних сумпор- и азот-донорских лиганата.

### 3.2.2. NMR испитивања реакције комплекса **1** и **2** са сумпор-донорским биомолекулима

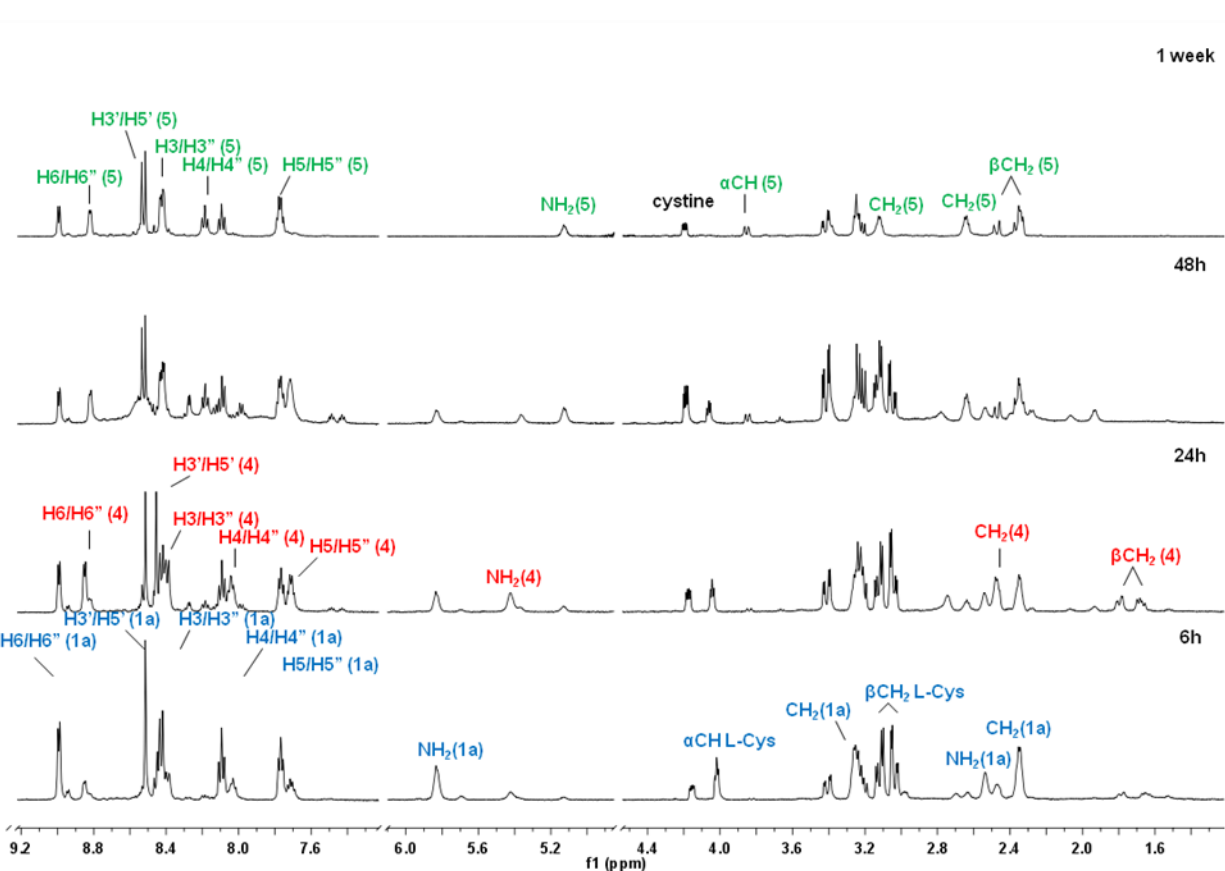
Реакције комплекса **1** и **2** са сумпор-донорским лигандима (Tu, L-Cys и L-Met) су испитиване помоћу  $^1\text{H}$  NMR спектроскопије у  $\text{D}_2\text{O}$  на 295 K у току неколико дана.

Додатак Tu у равнотежни раствор  $[\text{Ru}(\text{tpy}-\text{Cl})(\text{en})\text{Cl}]^+$  комплекса (**1**) (1:1, 5 mM, pH ~ 5) изазива споре промене у  $^1\text{H}$  NMR спектру (Слика 3.37). Нов сет сигнала у ароматичној области, приписан производу  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})(\text{en})(\text{tu})]^{2+}$  (**3**), постепено замењује сигнале који потичу од  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  (**1a**). Дублет H6/H6'' протона ( $\delta = 8,75$  ppm) је померен ка нижим вредностима хемијског померања у односу на дублет **1a** комплекса ( $\delta = 9,01$  ppm). Након 16 сати постигнута је равнотежа између **1a** и **3** у односу 2:8.



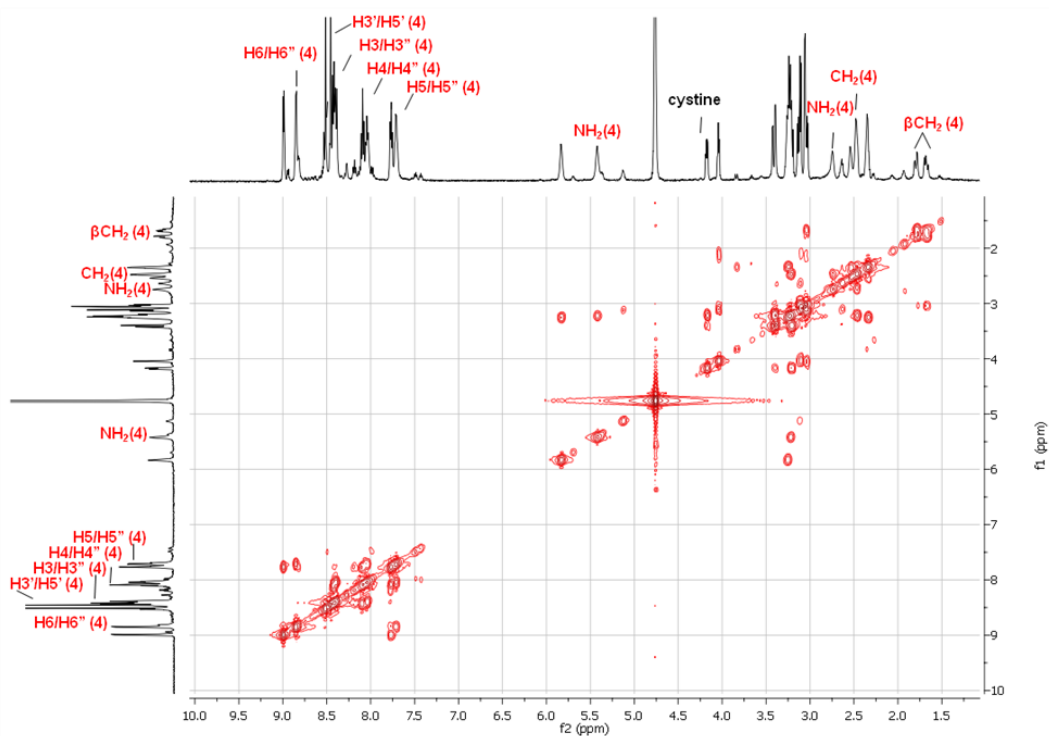
Слика 3.37.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})(\text{en})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$  комплекса (**1a**) у различитим временским интервалима након додатка Tu (1 eq, 5 mM, pH ~ 5,0) на 295 K



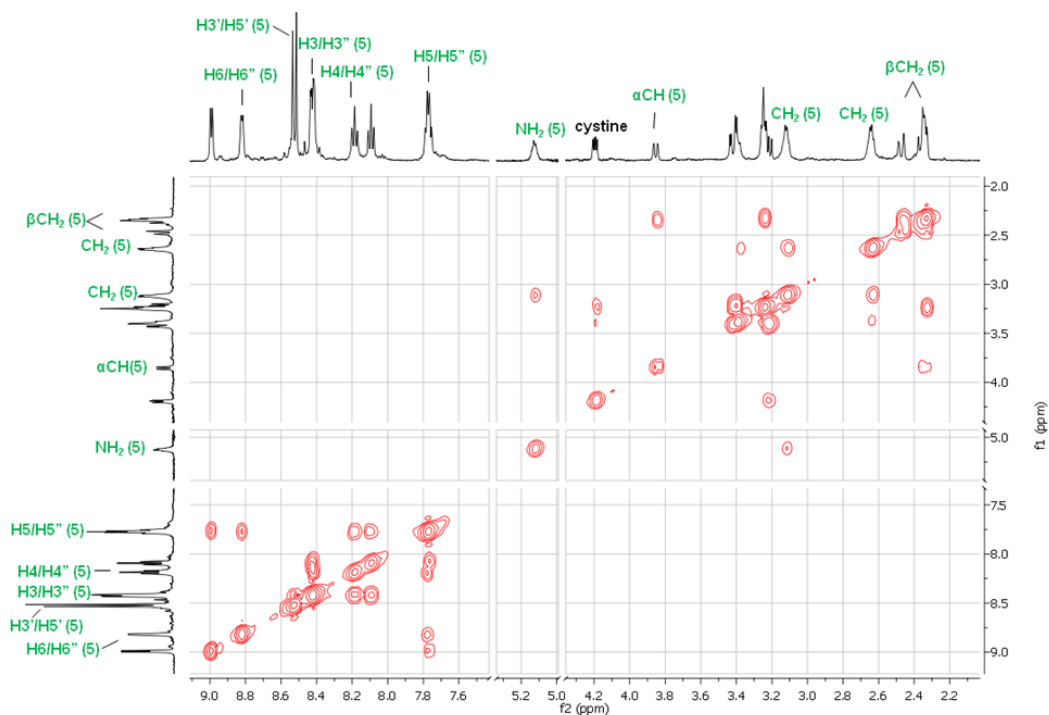


Слика 3.38.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  комплекса (**1a**) у различитим временским интервалима након додатка L-Cys (1 eq, 5 mM, pH ~ 5,0) на 295 K

Реакција L-Cys са комплексом **1a** (1:1, 5 mM, pH ~ 5) у  $\text{D}_2\text{O}$  је праћена помоћу 1D  $^1\text{H}$  и 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR спектроскопије у току једне недеље (Слика 3.38). На почетку реакције интензитет новог сета  $\text{H6/H6}''$  и  $\beta\text{-CH}_2$  резонанци ( $\delta = 8,85, 1,65$  и  $1,78$  ppm) расте са временом, док интензитет сигнала **1a** и слободног L-Cys ( $\delta = 9,01, 3,04$  и  $3,12$  ppm) опада. Овај нов сет сигнала је приписан тиолато производу  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{RS})]^+$  (**4**). Истовремено, могу се уочити неки мањи сигнали неидентификованих интермедијера као и резонанце типичне за цистин (дублет дублета на  $4,15$  ppm и пар дублет дублета на  $3,21$  и  $3,40$  ppm).<sup>67,70,73</sup> Након 24 сата, тиолато комплекс **4** постаје доминантна врста, при чему се **1a** и **4** налазе у односу 1:1 (Слика 3.39). Међутим, након 48 сати сигнали који потичу од комплекса **4** су замењени новим сетом  $\text{H6/H6}''$ ,  $\alpha\text{-CH}$  и  $\beta\text{-CH}_2$  резонанци ( $\delta = 8,81, 3,85, 2,47$  и  $2,35$  ppm), који је приписан сулфенато комплексу  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{RSO})]^{2+}$  (**5**) (Слика 3.40). Систем постиже равнотежу након два дана између **1a** и **5** у односу 1:1, док је сав неизреаговали L-Cys оксидован до цистина.

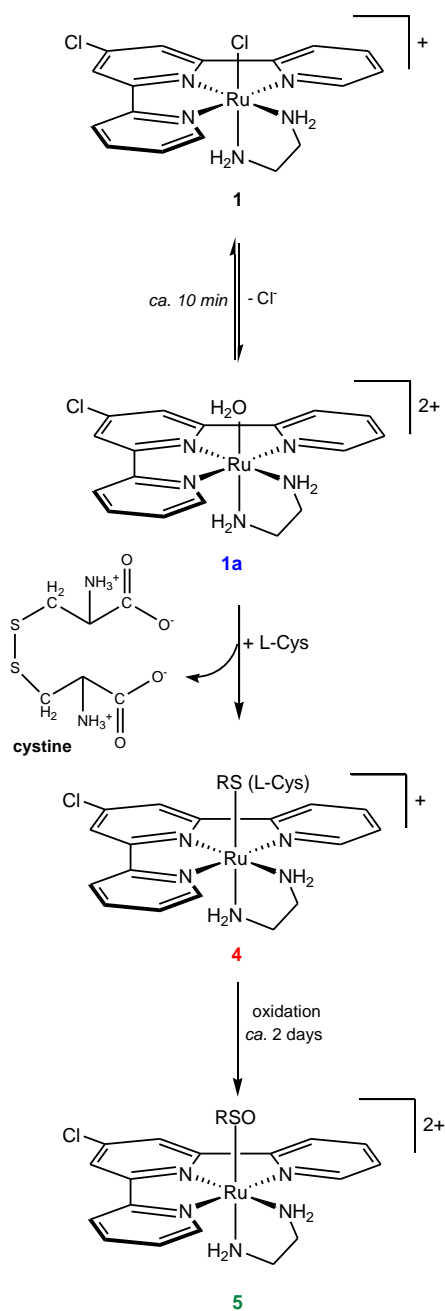


Слика 3.39. Дводимезионални  $1H-1H$  COSY NMR спектар за реакцију комплекса **1a** са *L*-Cys (1:1) у  $D_2O$  на 295 K након 24 сата



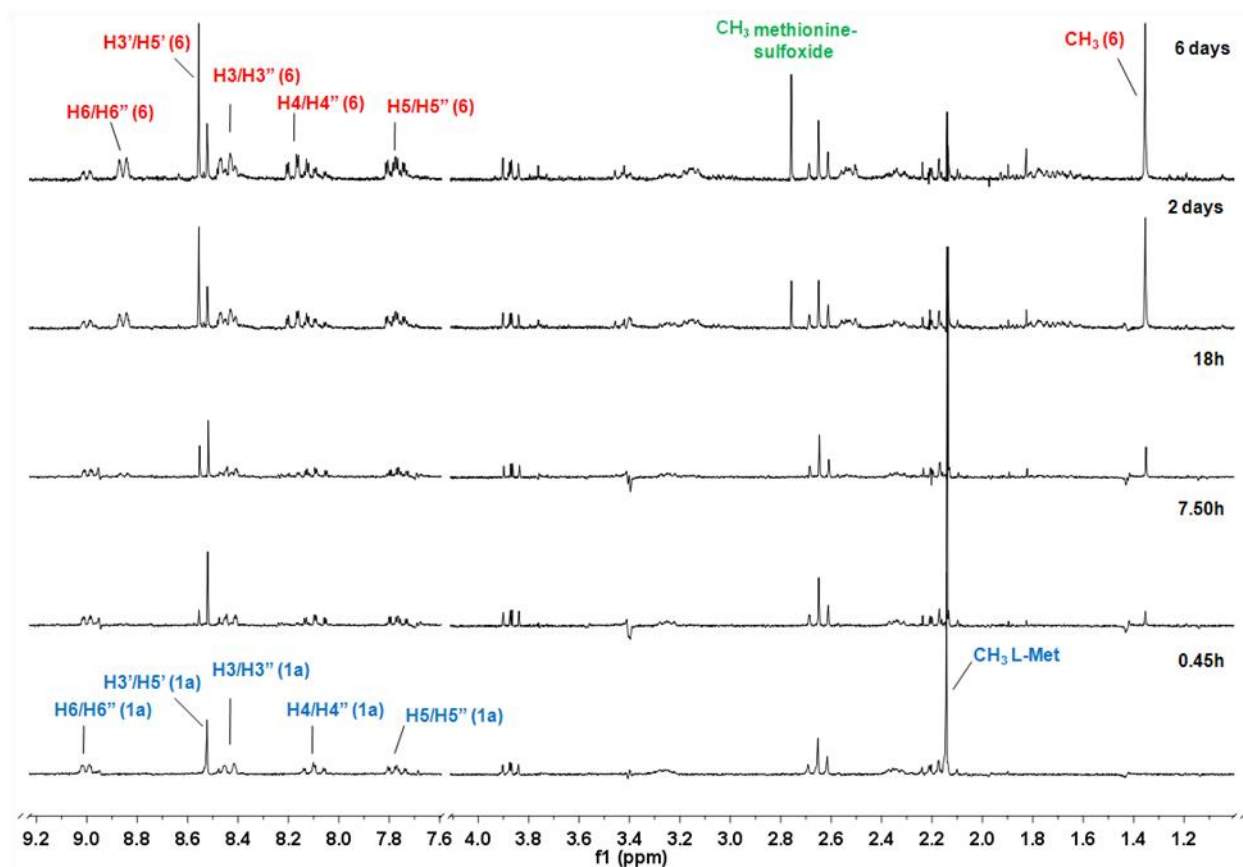
Слика 3.40. Дводимезионални  $1H-1H$  COSY NMR спектар за реакцију комплекса **1a** са *L*-Cys (1eq) у  $D_2O$  на 295 K након једне недеље

Добијени резултати помоћу NMR спектроскопије омогућавају нам да представимо реакционе путеве (Шема 3.3). L-Cys се координује за **1a** преко атома сумпора (за неколико минута) формирајући тиолато комплекс  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{SR})]^+$  (**4**), који оксидацијом координованог тиола, потпуно прелази у сулфенато комплекс  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{RSO})]^{2+}$  (**5**).

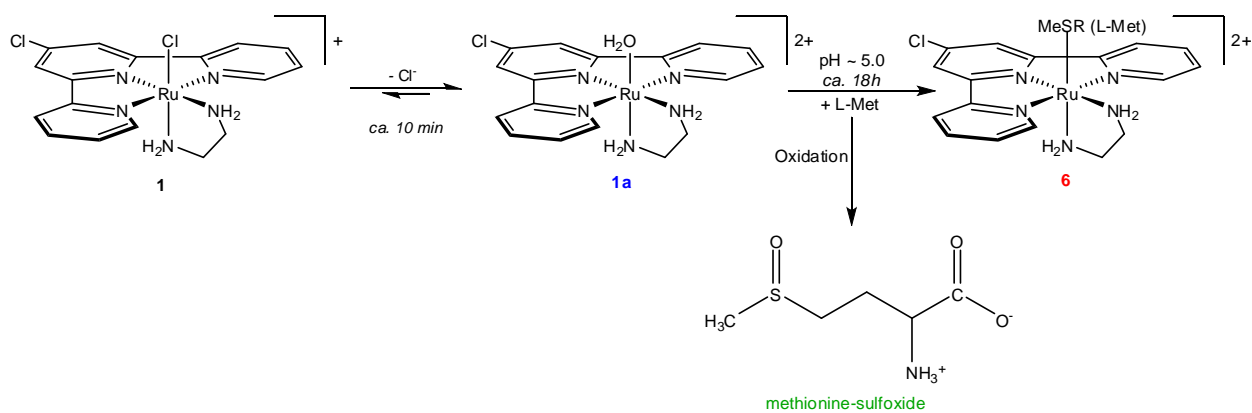


**Шема 3.3.** Реакциони путеве  $[\text{Ru}(\text{tpy-Cl})(\text{en})\text{Cl}]^+$  (**1**) са L-Cys у воденом раствору

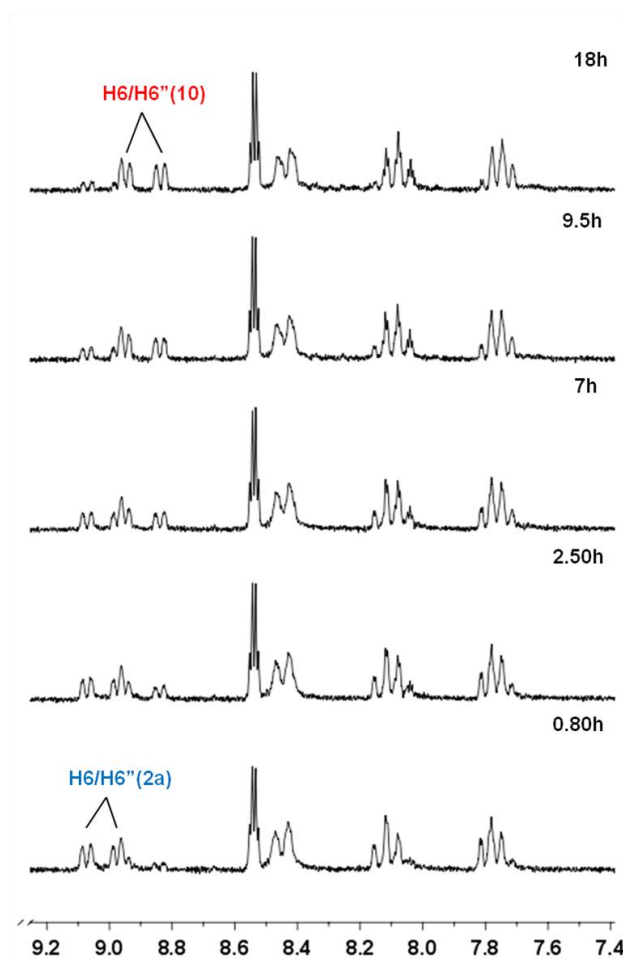
Додатак L-Met у равнотежни раствор  $[\text{Ru}(\text{tpy}-\text{Cl})(\text{en})\text{Cl}]^+$  комплекса (**1**) (1:1, 5 mM, pH ~ 5) у  $\text{D}_2\text{O}$  узрокује споре промене у  $^1\text{H}$  NMR спектру (Слика 3.41), где нов сет сигнала Cl-tpy и  $\text{CH}_3$  протона координованог L-Met, приписан производу  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})(\text{en})(\text{MeSR})]^{2+}$  (**6**), расте са временом. Нов  $\text{CH}_3$  сигнал је значајно померен ка нижим вредностима хемијског померања ( $\delta = 1,35$  ppm) у односу на слободан L-Met ( $\delta = 2,14$  ppm) због заштитног ефекта суседног Cl-tpy лиганда. Након 2 дана, појављује се нов синглет на  $\delta = 2,76$  ppm, који потиче од  $\text{CH}_3$  групе метионин-сулфооксида, тј. оксидованог облика L-Met (Слика 3.41). Ови NMR експериментални подаци указују да реакција комплекса **1** са L-Met води ка делимичном формирању само једног производа, комплекса **6**, док након два дана, услед споре оксидације слободног L-Met, долази до формирања метионин-сулфооксида (Шема 3.4). Након 6 дана систем постиже равнотежу са 44% комплекса **6**, 29% метионин-сулфооксида и 27% некоординованог L-Met.



Слика 3.41.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $[\text{Ru}(\text{Cl}-\text{tpy})(\text{en})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$  комплекса (**1a**) у различитим временским интервалима након додатка L-Met (1 eq, 5 mM, pH ~5,0) на 295 K

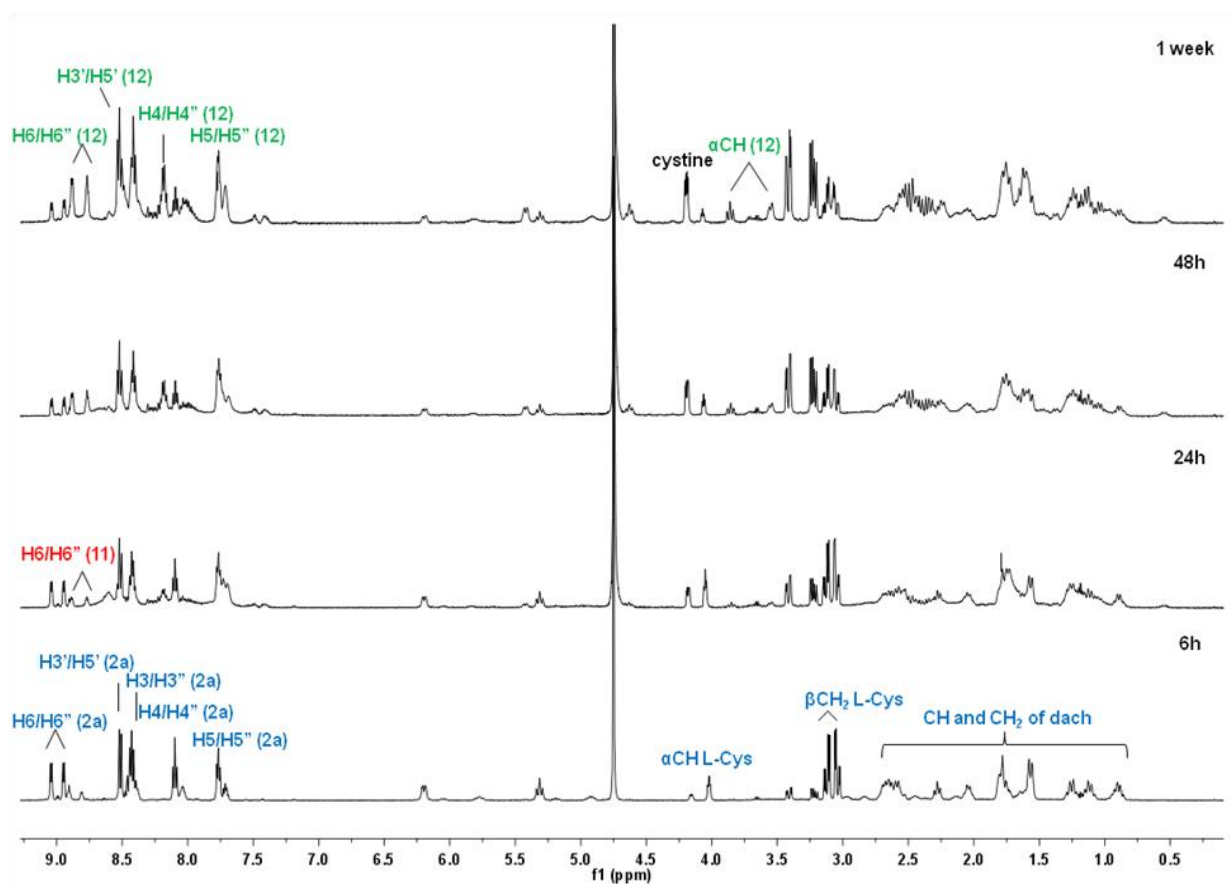


Шема 3.4. Реакциони путеви  $[\text{Ru}(\text{tpy-Cl})(\text{en})\text{Cl}]^+$  (**1**) са L-Met у воденом раствору

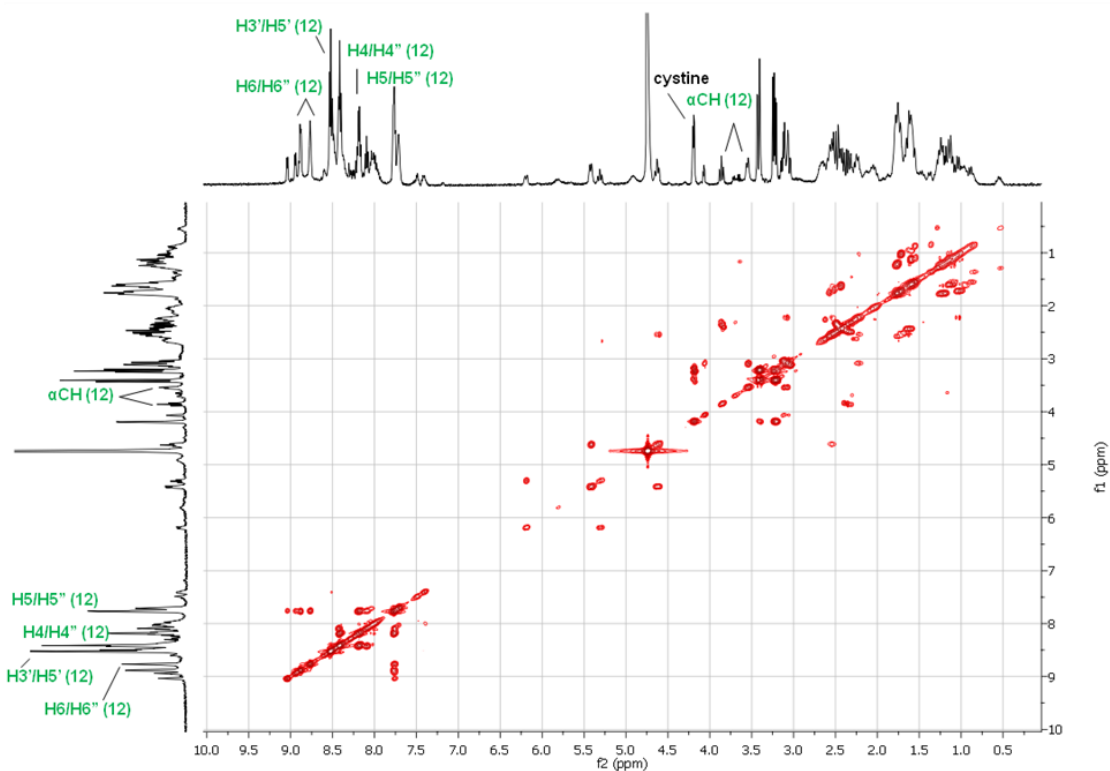


Слика 3.42.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$  (**2a**) у различитим временским интервалима након додатка  $\text{Ti}$  (1 eq, 5 mM,  $\text{pH} \sim 5,0$ ) на 295 K

Реакције  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})]^+$  (**2a**, 5 mM, pH ~ 5.00) са еквимоларном количином одговарајућих нуклеофила (Ту, L-Cys и L-Met) су у великој мери сличне са реакцијама комплекса **1a**, што се може видети на основу  $^1\text{H}$  NMR спектроскопије. Тачније, реакција комплекса **2a** са Ту води искључиво ка формирању једног производа  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{tu})]^{2+}$  (**10**). Равнотежа је постигнута након 18 сати са 77% комплекса **10** и 23% неизреаговалог комплекса **2a** (Слика 3.42). Реакција комплекса **2a** са L-Cys води до финалног производа  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{RSO})]^{2+}$  (**12**) преко формирања интермедијера  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{SR})]^+$  (**11**). Равнотежа је постигнута после једне недеље, при чему је однос између комплекса **2a** и **12** био 3:7, док је сав неизреаговали L-Cys оксидован у цистин (Слика 3.43 и 3.44).

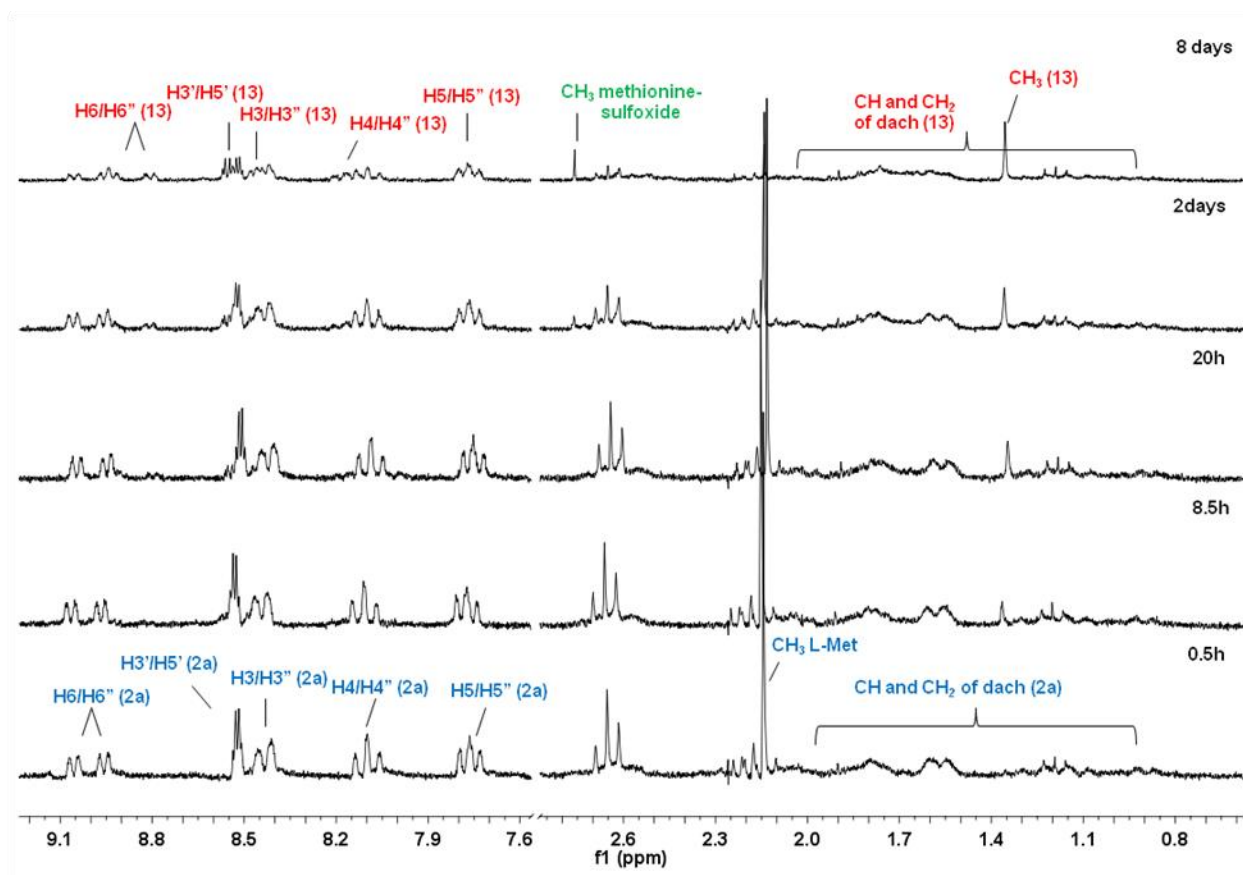


Слика 3.43.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  комплекса (**2a**) у различитим временским интервалима након додатка L-Cys (1 eq, 5 mM, pH ~ 5,0) на 295 K



Слика 3.44. Дводимензионални  $1H-1H$  COSY NMR спектар за реакцију комплекса **2a** са *L*-Cys (1eq) у  $D_2O$  на 295 K након једне недеље

Реакција комплекса **2a** са *L*-Met доводи до формирања само једног производа  $[Ru(Cl-trp)(dach)(MeSR)]^{2+}$  (**13**). После 2 дана долази до оксидације *L*-Met и формирања метионин-сулфоксида. Равнотежа је постигнута након 8 дана, са 37% координованог *L*-Met за рутенијум(II) и 12% оксидованог *L*-Met до метионин-сулфоксида (Слика 3.45).



Слика 3.45.  $^1\text{H}$  NMR спектар  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$  комплекса (2a) у различитим временским интервалима након додатка L-Met (1 eq, 5 mM, pH ~ 5,0) на 295 K

### 3.2.3. ДФТ израчунавања за систем измене Gua/SMe<sub>2</sub>

Како би се добили што поузданији, пре свега квантитативни подаци о разлици у стабилности између Ru-S(тиоетар) и Ru-N(ДНК) координације, вршена су ДФТ израчунавања на модел реакцији (3.2.3.1). Као и у случају комплекса платине,<sup>141,142</sup> узети су једноставни молекули, гуанин (gua) и диметил тиоетар (SMe<sub>2</sub>). У датој једначини (3.2.3.1) гуанин приближно одговара дериватима гуанина, S(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> представља генерички тиоетар, а N-N представља en или dach. Ради поређења, одговарајући Ru-tpy комплекс, где је N-N = bpy, такође је испитиван.



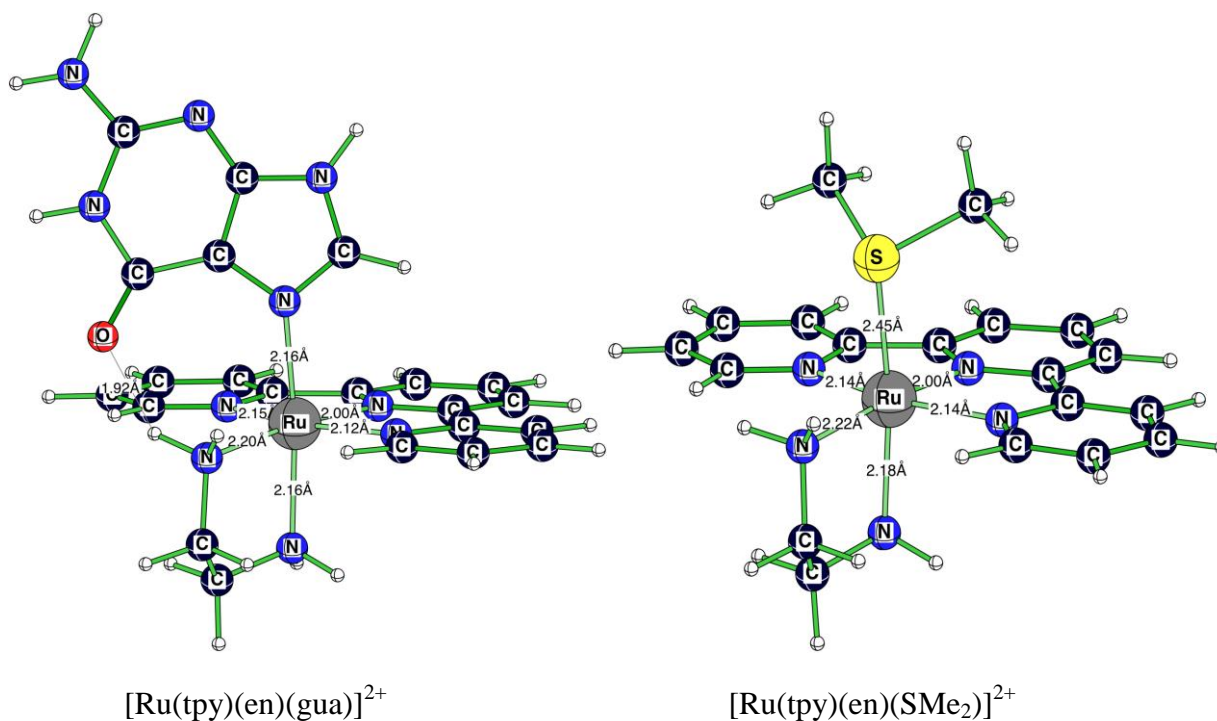


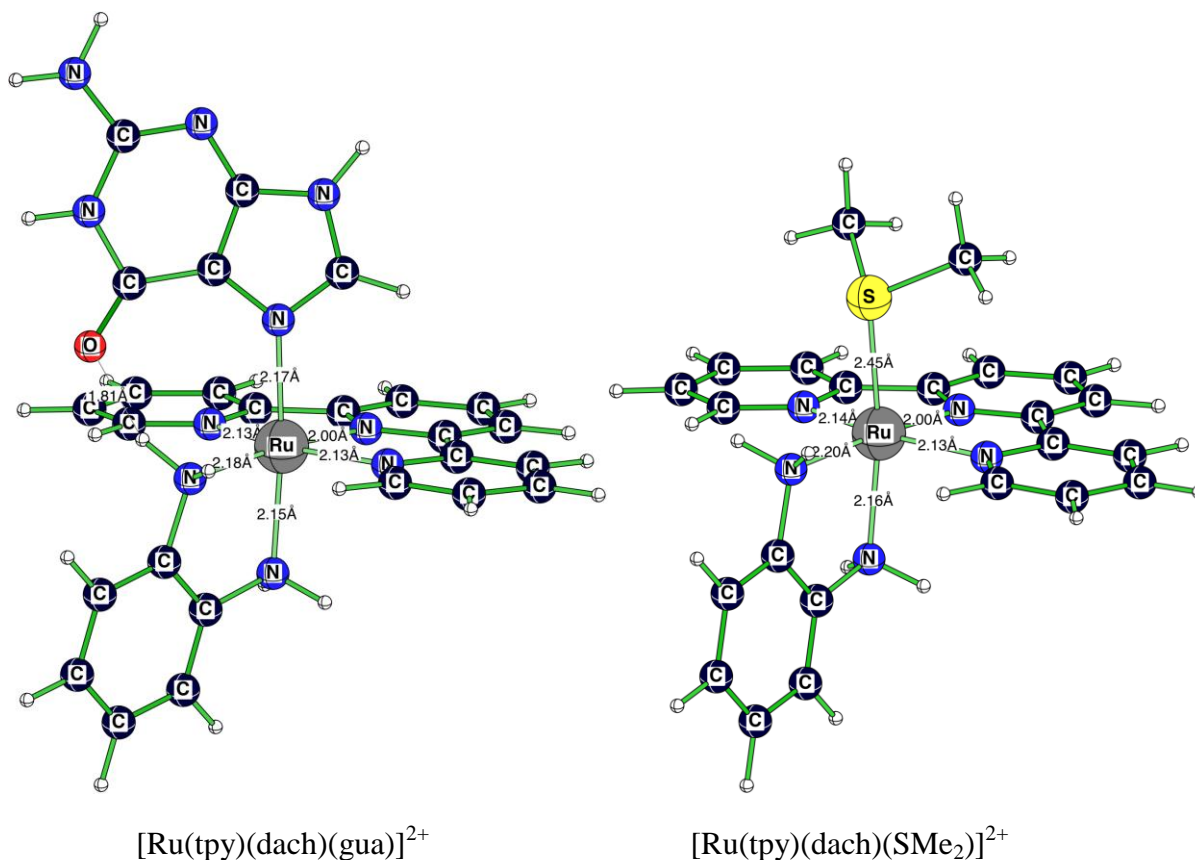
Слично комплексима платине(II),<sup>141</sup> потврђена је јасна предност координације гуанина. Разлика у стабилности је за око 30 kcal/mol за комплексе  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{en})(\text{gua})]^{2+}$  и  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{gua})]^{2+}$ , и око 20 kcal/mol за  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{gua})]^{2+}$  (Табела 3.5).

**Табела 3.5.** Израчуната енергија у kcal/mol за измену  $\text{Gua}/\text{SMe}_2$  у  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{en})(\text{gua})]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{gua})]^{2+}$  и  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{gua})]^{2+}$

N-N	B3LYP	B3LYP(CPCM)
En	+ 27,0 kcal/mol	+ 6,2 kcal/mol
dach	+ 27,1 kcal/mol	+ 6,8 kcal/mol
bpy	+ 19,2 kcal/mol	+ 4,5 kcal/mol

У испитиваним  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{en})(\text{gua})]^{2+}$  и  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{gua})]^{2+}$  комплексима формира се водонична веза између CO групе гуанина и  $\text{NH}_2$  групе en и dach (растојање  $\text{N-H}\cdots\text{O}$  износи 1,92 Å и 1,81 Å у  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{en})(\text{gua})]^{2+}$  и у  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{gua})]^{2+}$ ) (Слика 3.46). То доприноси стабилизацији производа Ru-гуанин.



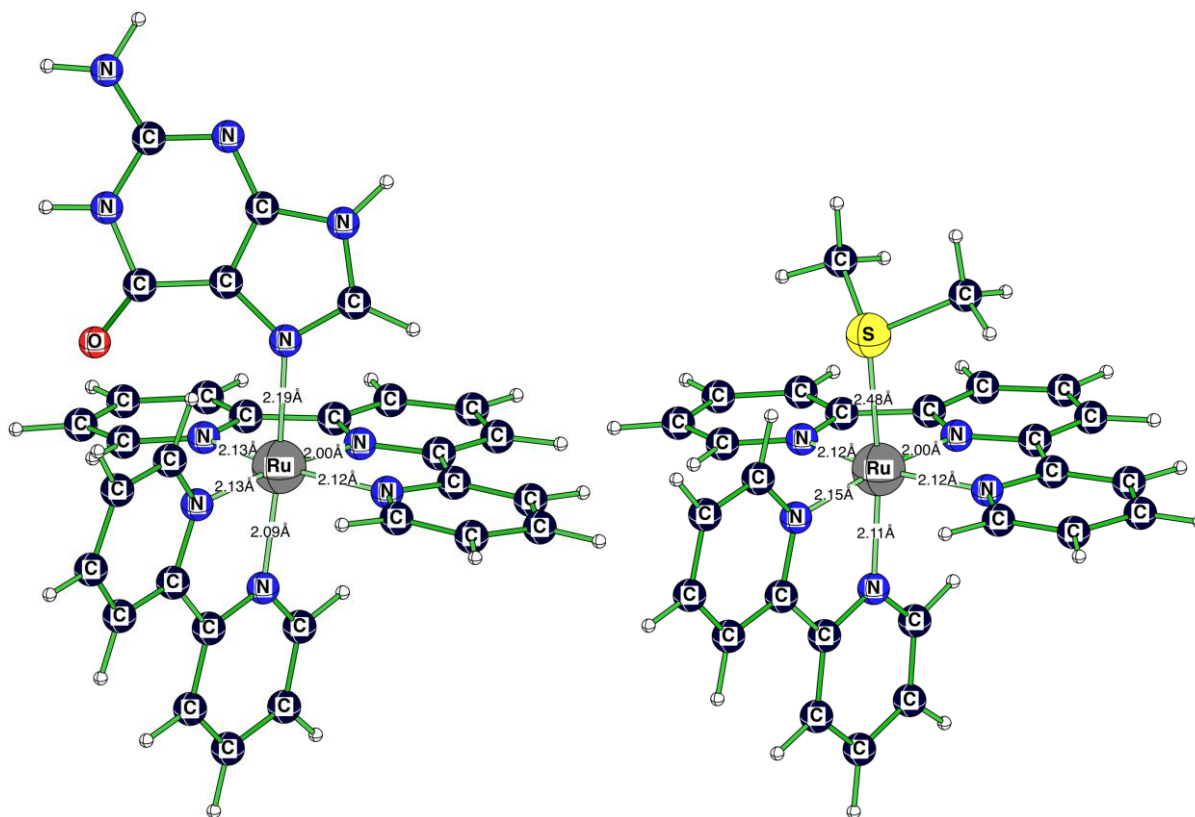


Слика 3.46. Израчунавањем (B3LYP/LANL2DZp) предвиђена структура  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{en})(\text{gua})]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{en})(\text{SMe}_2)]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{gua})]^{2+}$  и  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{SMe}_2)]^{2+}$

Упоредивањем en и dach комплекса са bpu комплексом, произилази да су en и dach комплекси за 8 kcal/mol стабилнији од dach комплекса захваљујући водоничној вези. Како би се при израчунавању узео у обзир ефекат растварача, извршена су CPCM израчунавања (B3LYP(CPCM)/LANL2DZp//B3LYP/LANL2DZp). Међутим, енергија (Табела 3.6.) добијена овим израчунавањима мања је за 50%, али је и даље координација преко гуанина јасно фаворизирана.

Даљи преглед предвиђених структура показује да је координација tpy лиганда веома слична у свим израчунаваним системима. Пиридин који се налази у средини tpy лиганда координован је за рутенијум на растојању од 2,00 Å, независно од *trans*-утицаја en, dach и bpu лиганда. Околни пиридини показују варијације у дужини веза Ru⋯N комплекса (2,12 Å – 2,15 Å). Јасан утицај *trans*-лиганда може се уочити код гуанина и

диметил тиоетра. Формално  $sp^3$ -хибридизоване  $H_2N$ -групе воде до краће Ru-N ( $[Ru(tpy)(en)(gua)]^{2+}$ : 2,16 Å,  $[Ru(tpy)(dach)(gua)]^{2+}$ : 2,17 Å) и Ru-S везе ( $[Ru(tpy)(en)(SMe_2)]^{2+}$  и  $[Ru(tpy)(dach)(SMe_2)]^{2+}$ : 2,45 Å) у односу на формално  $sp^2$ -хибридизоване придинске прстенове бру лиганда (Ru-N у  $[Ru(tpy)(bpy)(gua)]^{2+}$ : 2,19 Å, Ru-S у  $[Ru(tpy)(bpy)(SMe_2)]^{2+}$ : 2,48 Å) (Слика 3.46 и 3.47).

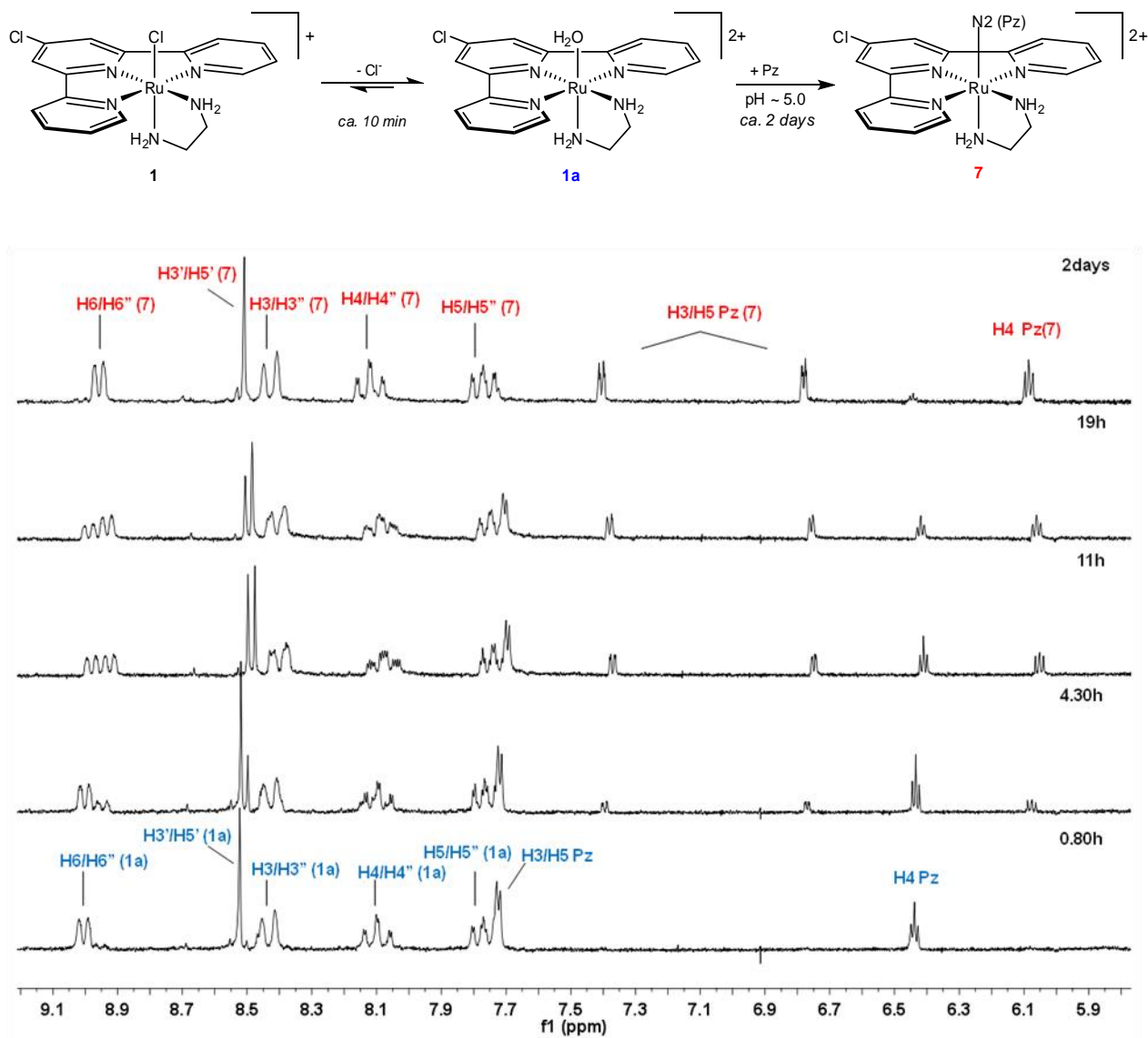


Слика 3.47. Израчунавањем (RB3LYP/LANL2DZp) предвиђене структуре  $[Ru(tpy)(bpy)(gua)]^{2+}$  (лево) и  $[Ru(tpy)(bpy)(SMe_2)]^{2+}$  (десно)

### 3.2.4. NMR испитивања реакције комплекса 1 и 2 са азот-донорским биомолекулима

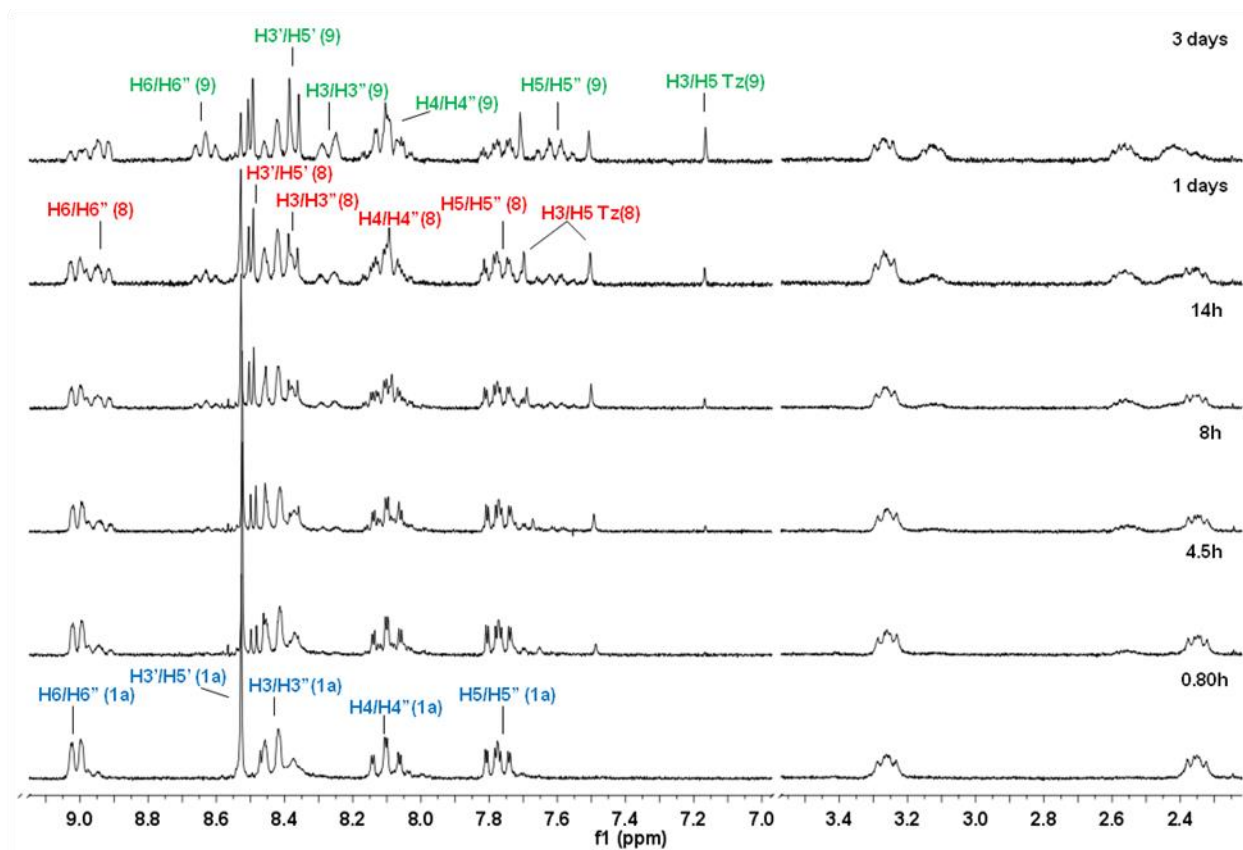
Реакција Pz са комплексом **1a** (1:1, 5 mM, pH ~ 5,0) у складу са  $^1H$  NMR резултатима, води ка формирању једног производа,  $[Ru(Cl-tpy)(en)(Pz)]^{2+}$  (**7**) (Слика 3.48). Интензитет новог сета сигнала Cl-tpy и координованог Pz расте споро са временом, док интензитет сигнала комплекса **1a** и слободног Pz опада. Интересанто је да је дублет еквивалентних H3/H5 протона слободног Pz ( $\delta = 7,72$  ppm), који је постепено замењен са

два дублета једнаких интензитета, значајно померен ка вишем пољу ( $\delta = 7,40$  и  $6,77$  ppm) због заштитног ефекта Cl-тру лиганда. Ова два дублета су приписана нееквивалентним протонима H3<sub>Pz</sub> и H5<sub>Pz</sub> комплекса **7**.



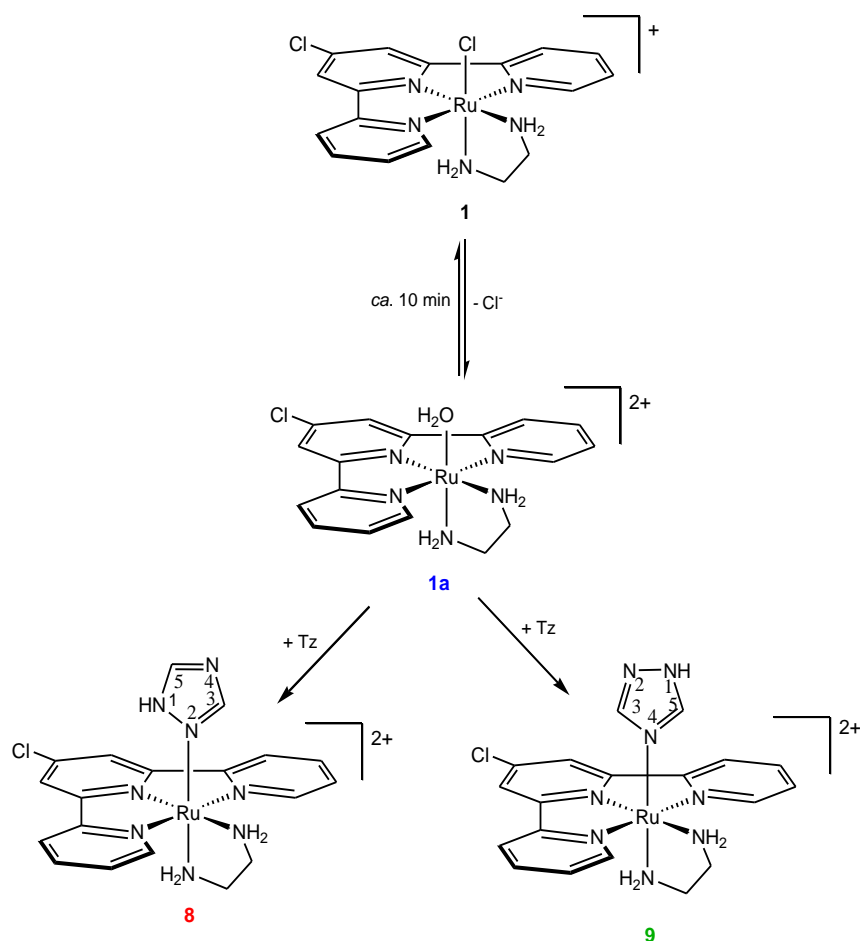
Слика 3.48. <sup>1</sup>H NMR спектри  $[Ru(Cl\text{-}trpy)(en)H_2O]^{2+}$  комплекса (**1a**) у различитим временским интервалима након додатка Pz (1 eq, 5 mM, pH ~ 5,0) на 295 K

Додатак Tz у равнотежни раствор комплекса **1** (1:1, 5 mM, pH ~ 5,0) у D<sub>2</sub>O узрокује појаву два нова сета сигнала у <sup>1</sup>H NMR спектру (Слика 3.49). Један сет сигнала, приписан производу [Ru(Cl-tpy)(en)(Tz-N2)]<sup>2+</sup> (**8**), појављује се након сат времена и постепено расте са временом. Сигнал H3/H5 протона слободног Tz (δ = 8,53 ppm) постепено је замењен са два синглета једнаких интензитета на δ = 7,69 и 7,49 ppm, који су приписани нееквивалентним протонима H3<sub>Tz</sub> и H5<sub>Tz</sub> комплекса **8**. Други H3<sub>Tz</sub>/H5<sub>Tz</sub> сигнал (δ = 7,17 ppm) приписан је производу [Ru(Cl-tpy)(en)(Tz-N4)]<sup>2+</sup> (**9**) показујући координацију преко N4 атома за рутенијум. Систем постиже равнотежу после 3 дана са 41% производа **8**, 50% производа **9** и 9% некоординованог Tz.



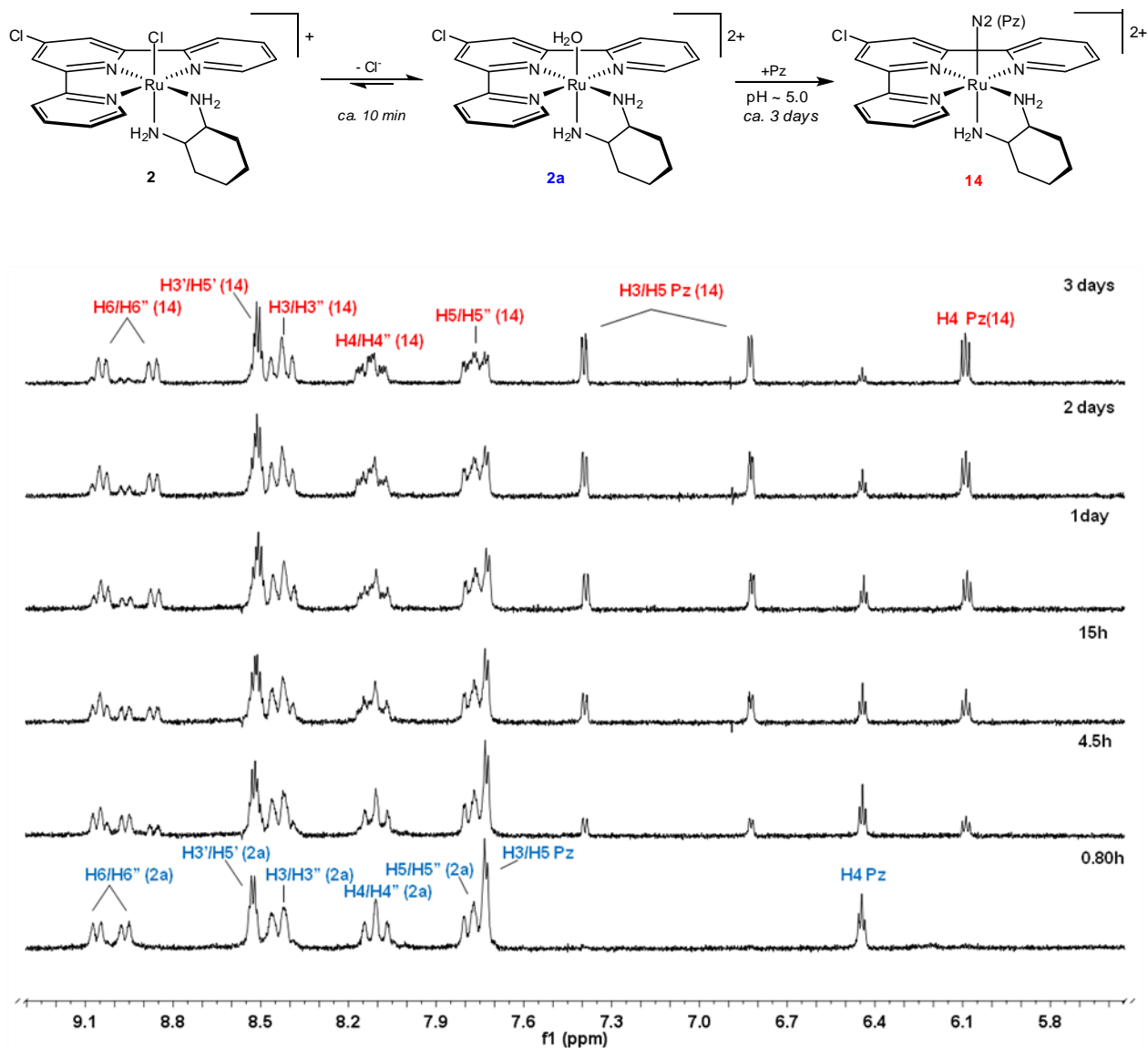
Слика 3.49. <sup>1</sup>H NMR спектри [Ru(Cl-tpy)(en)H<sub>2</sub>O]<sup>2+</sup> комплекса (**1a**) у различитим временским интервалима након додатка Tz (1 eq, 5 mM, pH ~ 5,0) на 295 K

На основу NMR експериментално добијених резултата произилази да у реакцији комплекса **1** са Tz, на почетку реакције долази до формирања N2 производа, који је кинетички фаворизованији, док након 8 сати почиње формирање термодиначки стабилнијег N4 производа (Шема 3.5).



**Шема 3.5.** Реакциони путеви [Ru(Cl-tpy)(en)Cl]<sup>+</sup> комплекса (**1**) са Tz у воденом раствору

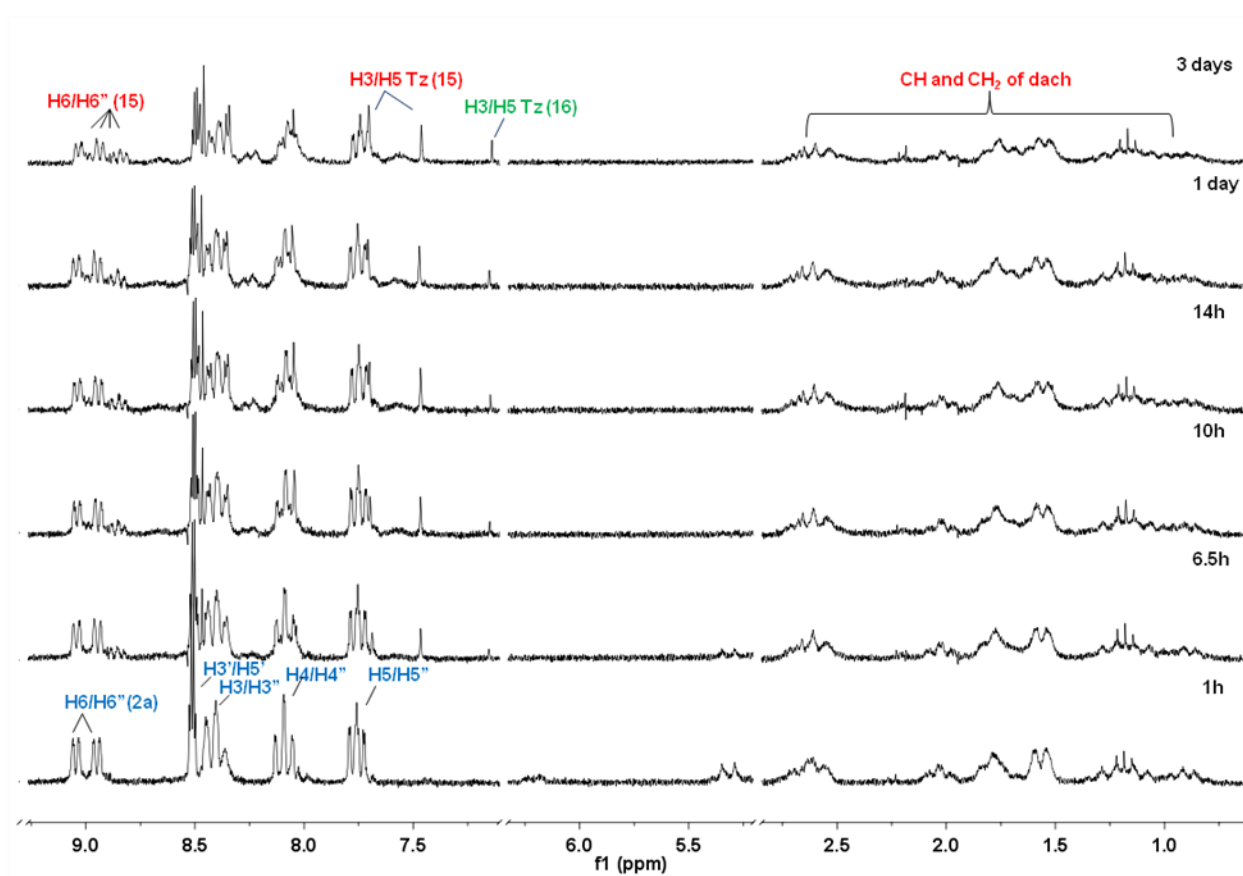
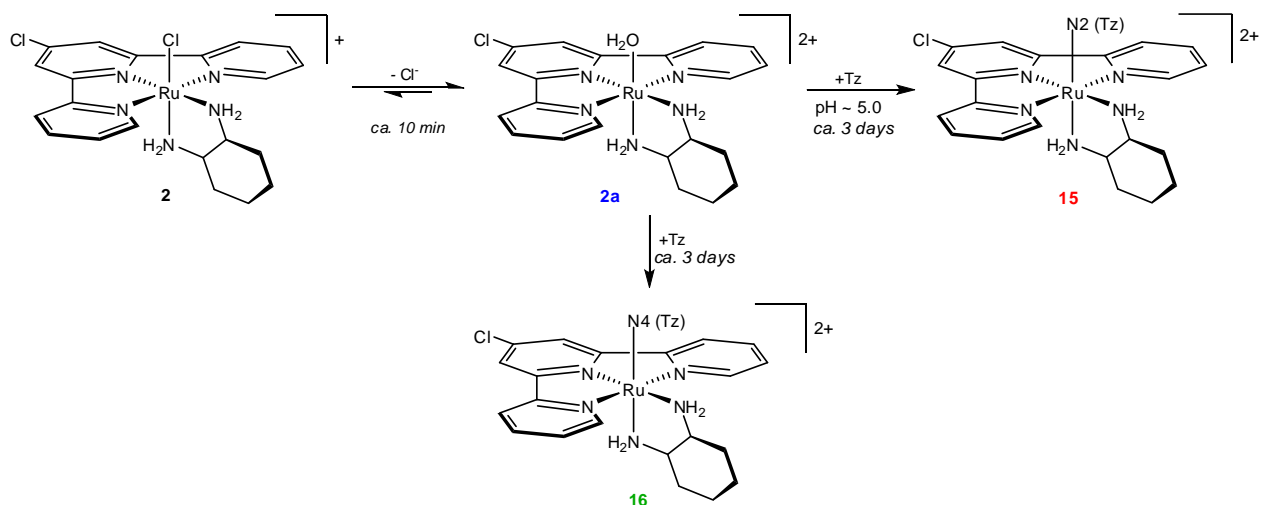
Такође, реакција комплекса **2a** са Pz (1:1, 5 mM, pH ~ 5,0) доводи искључиво до формирања једног производа [Ru(Cl-tpy)(dach)(Pz)]<sup>2+</sup> (**14**) што се може видети помоћу NMR спектроскопије (Слика 3.50). Равнотежа је постигнута после 3 дана са 82% Pz координованог за рутенијум.



Слика 3.50.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $[\text{Ru}(\text{Cl-trpy})(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  комплекса (**2a**) у различитим временским интервалима након додатка **Pz** (1 eq, 5 mM, pH ~ 5,0) на 295 K

Са друге стране, реакција комплекса **2a** са **Tz** даје два производа: комплекс у коме је координација остварена преко N2 азотовог атома,  $[\text{Ru}(\text{Cl-trpy})(\text{dach})(\text{Tz-N2})]^{2+}$  (**15**), и комплекс у коме је координација остварена преко N4 азотовог атома,  $[\text{Ru}(\text{Cl-trpy})(\text{dach})(\text{Tz-N4})]^{2+}$  (**16**) (Слика 3.51). Равнотежа је постигнута после 3 дана са 42% **Tz** координаног за рутенијум.





Слика 3.51.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $[\text{Ru}(\text{Cl-try})(\text{dach})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$  комплекса (**2a**) у различитим временским интервалима након додатка Tz (1 eq, 5 mM, pH ~ 5,0) на 295 K



Експериментално добијени резултати показују да оба рутенијум(II) терпиридин комплекса реагују са сумпор- и азот-донорским лигандима дајући монофункционалне производе. Реакције комплекса **1** и **2** са Tz доводе до формирања два нова производа, док реакције са Pz и Tu до грађења само једног производа. Реакције проучаваних комплекса са L-Cys и L-Met доводе до формирања једног главног производа и оксидованих производа слободних лиганата, тј. цистина и метионин-сулфооксида. Испитивани лиганди реагују споро са рутенијум(II) терпиридин комплексима у односу на деривате гуанина.<sup>135</sup> Мања реактивност комплекса **1** и **2** са одговарајућим сумпор- и азот-донорским биомолекулима, а висока реактивност са гуанином ДНК, предлажу да производи са аминокиселинама, пептидима и протеинима могу послужити као резервоари комплекса рутенијума и могу помоћи транспорт и допремање комплекса до ћелије канцера. Слична запажања су уочена и за реакције органометалних комплекса са аминокиселинама које садрже сумпор (L-Cys и L-Met) и дериватима гуанина.<sup>52,67,70</sup>

Додатни подаци о стабилности производа у коме је Tz координован преко N4 азотовог атома могу се добити на основу квантно хемијских израчунавања као што је приказано у Табели 3.6. У свим случајевима, N4 координација Tz за рутенијум(II) јон води ка формирању стабилнијег производа.<sup>143</sup> Ово је у сагласности са израчунатим афинитетом протона за Tz у гасној фази. Протонација N4 азотовог атома је фаворизиованија у односу на протонацију азотовог атома N2. Протонован N2 147,4 kcal/mol, протонован N4 160,3 kcal/mol. Ово се приписује наелектрисању на N2 и N4 атомима 1,2,4-триазола. N4 атом има природно наелектрисање [RP-charge]<sup>144</sup> -0,57, док N2 показује за 40% ниже наелектрисање -0,33.

**Табела 3.6.** ДФТ-израчунате релативне енергије за модел једињења **1** и **2** показујући N2 и N4 координацију за Tz

	$[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{en})(\text{Tz-N2})]^{2+}$	$[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{en})(\text{Tz-N4})]^{2+}$
B3LYP	4,6 kcal/mol	0,0 kcal/mol
B3LYP(CPCM)	3,5 kcal/mol	0,0 kcal/mol
	$[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{Tz-N2})]^{2+}$	$[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{Tz-N4})]^{2+}$

B3LYP	4,5 kcal/mol	0,0 kcal/mol
B3LYP(CPCM)	3,9 kcal/mol	0,0 kcal/mol

B3LYP:

RB3LYP/LANL2DZp + ZPE(B3LYP/LANL2DZp)

B3LYP(CPCM):

B3LYP(CPCM)/LANL2DZp + ZPE(B3LYP/LANL2DZp)//B3LYP/LANL2DZp

### 3.3. Фактори који утичу на антипролиферативну активност Ru<sup>II</sup>-[9]aneS3 комплекса: активациона кинетика и интеракције са дериватима гуанина

Alessio је заједно са својим сарадницима показао да замена η<sup>6</sup>-арена лиганда код биолошко активних органометалних комплекса са неутралним 6-електрон донорским „face-capping” лигандом, или са три монодентатна лиганда која формирају стабилан *fac*-Ru(L)<sub>3</sub> фрагмент, води ка добијању комплекса који одржавају добру цитотоксичност *in vitro*. Стога, синтетизована је нова серија рутенијум(II) „half-sandwich” комплекса опште формуле [Ru(fcl)(chel)X][Y]<sub>n</sub>, у којима је арена лиганд замењен неутралним „face-capping” макроцикличним лигандом (fcl) као што су 1,4,7-триациклононан ([9]aneS3), 1,4,7-триазациклононан ([9]aneN3), chel је неутрални или анјонски хелатни лиганд (*N-N*, као што су en, dach, bpy или супституисан bpy, супституисани триазоли; *O-O*, оксалат, малонат, асас; *N-O*, пиколинат (pic)), X је Cl или dmsO-S, а Y је CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, PF<sub>6</sub> или Cl (n зависи од наелектрисуња хелата и X).<sup>76-80</sup>

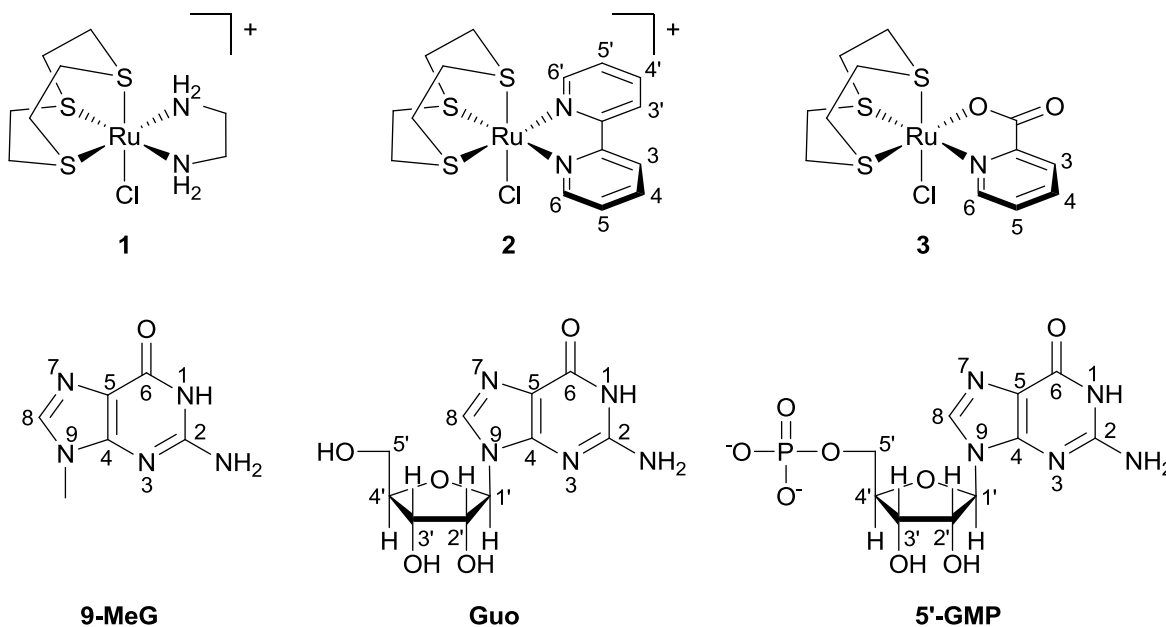
Антипролиферативна активност ових комплекса испитивана је према хуманој ћелијској линији карцинома дојке MDA-MB-231. Добијени резултати су показали да [Ru([9]aneS3)(en)Cl][PF<sub>6</sub>] и [Ru([9]aneS3)(dach)Cl][PF<sub>6</sub>] комплекси показују *in vitro* цитотоксичност (IC<sub>50</sub> = 80 μM (en) и 124 μM (dach)).<sup>79</sup>

#### 3.3.1. Хемијско понашање Ru-[9]aneS3 комплекса 1, 2 и 3 у воденом раствору

Комплекси [Ru([9]aneS3)(en)Cl][PF<sub>6</sub>] (**1**) и [Ru([9]aneS3)(pic)Cl] (**3**) (Слика 3.52) у воденом раствору подлежу релативно брзо хидролизи Cl<sup>-</sup> лиганда на собној температури (< 2 минута за **1**, и око 10 минута за **3**) дајући одговарајуће аква врсте

$[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  (**1a**) и  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})]^+$  (**3a**).<sup>79</sup> Комплекс  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  (**2**) (Слика 3.52) хидролизује спорије у односу на комплексе **1** и **3** и у знатно мањој мери. Равнотежа између комплекса **2** (30%) и аква врсте  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ , **2a** (70%), постиже се у току 30 минута.

Интеракције комплекса **1**, **2** и **3** са дериватима гуанина (9MeG, Guo и 5'-GMP) су посматране додавањем одговарајућег лиганда у равнотежни раствор комплекса (2 min, 10 min и 30 min након растварања комплекса **1**, **2** и **3**).



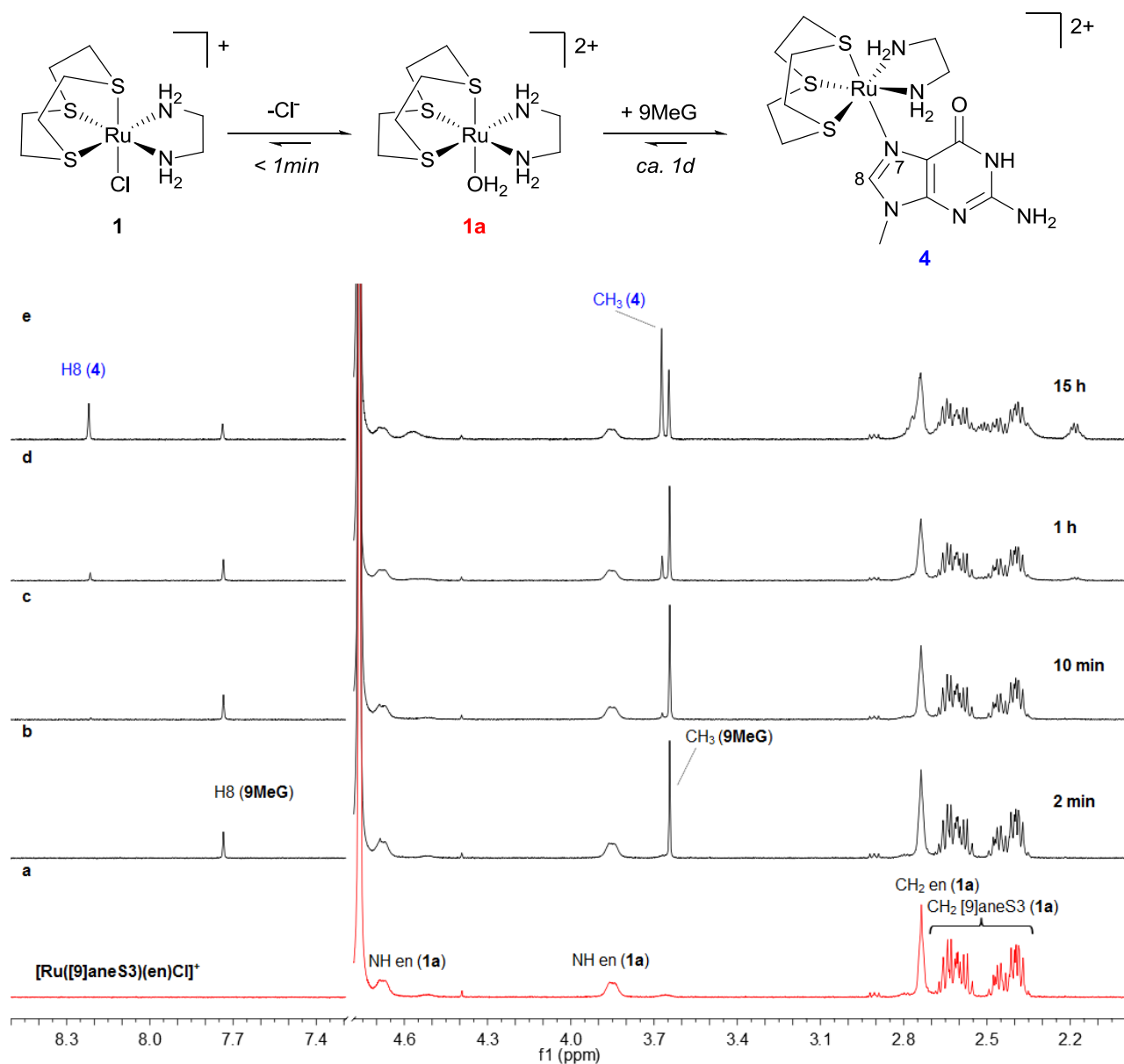
Слика 3.52. Структурне формуле испитиваних комплекса и лиганда

### 3.3.2. NMR испитивања

Реактивност комплекса **1**, **2** и **3** са три деривата гуанина је испитивана помоћу  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  NMR спектроскопије у  $\text{D}_2\text{O}$  на 298 K.

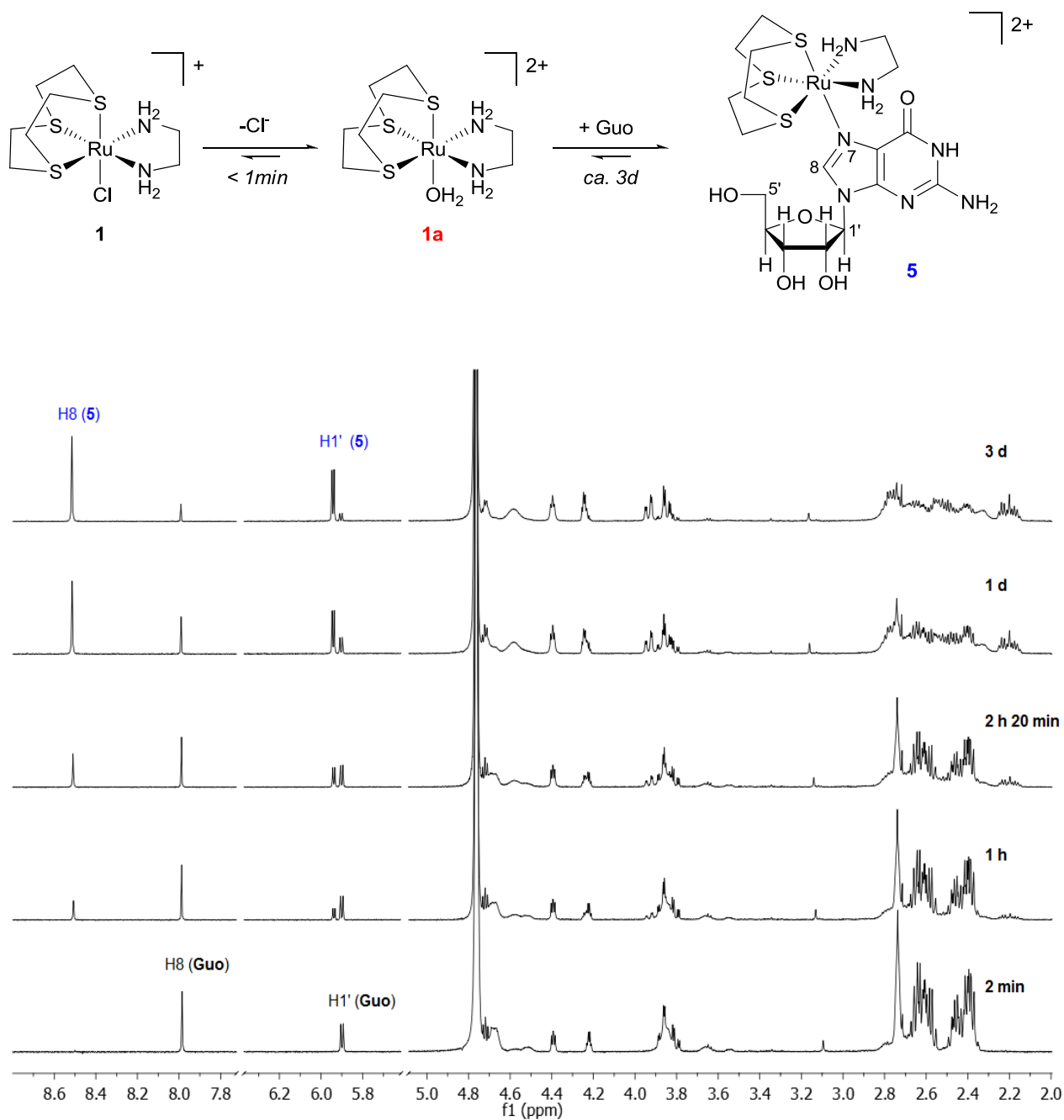
$[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  (**1**).  $^1\text{H}$  NMR спектар комплекса **1** не показује брзе промене након додавања 9MeG (1 eq, 4 mM, pH = 7,60) (Слика 3.53). Нов сет Н8 и  $\text{CH}_3$  сигнала ( $\delta = 8,22$  и  $3,67$  ppm), померен је ка нижем пољу у односу на сигнале слободног 9MeG ( $\delta = 7,74$  и  $3,65$  ppm). Ово померање Н8 протона ка вишим вредностима хемијског

померања, које је типично за N7 везивање пуринских база за јоне метала,<sup>145,146</sup> указује да се рутенијум(II) везује за N7 атом 9MeG. Нове резонанце су приписане производу  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})(\text{9MeG-N7})]^{2+}$  (**4**). Равнотежа је постигнута након 30 сати, у односу 5:1 између производа **4** и слободног 9MeG.



**Слика 3.53.** <sup>1</sup>H NMR спектар  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}]^+$  комплекса (**1**, 4 mM) 5 минута након растварања у D<sub>2</sub>O (a) и у различитим временским интервалима (б-е) након додавања 9MeG (1eq, pH = 7,60, 298 K)

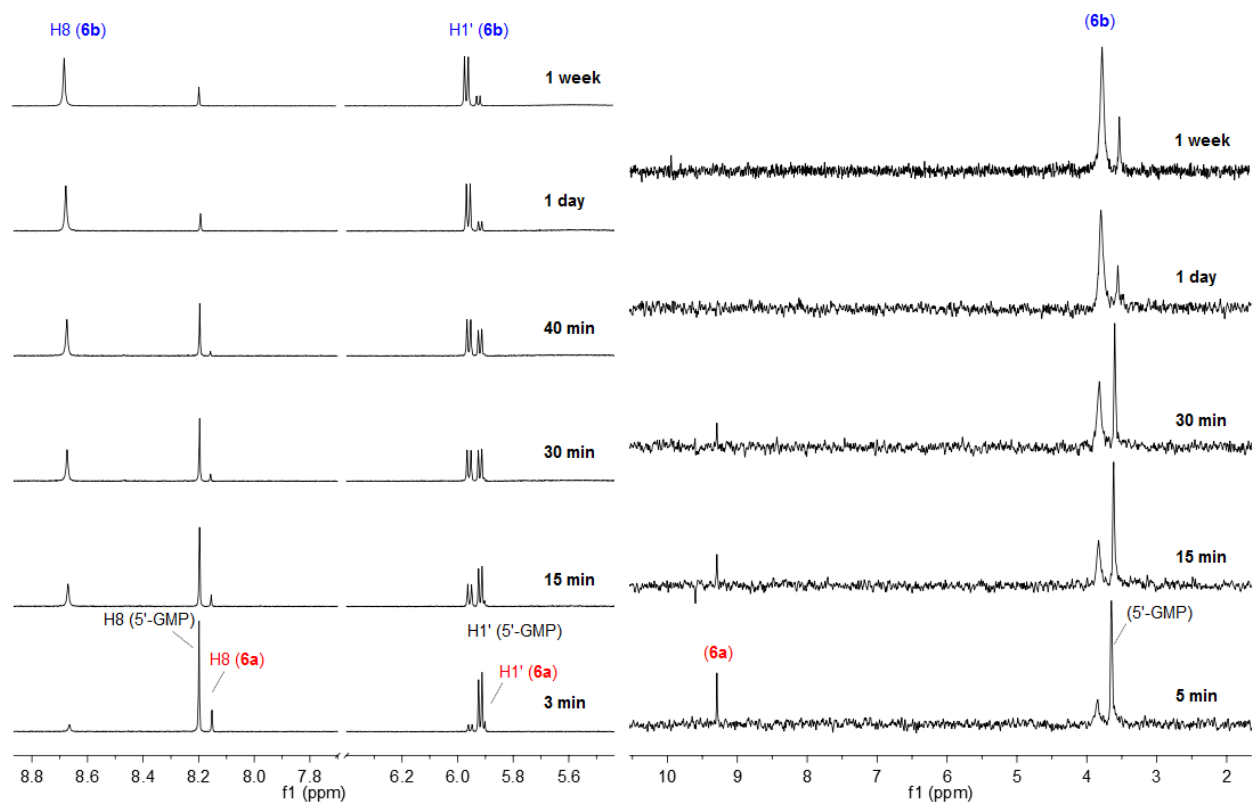
Реакција Guo са комплексом **1** (1:1, 4 mM, pH = 7,63) у D<sub>2</sub>O води ка формирању само једног производа [Ru([9]aneS3)(en)(Guo-N7)]<sup>2+</sup> (**5**) што се може видети на основу новог сета сигнала у NMR спектру (Слика 3.54). Након 3 дана постигнута је равнотежа у односу 9:1 између комплекса **5** и слободног Guo.



Слика 3.54. <sup>1</sup>H NMR спектри за реакцију [Ru([9]aneS3)(en)Cl]<sup>+</sup> комплекса (**1**) и Guo (1:1, 4 mM, D<sub>2</sub>O, pH 7,63, 298 K) у различитим временским интервалима

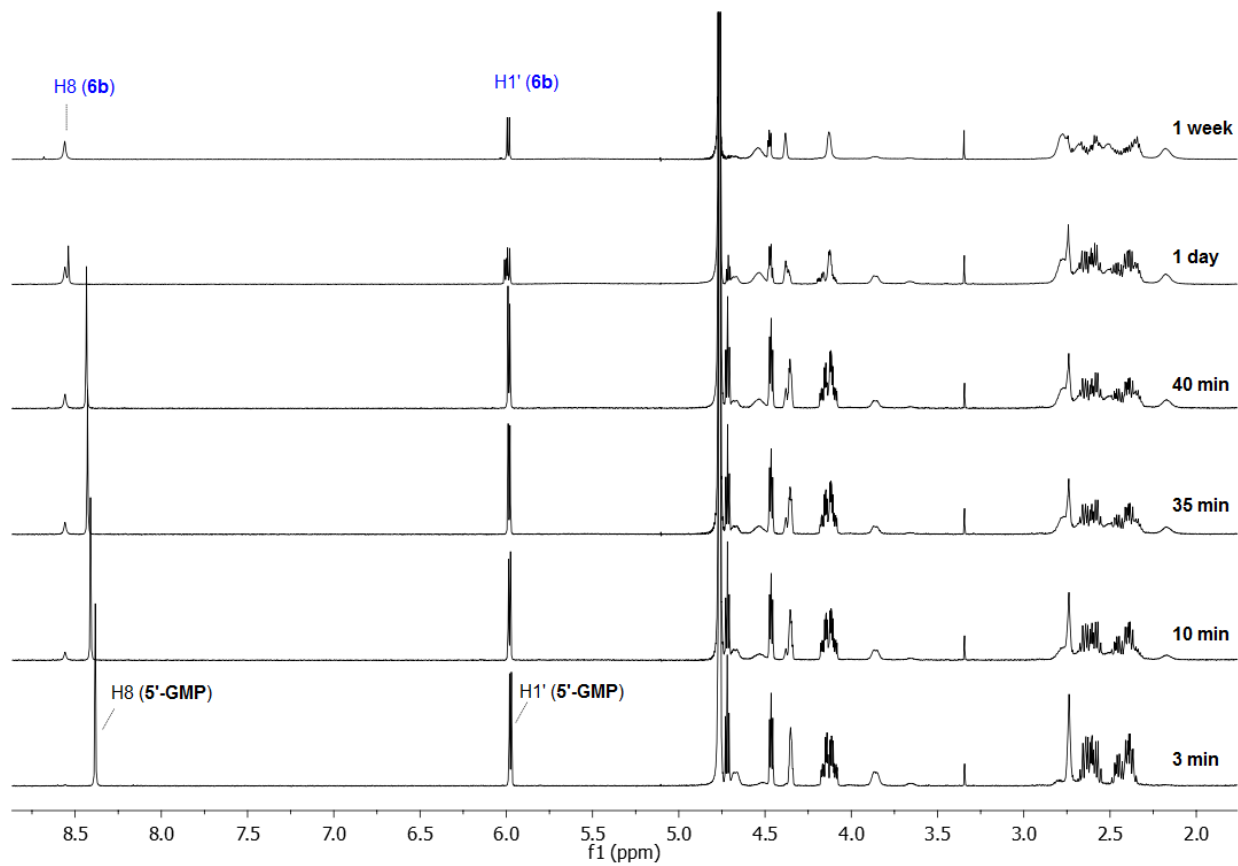
Реакција 5'-GMP са комплексом **1** (1:1, 10 mM, pH = 7,60) у D<sub>2</sub>O је праћена помоћу <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P NMR спектроскопије у току једне недеље (Слика 3.55). У овом случају, додавање 5'-GMP у равнотежни раствор **1** изазива појаву два нова сигнала H8 протона. Један сигнал ( $\delta = 8,15$  ppm), померен ка вишем пољу у односу на слободан 5'-GMP ( $\delta = 8,20$  ppm), појавио се одмах након мешања али је нестао након сат времена. Ова појава сигнала H8 протона на нижој вредности хемијског померања указује на координацију рутенијума(II) за кисеоников атом фосфатне групе.<sup>52,147</sup> Интензитет другог H8 сигнала, који је значајно померен ка нижем пољу ( $\delta = 8,66$  ppm), постепено расте са временом. Аналогне спектралне промене су добијене, такође, и у области H1' протона ( $\delta = 5,92$  ppm за слободан 5'-GMP), где се појављују два нова дублета одмах након мешања. Један дублет на  $\delta = 5,91$  ppm је у почетку био интензивнији, али је нестао након сат времена, док интензитет другог дублета ( $\delta = 5,95$  ppm) постепено расте са временом. За мање од 24 сата постигнута је равнотежа, при чему је 86% 5'-GMP везано за рутенијум(II).

<sup>31</sup>P NMR спектар је у сагласности са <sup>1</sup>H NMR резултатима (Слика 3.55). Један нов, интензиван пик, који је значајно померен ка нижем пољу ( $\delta = 9,92$  ppm), у односу на слободан 5'-GMP ( $\delta = 3,63$  ppm), појавио се одмах након мешања, а затим нестао у току сат времена. Интензитет другог сигнала, који је слабо померен ка нижем пољу ( $\delta = 3,80$  ppm), постепено расте са временом. Ови NMR експериментални резултати сугеришу да се реакција комплекса **1** са 5'-GMP одвија преко формирања интермедијера, производ са 5'-GMP везаним преко кисеониковог атома [Ru([9]aneS3)(en)(5'-GMP-O(PO<sub>3</sub>))] (**6a**), док на крају долази до формирања финалног производа са N7 везаним 5'-GMP [Ru([9]aneS3)(en)(5'-GMP-N7)] (**6b**).



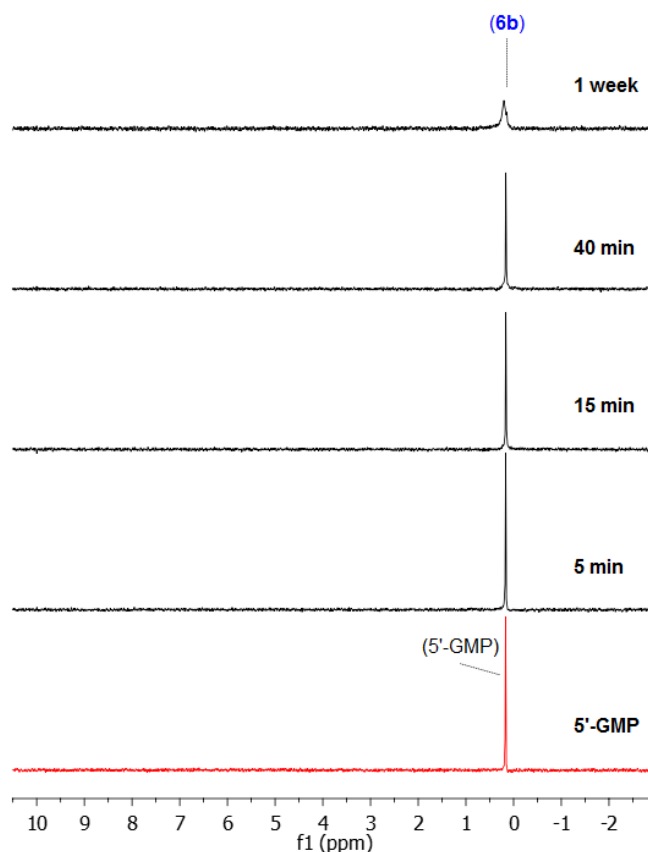
**Слика 3.55.**  $^1\text{H}$  NMR (лево) и  $^{31}\text{P}$  NMR (десно) спектралне промене током реакције  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}]^+$  комплекса (**1**) са 5'-GMP (1:1, 10 mM, pH 7,60, 298 K) у  $\text{D}_2\text{O}$  при различитим временским интервалима; **6a** =  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})(5'\text{-GMP-O}(\text{PO}_3))]$ , **6b** =  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})(5'\text{-GMP-N7})]$

Ради потврде идентитета интермедијера и производа, иста реакција је изведена при ниској pH вредности (pH = 3,30) на којој су фосфатна група и N1 атом протонисани (pKa = 6,3 и 9,5), док је N7 атом депротонисан и доступан за координовање (pKa = 2,4).<sup>148</sup> При овим условима,  $^1\text{H}$  NMR спектар (Слика 3.56) показује споро формирање само једне врсте, што се може видети на основу сигнала H8 и H1' протона ( $\delta = 8,56$  и  $5,98$  ppm), који су померени ка нижем пољу у односу на слободан 5'-GMP. Ови сигнали су приписани производу  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})(5'\text{-GMP-N7})]$  (**6b**). Исто се може уочити и применом  $^{31}\text{P}$  NMR спектроскопије (Слика 3.57).



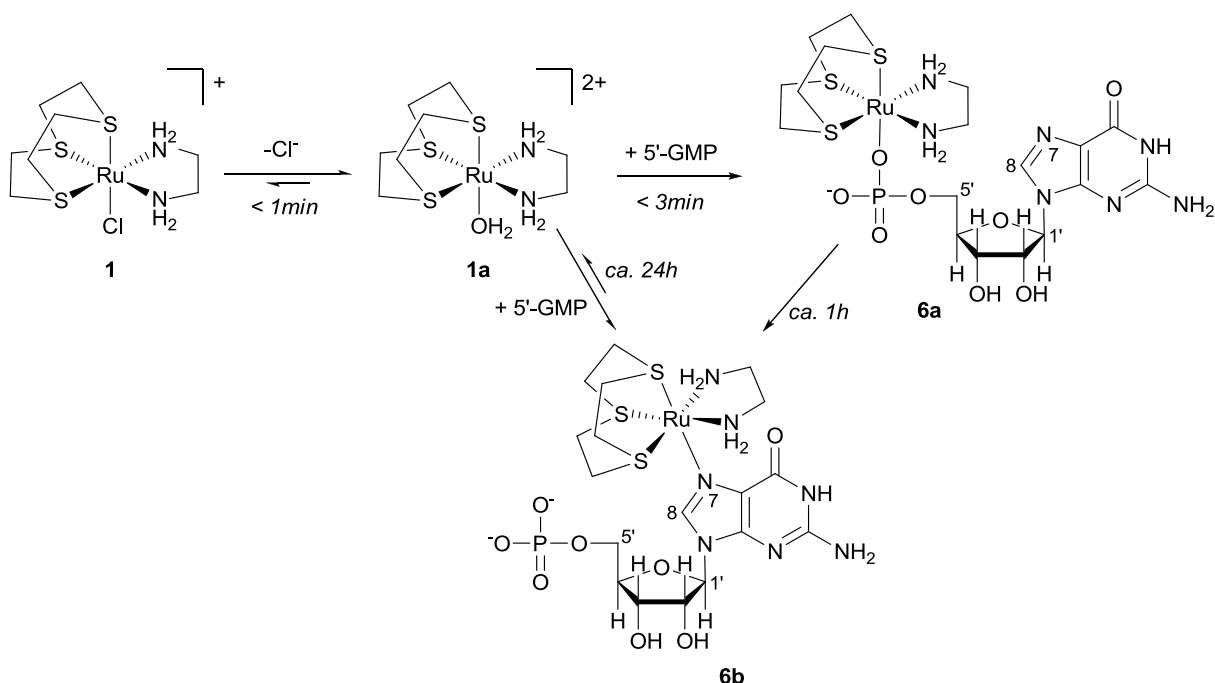
Слика 3.56.  $^1\text{H}$  NMR спектри за реакцију  $[\text{Ru}([9]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}]^+$  комплекса (**1**) и 5'-GMP (1:1, 10 mM,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 3,30, 298 K) у различитим временским интервалима





**Слика 3.57.**  $^{31}\text{P}$  NMR спектри за реакцију  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}]^+$  комплекса (**1**) и 5'-GMP (1:1, 10 mM,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 3,30, 298 K) у различитим временским интервалима

На основу добијених NMR резултата, реакција комплекса **1** са 5'-GMP може се представити помоћу Шеме 3.6. 5'-GMP се координује за **1a** преко фосфатне групе у првих неколико минута, а затим преко N7 атома у току неколико сати. За време реакције долази до комплетне миграције рутенијум(II) фрагмента са фосфатне групе на N7 атом. Слична запажања су публикована и за реакције органометалних комплекса  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  са 5'-GMP.<sup>62</sup>

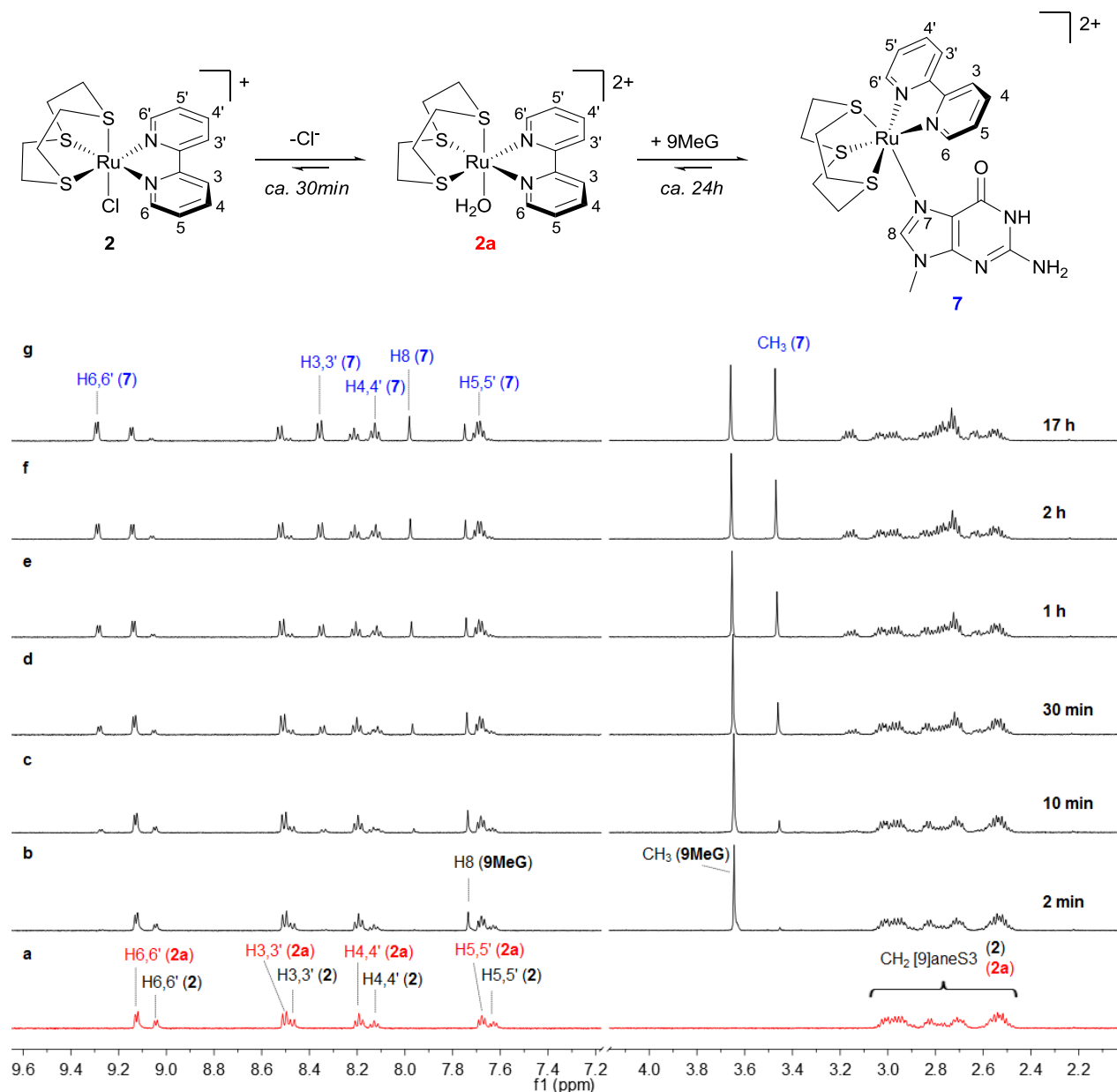


**Шема 3.6.** Интеракција  $[Ru([9]aneS3)(en)Cl]^+$  комплекса (**1**) са 5'-GMP у воденом раствору

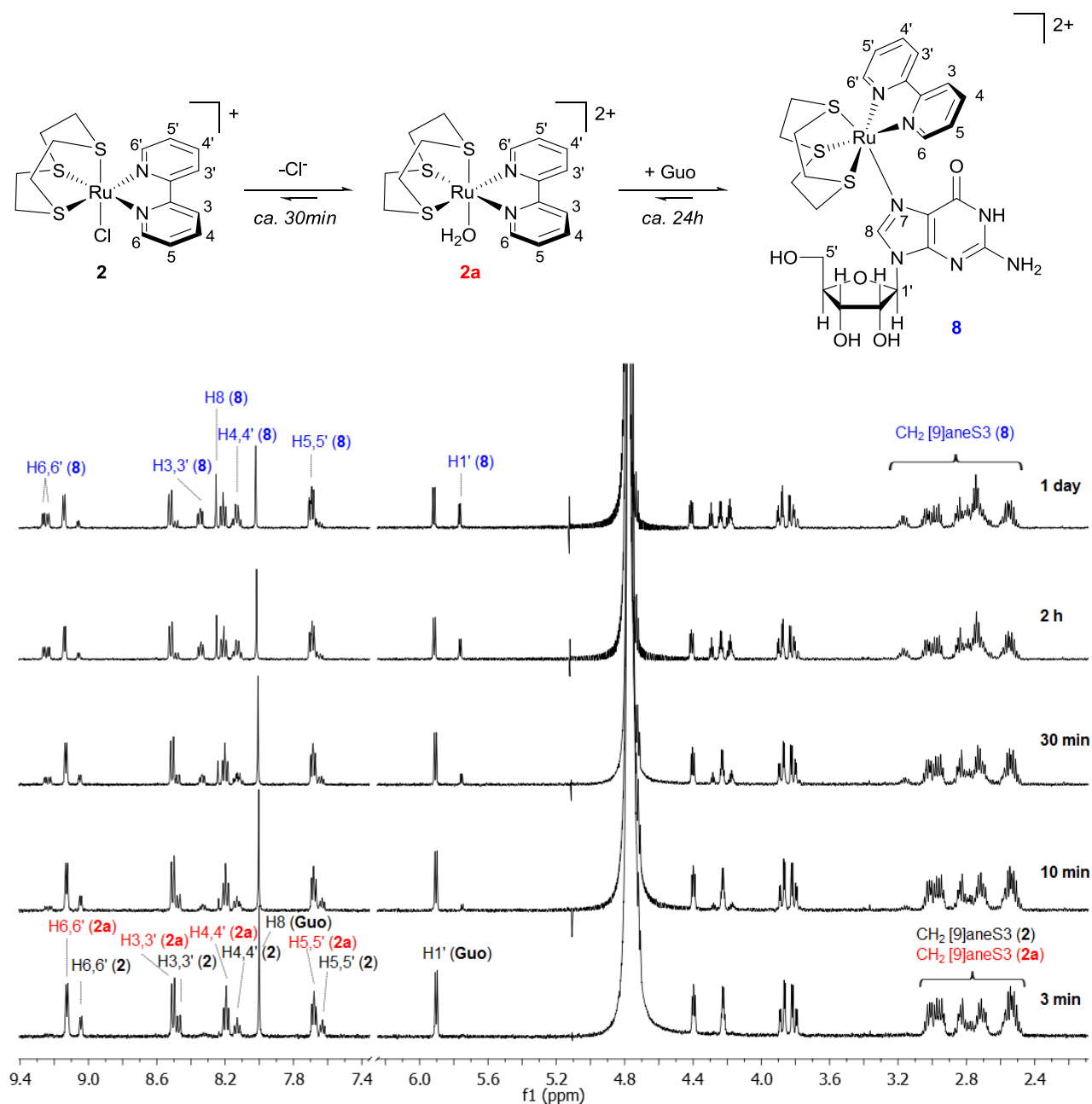
**$[Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF_6]$  (**2**).** Додавање 9MeG у равнотежни раствор  $[Ru([9]aneS3)(bpy)Cl]^+$  (**2**) (1:1, 4 mM, pH = 7,88) у  $D_2O$  узрокује споре промене у  $^1H$  NMR спектру (Слика 3.58). Нов сет сигнала који потиче од bpy и координованог 9MeG приписан је производу  $[Ru([9]aneS3)(bpy)(9MeG-N7)]^{2+}$  (**7**). Равнотежа је постигнута после 17 сати, при чему је, интегралнењем спектра, нађено да је 55% рутенијума(II) везано за 9MeG (**7**).

Такође, реакција комплекса **2** са Guo (1:1, 4 mM, pH = 7,74) доводи до формирања једног производа  $[Ru([9]aneS3)(bpy)(Guo-N7)]^{2+}$  (**8**) (Слика 3.59). Након мешања, нов сет сигнала који припада производу **8** постепено замењује сигнале који потичу од слободног Guo и **2a**. Као што је очекивано, H8 сигнал је померен ка нижем пољу ( $\delta = 8,25$  ppm), а H1' сигнал ка вишем пољу ( $\delta = 5,77$  ppm) у односу на сигнал слободног Guo ( $\delta = 7,99$  и 5,90 ppm). Важно је напоменути да је сваки сигнал који потиче од bpy раздвојен на два сигнала једнаких интензитета, који су делимично преклопљени, осим за H6/H6'. Стереогени центри на координованом Guo узрокују губитак равни симетрије коју чине еквивалентни пиридилски прстенови bpy у комплексу **2**. Равнотежа се постиже после

једног дана при чему је 40% Guo везано за рутенијум(II) (**8**), док је у раствору остало 51% аква врсте **2a** и 9% комплекса **2**.



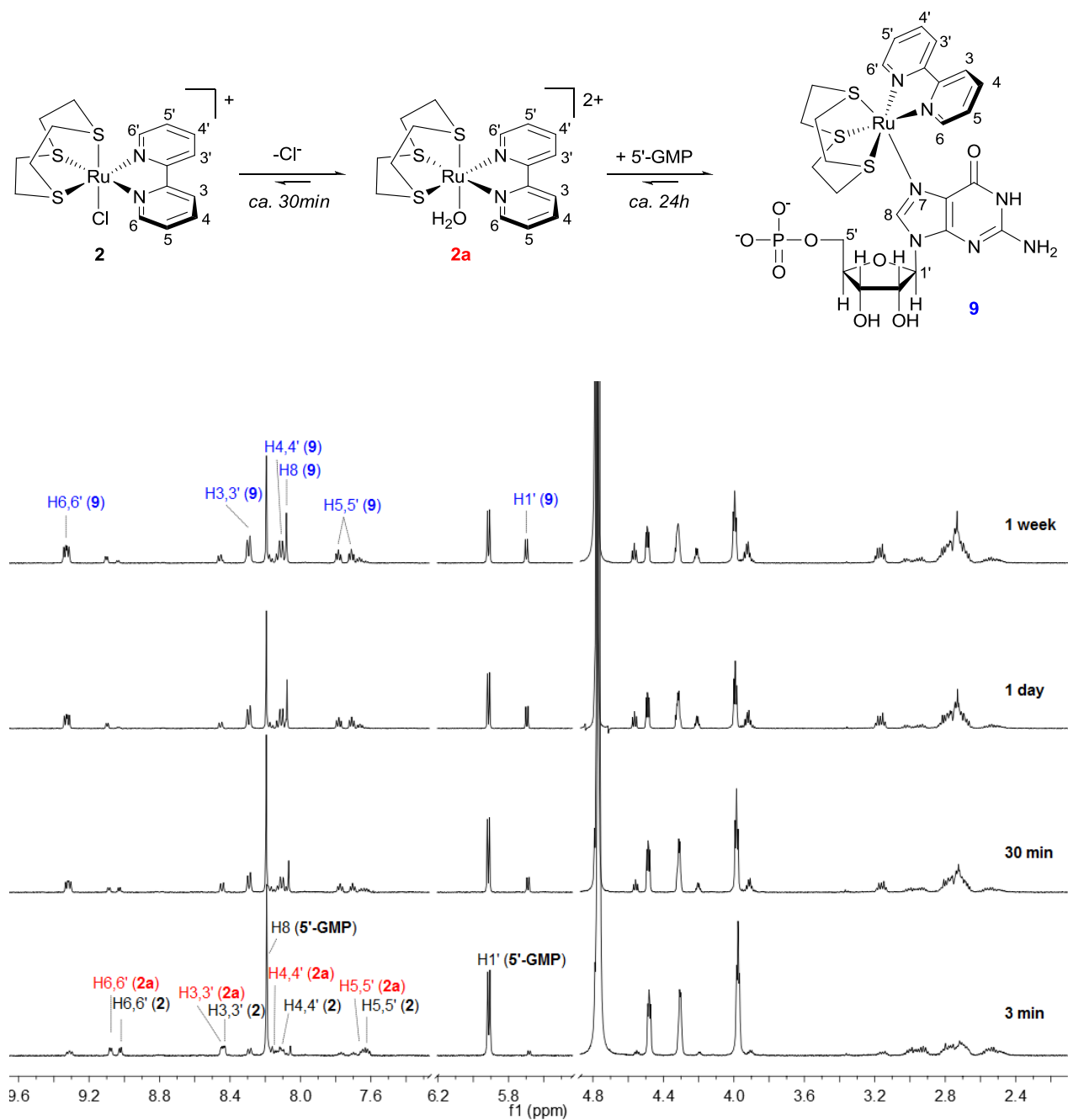
**Слика 3.58.** <sup>1</sup>H NMR спектар  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  комплекса (**2**, 4 mM) 30 минута након растварања у  $\text{D}_2\text{O}$  (a), и након додавања 9MeG (1 eq, pH 7,88, 298 K) у различитим временским интервалима (б-г)



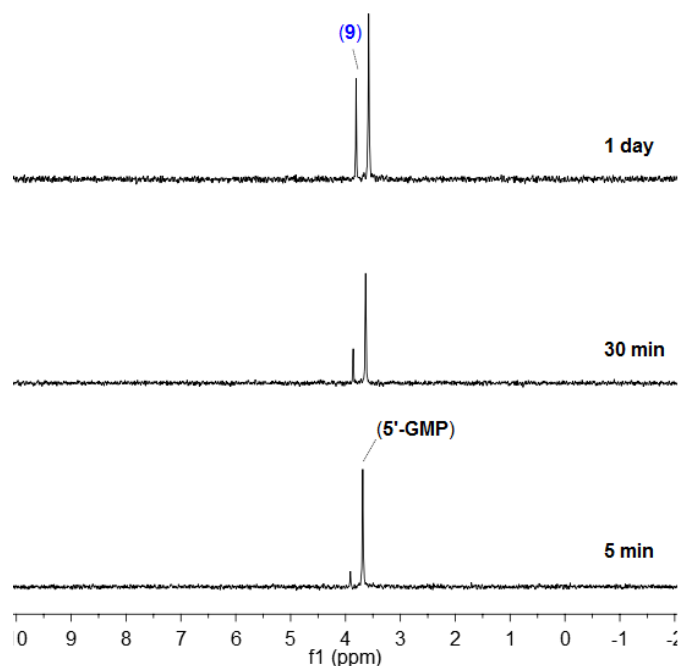
Слика 3.59.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  комплекса (2, 4 mM) 30 минута након растварања и Guo (1:1, pH 7.74, 298 K) у различитим временским интервалима

Супротно ономе што је примећено код комплекса **1**, реакција комплекса **2** са 5'-GMP (1:1, 10 mM, pH = 7,65) доводи до формирања само једног производа, који је идентификован помоћу  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  NMR спектроскопије (Слика 3.60 и 3.61). То је производ у коме се координација остварује преко N7 атома,  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{bpy})(5'\text{-GMP-N7})]$  (**9**).

У овом случају, није детектован производ у коме се координација рутенијума(II) врши преко O атома из фосфатне групе 5'-GMP. Реакција је релативно брза што указује брза појава нових сигнала одмах након мешања. Систем постиже равнотежу након једног дана са 30% 5'-GMP координаног за рутенијум(II). Неуобичајна померања H8 и H1' протона у производу **9** ка вишем пољу ( $\delta = 8,07$  и  $5,69$  ppm), проузрокована су заштитним утицајем ароматичних прстенова bpy, што је запажено и код органометалних комплекса.<sup>149</sup> Два пиридилска прстена bpy нису еквивалентна, иако су само триплети H5/H5' протона јасно раздвојени (Слика 3.60).  $^{31}\text{P}$  NMR спектроскопија је у складу са  $^1\text{H}$  NMR резултатима: детектован је само један нов пик, померен ка нижем пољу ( $\delta = 3,81$  ppm) у односу на пик слободног 5'-GMP ( $\delta = 3,58$  ppm).



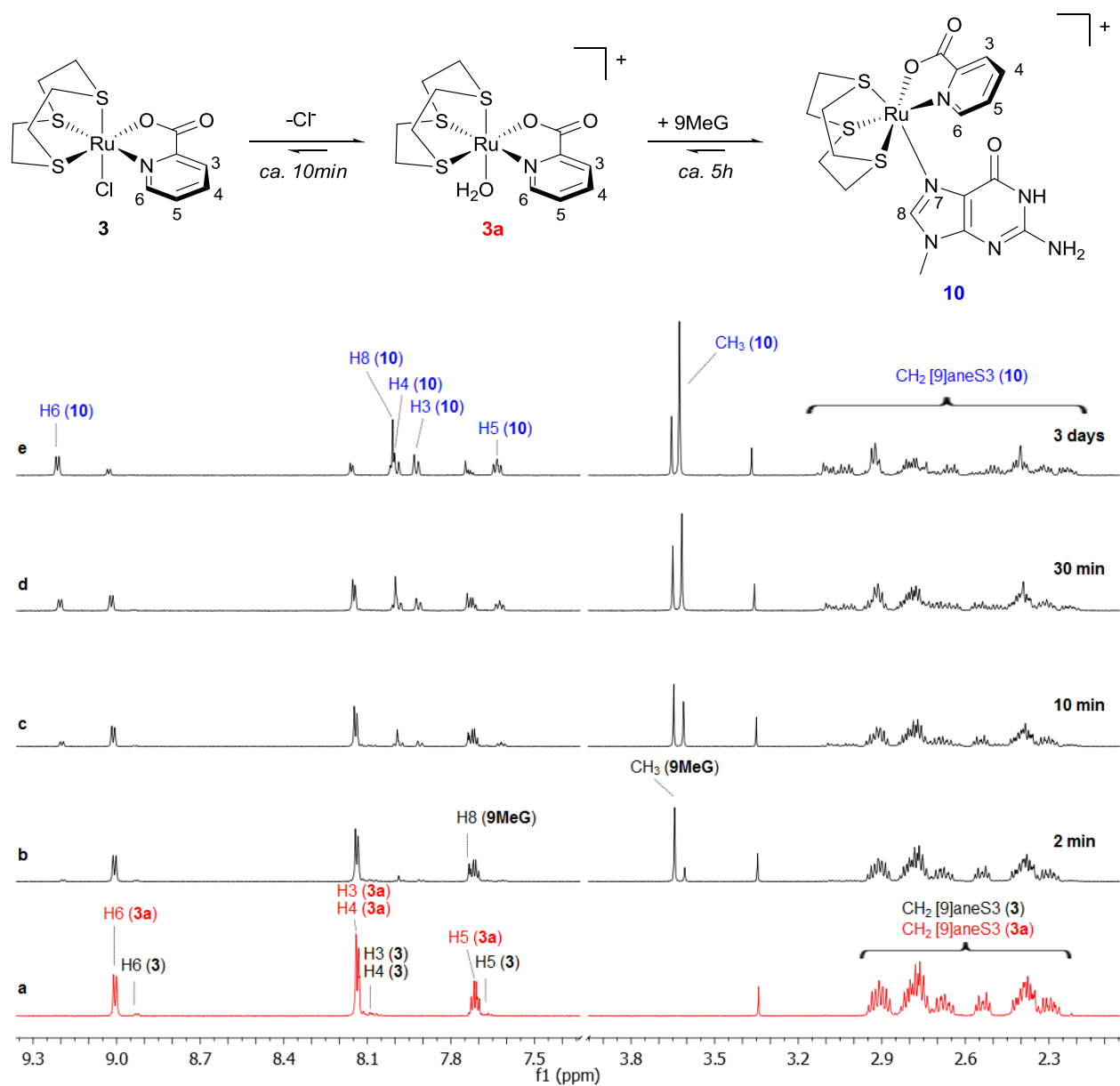
Слика 3.60.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $[\text{Ru}([9]\text{aneS3})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  комплекса (**2**, 10 мин након растварања) и 5'-GMP (1:1, 10 mM,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{pH} = 7.65$ , 298 K) у различитим временским интервалима



Слика 3.61.  $^{31}\text{P}$  NMR спектри  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  комплекса (**2**) и 5'-GMP (1:1, 10 mM,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH = 7,65, 298 K) у различитим временским интервалима

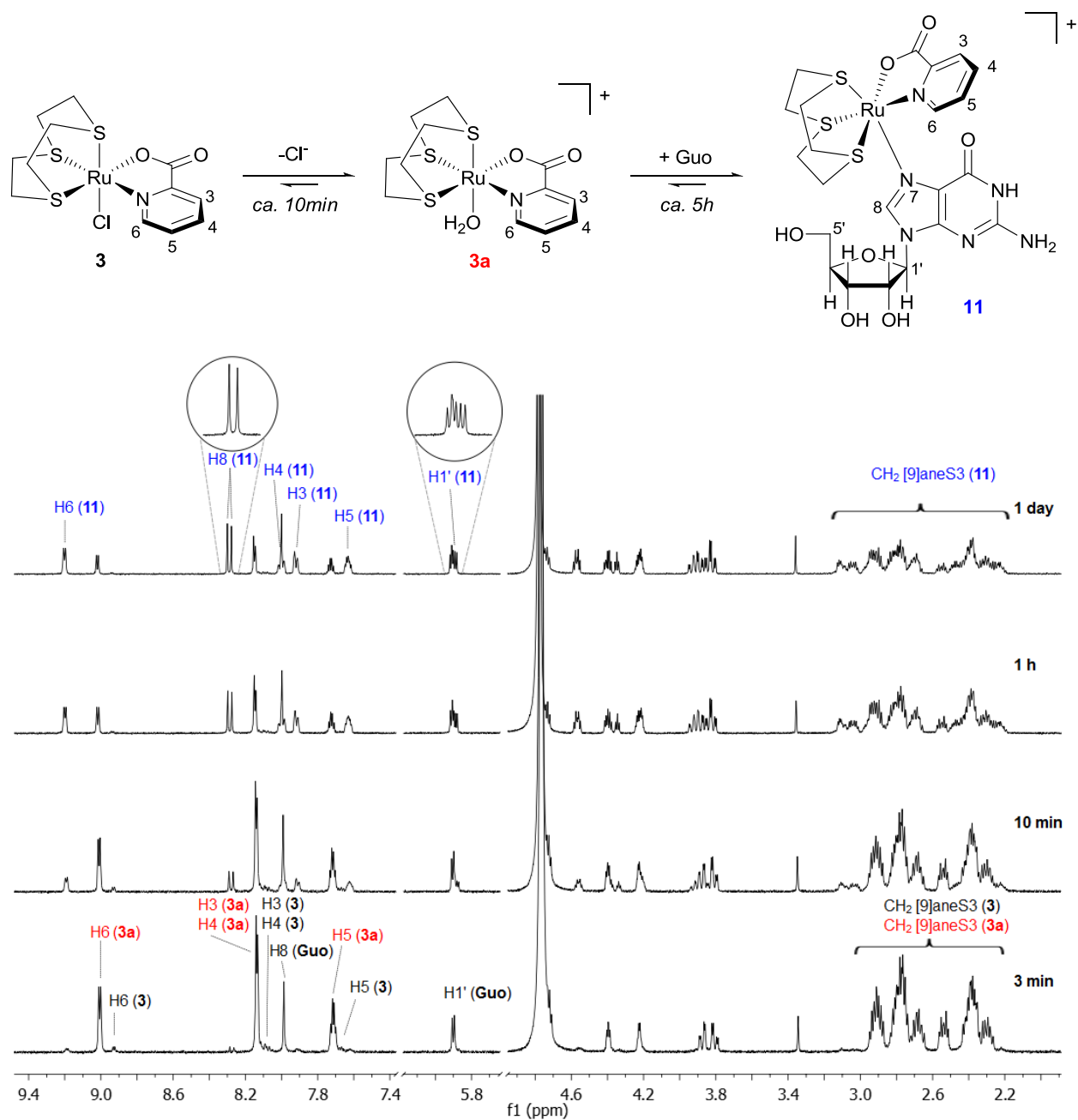
**$[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{pic})\text{Cl}]$  (**3**)**. Реакција комплекса **3** са 9MeG (1:1, 4 mM, pH = 7,73) је праћена помоћу  $^1\text{H}$  NMR спектроскопије у току 3 дана (Слика 3.62). Интензитет нових сигнала расте постепено са временом. Сигнал Н8 протона је померен ка вишим вредностима хемијског померања ( $\delta = 8,01$  ppm), док је синглет  $\text{CH}_3$  протона померен ка нижим вредностима ( $\delta = 3,63$  ppm), у односу на слободан 9MeG. Равнотежа је постигнута у току 5 сати са 78% 9MeG везаног за рутенијум(II).

Реакција комплекса **3** са Guo (1:1, 4 mM, pH = 7,70) индукује споре промене у  $^1\text{H}$  NMR спектру. Може се уочити нов сет сигнала, који је приписан производу  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{pic})(\text{Guo-N7})]^+$  (**11**) (Слика 3.63). Неки сигнали координованог Guo су јасно раздвојени на два сигнала једнаких интензитета. Два синглета на  $\delta = 8,30$  и  $8,28$  ppm, која потичу од Н8 протона, су померена ка вишим вредностима хемијског померања у односу на слободан лиганд. У производу **11** рутенијумов атом је стереогени центар (**3** је рацемска смеша која садржи једнаке количине два енантиомера), тако да се ови сигнали могу приписати двома једнаким количинама дијастереизомера (Слика 3.64). После 24 сата, систем постиже равнотежу у односу 2:1 између **11** и **3а**.

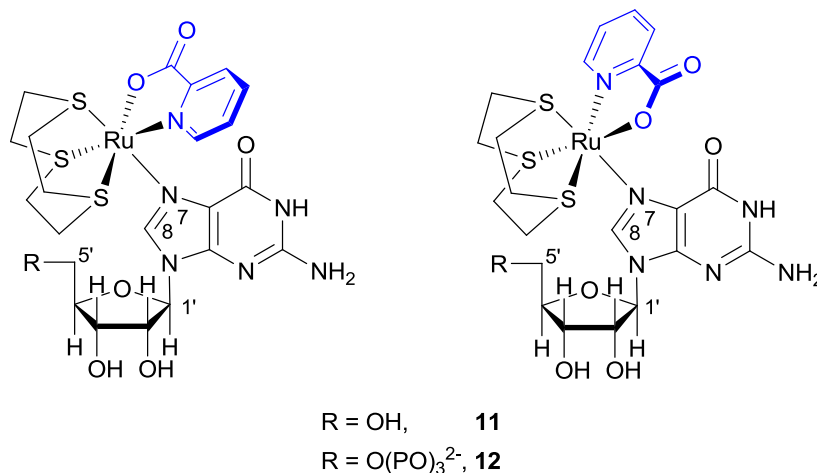


Слика 3.62.  $^1\text{H}$  NMR спектри  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{pic})\text{Cl}]$  комплекса (**3**) у  $\text{D}_2\text{O}$  10 мин након растварања (a), и након додавања 9MeG (1:1, 4 mM, pH = 7,73, 298 K) у различитим временским интервалима (б-е)





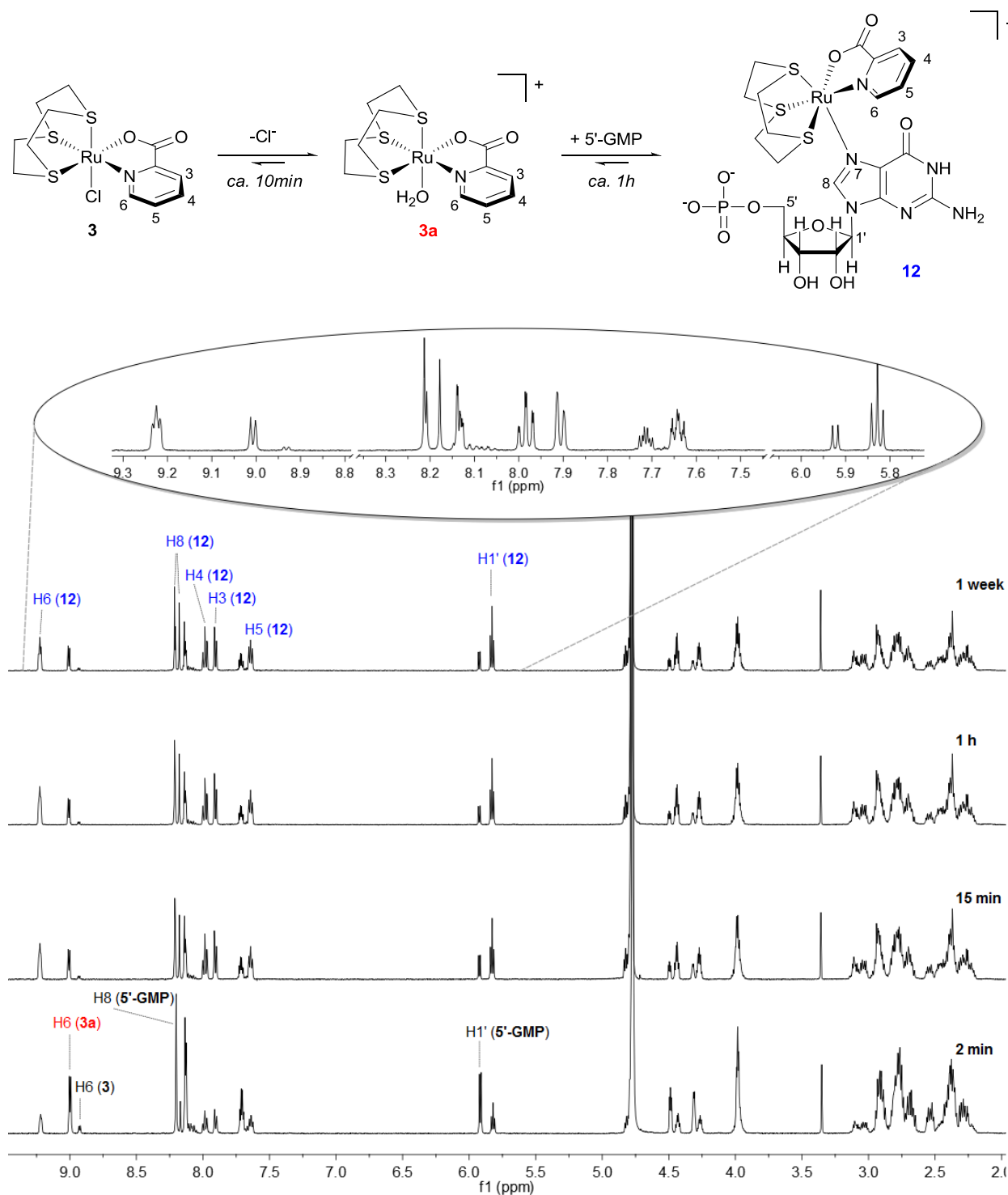
Слика 3.63.  $^1H$  NMR спектри за реакцију  $[Ru([9]aneS3)(pic)Cl]$  комплекса (**3**, 10 мин након растварања) и **Guo** (1:1, 4 mM,  $D_2O$ , pH 7,70, 298 K) у различитим временским интервалима



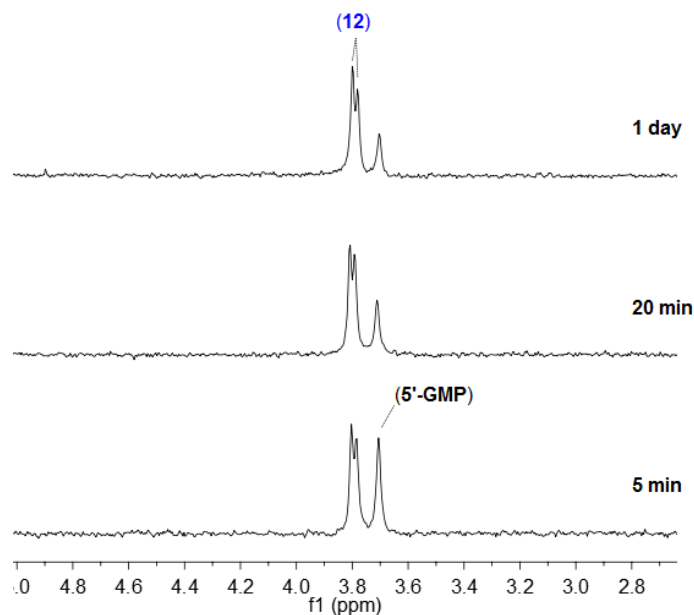
**Слика 3.64.** Шематски приказ два дијастереоизомера  $[Ru([9]aneS3)(pic)(Guo-N7)]^+$  (**11**) и  $[Ru([9]aneS3)(pic)(5'-GMP-N7)]^-$  (**12**). Звездиче означавају стереогене центре

Испитивана је и реакција комплекса **3** са 5'-GMP (1:1, 10 mM, pH = 7,95) помоћу  $^1H$  и  $^{31}P$  NMR спектроскопије (Слика 3.65 и 3.66). Анализом спектра може се приметити, такође, појава два дијастереоизомера  $[Ru([9]aneS3)(pic)(5'-GMP-N7)]^-$  (**12**, Слика 3.64). Два нова синглета H8 протона једнаких интензитета су јасно раздвојена на  $\delta = 8,21$  и  $8,18$  ppm, док су остале резонанце 5'-GMP и pic делимично преклопљене. Реакција је доста бржа у односу на реакције са 9MeG и Guo. Равнотежа је постигнута након једног сата са 65% производа **12**. У  $^{31}P$  NMR спектру могу се видети два делимично преклопљена синглета, која су померена ка вишим вредностима хемијског померања ( $\delta = 3,80$  и  $3,79$  ppm), у односу на слободан 5'-GMP,  $\delta = 3,71$  ppm, (Слика 3.66). Ови сигнали потичу од два дијастереоизомера комплекса **12**. Резонанце које указују на везивање преко O атома фосфатне групе нису детектоване, чак ни одмах након мешања.

NMR експериментални резултати показују да сва три Ru-[9]aneS3 комплекса реагују са дериватима гуанина дајући монофункционалне производе. Брзина реакције за сваки комплекс расте у следећем низу: 5'-GMP  $\gg$  Guo  $>$  9MeG. Лиганд 5'-GMP се координује за комплексе **1**, **2** и **3** брже од осталих лиганда због негативног наелектрисања. Поред тога, за сва три комплекса брзина реакције са дериватима гуанина расте у следећем низу: **3** (pic)  $>$  **2** (bpy)  $>$  **1** (en). Тако да, комплекс **1**, упркос томе што брзо хидролизује, најспорије реагује. То указује да брзина реакције не зависи од брзине супституције Cl<sup>-</sup> лиганда, већ од брзине формирања Ru-N7 везе.



Слика 3.65.  $^1H$  NMR спектри за реакцију  $[Ru(9)aneS3](pic)Cl$  комплекса (**3**, 10 мин након растварања) и 5'-GMP (1:1, 10 mM,  $D_2O$ , pH = 7,95, 298 K) при различитим временским интервалима

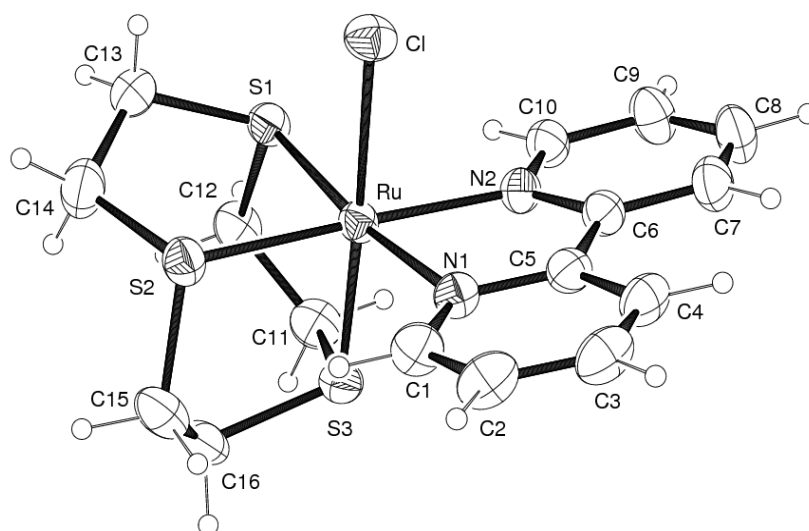


**Слика 3.66.**  $^{31}\text{P}$  NMR спектри за реакцију  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{pic})\text{Cl}]$  комплекса (**3**) и  $5'$ -GMP (1:1, 10 mM,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 7,95, 298 K) при различитим временским интервалима

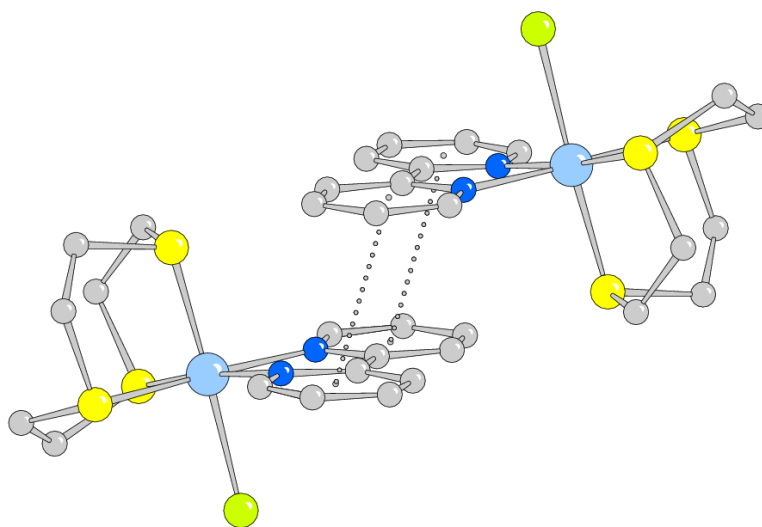
### 3.3.3. Рендгенска структурна анализа

Структуре  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  (**1**) и  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{pic})\text{Cl}]$  (**3**) комплекса су одређене помоћу X-ray дифракционих испитивања.<sup>79</sup> Молекулска структура комплекса **2** у облику Cl (**2-Cl**)<sup>150</sup> и  $\text{CF}_3\text{SO}_3$  (**2-OTf**)<sup>76</sup> соли је раније описана. У току наших испитивања, добијени су кристали комплекса **2** у облику  $\text{PF}_6$  соли, погодни за рендгенску структурну анализу. Његова молекулска структура приказана је на Слици 3.67. Рутенијум(II) јон има очекивану октаедарску геометрију, при чему су дужине веза Ru-лиганд приближно једнаке дужинама које су пронађене у дериватима **2-Cl** и **2-OTf**. Раван у којој се налази бру лиганд је благо нагнута ка хлоридо лиганду, услед  $\pi$ - $\pi$  интеракција између бру лиганада симетрично повезаних комплекса у решетки (Слика 3.68).

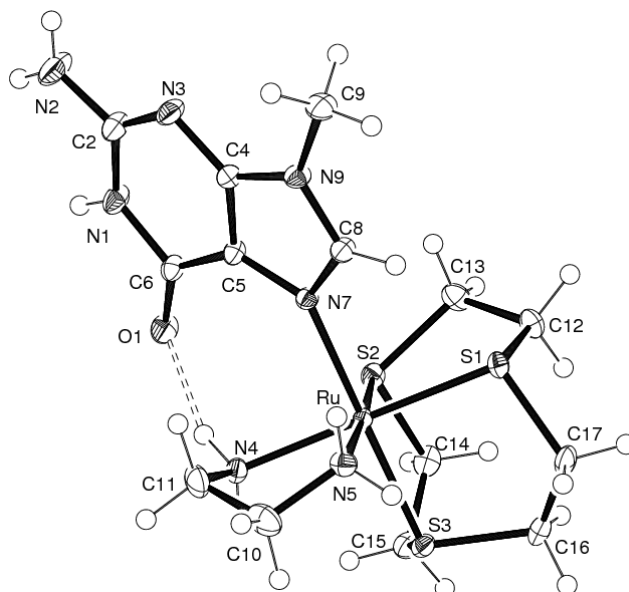
Жути кристали  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})(9\text{MeG-N7})][\text{PF}_6]_2$  (**4**) и  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{pic})(9\text{MeG-N7})][\text{PF}_6]$  (**10**) комплекса погодни за рендгенску структурну анализу, добијени су из раствора реакције комплекса **1** и **3** са 9MeG, након додавања великог вишка  $\text{NH}_4\text{PF}_6$ . Молекулске структуре које су приказане на Сликама 3.69 и 3.70 показују да у сваком комплексу рутенијум(II) јон има издужену октаедарску геометрију, док се 9MeG координује за рутенијум(II) јон преко N7 атома азота.<sup>151</sup>



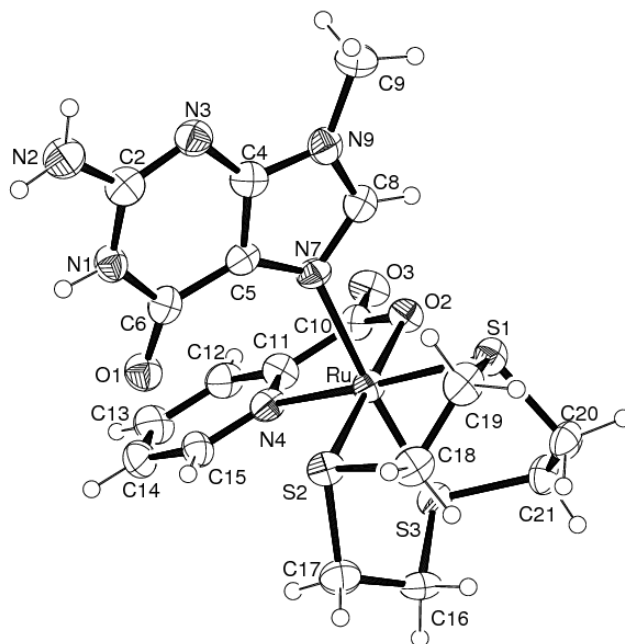
**Слика 3.67.** Молекулска структура (ORTEP view, елипсоиди са 30% степеном вероватноће) за катјон комплекса  $[Ru(9)aneS3](bpy)Cl][PF_6]$  (**2**). Изабране дужине веза (Å) и углови ( $^\circ$ ):  $Ru-N(1)$  2,103(3),  $Ru-N(2)$  2,093(3),  $Ru-S(1)$  2,2965(9),  $Ru-S(2)$  2,3027(9),  $Ru-S(3)$  2,2830(9),  $Ru-Cl$  2,4338(9);  $N(1)-Ru-N(2)$  77,68(11),  $N(1)-Ru-Cl$  86,51(8),  $N(1)-Ru-S(1)$  172,67(8),  $N(1)-Ru-S(2)$  97,11(8),  $N(1)-Ru-S(3)$  97,87(8),  $N(2)-Ru-Cl$  87,17(8),  $N(2)-Ru-S(1)$  97,77(8),  $N(2)-Ru-S(2)$  174,65(8),  $N(2)-Ru-S(3)$  93,35(8),  $S(1)-Ru-S(2)$  87,29(3),  $S(1)-Ru-S(3)$  88,07(3),  $S(2)-Ru-S(3)$  88,52(4),  $S(1)-Ru-Cl$  87,54(3),  $S(2)-Ru-Cl$  91,34(4),  $S(3)-Ru-Cl$  175,61(3)



**Слика 3.68.** Центросиметрични распоред у кристалу комплекса **2**



Слика 3.69. Молекулска структура (ORTEP view, елипсоиди са 50% степеном вероватноће) за катјон комплекса  $[Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)][PF_6]_2$  (**4**)



Слика 3.70. Молекулска структура (ORTEP view, елипсоиди са 40% степеном вероватноће) за катјон комплекса  $[Ru([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)][PF_6]$  (**10**)

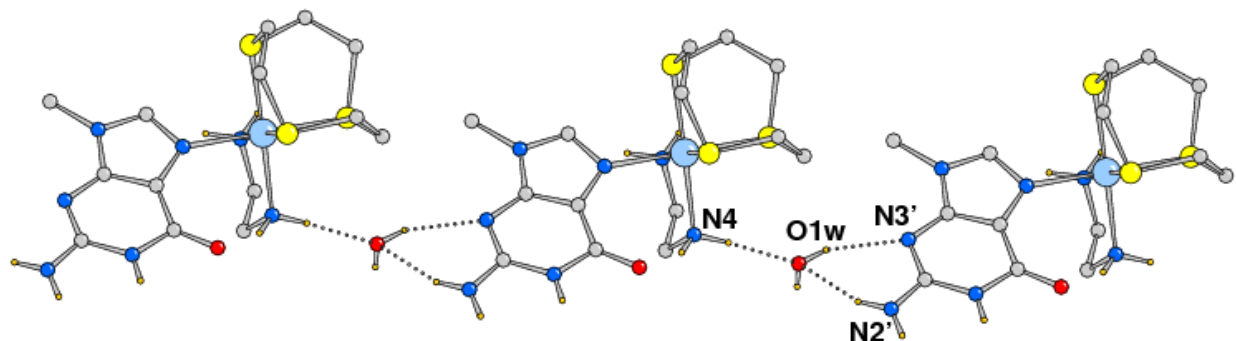
Одговарајуће дужине веза и углови између веза у комплексима **4** и **10** приказани су у Табели 3.7.

Табела 3.7. Дужине веза (Å) и углови између веза (°) у комплексима **4** и **10**

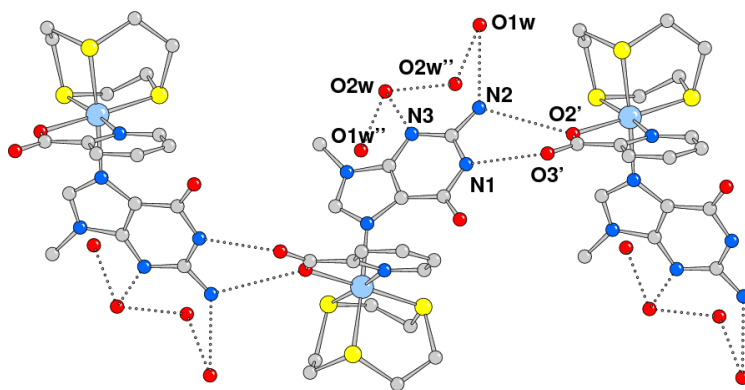
	<b>4</b> (X= N(5))	<b>10</b> (X= O(2))
Ru–N(7)	2,1549(16)	2,164(5)
Ru–S(1)	2,2934(5)	2,2984(16)
Ru–S(2)	2,2993(5)	2,2760(17)
Ru–S(3)	2,2852(5)	2,2765(17)
Ru–N(4)	2,1422(17)	2,104(5)
Ru–X	2,1609(17)	2,132(4)
N(7)–Ru–S(1)	90,48(5)	88,02(14)
N(7)–Ru–S(2)	92,58(5)	92,83(15)
N(7)–Ru–S(3)	178,54(5)	176,11(14)
N(7)–Ru–N(4)	88,97(6)	93,1(2)
N(4)–Ru–S(1)	176,26(5)	172,10(16)
N(4)–Ru–S(2)	95,66(5)	99,47(16)
N(4)–Ru–S(3)	91,72(5)	90,27(15)
S(1)–Ru–S(2)	88,065(18)	88,28(6)
S(1)–Ru–S(3)	88,753(19)	88,38(6)
S(2)–Ru–S(3)	88,636(19)	88,55(6)
N(4)–Ru–X	80,28(7)	78,48(19)
N(7)–Ru–X	87,15(6)	89,16(19)
S(1)–Ru–X	96,00(5)	93,73(12)
S(2)–Ru–X	175,93(5)	177,22(12)
S(3)–Ru–X	91,69(5)	89,58(13)

Вредности дужине веза Ru–N(7) су уобичајне и износе 2,1549(16) и 2,164(5) Å. Орјентација гуанина у односу на екваторијалну раван је слична у комплексима **4** и **10**. Комплекс **4** је додатно стабилизован помоћу интрамолекуларске водоничне везе између карбонилног кисеониковог атома 9MeG и NH групе en, при чему N(4)⋯O1 растојање износи 2,865 Å, а угао везе N(4)–H⋯O1 износи 159,16° (Слика 3.69). Исти азотов атом учествује у грађењу водоничне везе са молекулима кристалне воде (Слика 3.71). Ова (en)N–H⋯O(гуанин) интеракција је примећена у [(η<sup>6</sup>-арена)Ru(en)(9EtG-N7)]<sup>2+</sup> комплексу

од стране Sadler-а и његових сарадника.<sup>52</sup> Предложено је да то буде кључна особина за селективно везивање рутенијум(II) арена комплекса за ДНК, а самим тим и за антитуморску активност.



**Слика 3.71.** Кристално паковање у комплексу  $[Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)][PF_6]_2$  (**4**): молекули кристалне воде повезују металне комплексе водоничном везом формирајући 1D ланац дуж *b*-осе



**Слика 3.72.** Кристално паковање у комплексу  $[Ru([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)][PF_6]$  (**10**) показујући ланац изграђен интермолекулском водоничном везом дуж *a*-осе

У комплексу **10** гуанин формира дихедрални угао од  $74,7(1)^\circ$  са екваторијалном S1/S2/N4/O4 средњом равни, поспешујући формирање интермолекулске водоничне везе. У ствари, N(1)H и N(2)H<sub>2</sub> групе гуанина формирају пар водоничних веза са карбоксилатном групом пиколина симетрично повезаних комплекса, стварајући 1D ланац дуж *a*-осе (Слика 3.72). Гуанин је једина ДНК база која има могућност формирања ове две

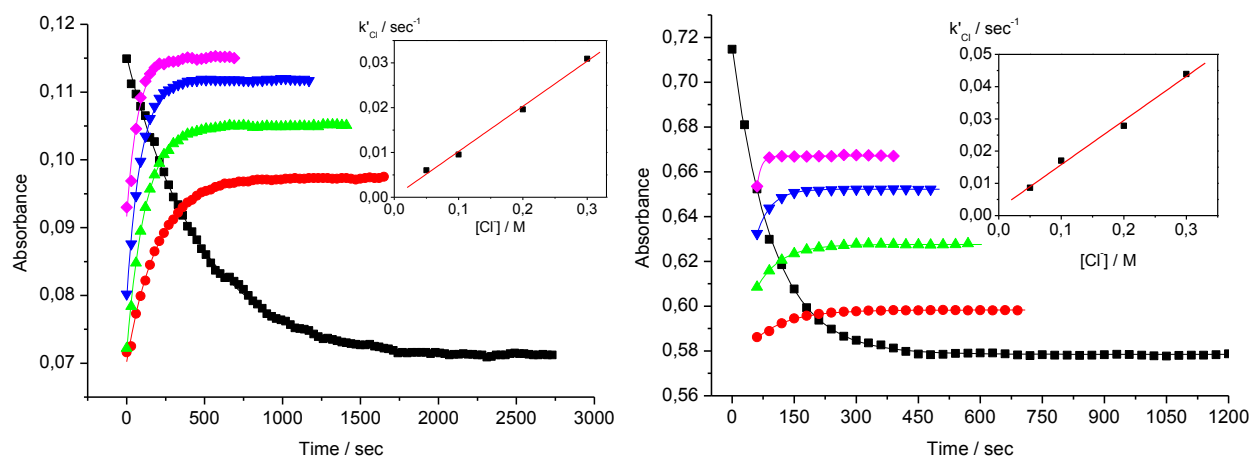


водоничне везе са карбоксилатним групама. Остале базе немају две донорске групе у правилном положају.<sup>152</sup>

### 3.3.4. UV-Vis кинетичка испитивања реакције хидролизе и анације

Кинетика реакције хидролизе и анације комплекса **2** и **3** је испитивана UV-Vis спектрофотометријски. Хидролиза комплекса **1** није испитивана, јер се дешава веома брзо, у току 2 минута се успоставља равнотежа. После 30 минута од растварања комплекса, UV-Vis спектри комплекса **2** и **3** у воденом раствору показују мале, али јасно мерљиве промене апсорбанце раствора са временом у области од 200 до 550 nm. Присуство изобестичких тачака указује на одигравање хидролитичког процеса у једном ступњу, заправо прелазак полазног хлоридо комплекса у одговарајући аква комплекс. Таласна дужина на којој је највећа промена у апсорбцији раствора са временом је изабрана за кинетичка испитивања (446 nm за комплекс **2** и 466 nm за комплекс **3**). Реакције хидролизе су испитиване на 298 K у 0,1 M NaClO<sub>4</sub>. Добијена промена апсорбанце је показала најбоље слагање када је посматрана као експоненцијална функција првог реда (Слика 3.73). Добијене вредности константе брзине реакције хидролизе,  $k_{H_2O}$ , приказане су у Табели 3.8. Комплекс (bpy) **2** хидролизује око 5 пута спорије у односу на комплекс **3** (pic). Константе брзине реакције хидролизе одређене су и у чистој H<sub>2</sub>O (Табела 3.8). Према Brønsted-овој једначини<sup>153</sup> константа брзине реакције хидролизе не зависи од јонске јачине када је барем један од реактанта неутралан (тј. H<sub>2</sub>O). Важно је напоменути да су константе брзине реакције хидролизе антитуморског комплекса цисплатине ( $6,32 \times 10^{-5}$  и  $2,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  за први и други хлоридо лиганд)<sup>127</sup> ниже за два реда величине у односу на добијене константе брзине за комплексе **2** и **3**. Ово указује на то да наши Ru-[9]aneS3 комплекси прелазе у одговарајуће аква врсте много брже у односу на цисплатину при ниској концентрацији хлорида, која одговара интрацелуларним условима. Међутим, доказано је да брза хидролиза комплекса може довести до смањене активности и повећане токсичности због брзог координовања за различите биомолекуле који нису одговорни за пролиферацију тумора.

С обзиром да комплекс **1** хидролизује брже у односу на комплекс **3**, може се закључити да брзина хидролизе зависи од природе и наелектрисања хелатног бидентатног лиганда и опада у следећем низу: en (**1**) > pic (**3**) > bpy (**2**).



**Слика 3.73.** График зависности апсорбанце од времена за реакцију хидролизе и анације комплекса **2** и **2a** (лево, на 446 nm, 0,1 mM), и комплекса **3** и **3a** (десно, на 466 nm, 0,1 mM) у 0,1 M NaClO<sub>4</sub> раствору на 298 K. Ознаке: хидролиза (■), анација након додатка 50 (●), 100 (▲), 200 (▼) или 300 (◆) mM NaCl у равнотежни раствор. Уметнути график: Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда,  $k'_{Cl}$ , од  $[Cl]$

**Табела 3.8.** Константе брзине и константе стабилности за реакције хидролизе комплекса **2** и **3** на 298 K

Растварач	$k_{H_2O}$ [ $10^{-3} s^{-1}$ ]	$(t_{1/2})_{H_2O}$ [min]	$k_{Cl}$ [ $M^{-1} s^{-1}$ ]	$K_{aq}$ [ $10^{-3} M$ ]
<b>2</b>	H <sub>2</sub> O	1,99 ± 0,01	5,80 ± 0,03	
	0,1 M NaClO <sub>4</sub>	2,07 ± 0,02	5,58 ± 0,05	0,101 ± 0,005
<b>3</b>	H <sub>2</sub> O	9,73 ± 0,16	1,19 ± 0,02	
	0,1 M NaClO <sub>4</sub>	10,42 ± 0,07	1,11 ± 0,01	0,137 ± 0,008

Рендгенска структурна анализа показује да је веза Ru-Cl у комплексу **1** најдужа међу ова три комплекса (2,4480(16) Å), док је веза Ru-Cl у комплексу **3** краћа (2,2429(16) Å) у односу на дужину везе у комплексу **2** (2,4338(10) Å). То значи да раскидање везе Ru-Cl није корак који одређује брзину реакције хидролизе, односно да се реакција хидролизе може одиграти и преко асоцијативног механизма измене (Ia). Исти

1a механизам је предложен и за реакције хидролизе органорутенијумових комплекса  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-арена})(\text{en})\text{Cl}]^+$ , који имају константе брзине сличне комплексу **3**.<sup>63</sup>

Реакције анације су проучаване додатком вишка NaCl у четири различите концентрације (од 50 до 300 mM) у равнотежне растворе хлоридо комплекса **2** и **3** на 298 K. Реакције анације су биле релативно брзе (Слика 3.73) и равнотежа је постигнута у току 10 минута. Вредности константе брзине реакције другог реда,  $k_{\text{Cl}}$ , добијене су из нагиба праве зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k'_{\text{Cl}}$ , од концентрације хлорида  $[\text{Cl}^-]$  (уметнути график на Слици 3.73) и приказане у Табели 3.8. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k'_{\text{Cl}}$ , расту линеарно са порастом концентрације  $\text{Cl}^-$ . Може се закључити да је реакција анације аква врсте **3a** 1,5 пута бржа у односу на комплекс **2a**. Упркос томе што је **2a** дикатјонски комплекс, у овом случају преовлађују стерни и електронски ефекти хелатних лиганата над укупним наелектрисањем комплекса у кориговању константе брзине реакције измене лиганата.

Вредности константи равнотеже за реакцију хидролизе комплекса **2** и **3** на 298 K, израчунате из односа  $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{Cl}}$ , приказане су у Табели 3.8. За комплекс **2** износи  $20,5 \times 10^{-3}$  M а за комплекс **3**  $76,1 \times 10^{-3}$  M у 0,1 M NaClO<sub>4</sub>. Добијене вредности су у сагласности са вредностима добијеним помоћу NMR експеримената ( $K = 13,6 \times 10^{-3}$  M за **2** и  $59,0 \times 10^{-3}$  M за **3** у D<sub>2</sub>O). Поред тога, на основу NMR резултата хидролизе комплекса **1** могуће је израчунати константу равнотеже ( $27,2 \times 10^{-3}$  M), која има вредност између вредности за комплексе **2** и **3**. Ради поређења, „half sandwich” органометални комплекси,  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-арена})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ , за које се верује да се везују монофункционално за ДНК након хидролизе хлоридо лиганата, имају вредности константе равнотеже ( $7,3 - 9,7 \times 10^{-3}$  M) које су од 2 до 10 пута мање од оних за комплексе **2** и **3**.<sup>63</sup>

Добијене K вредности, омогућиле су да предвидимо расподелу врсти за „half sandwich” комплексе **2** и **3** при различитим биолошким условима (Табела 3.9). У воденом раствору који садржи 104 mM NaCl (екстрацелуларна концентрација  $\text{Cl}^-$ ), равнотежне концентрације одговарајућих аква врсти су 17% за комплекс **2** и 42% за комплекс **3**. Међутим, у ћелији, где је концентрација  $\text{Cl}^-$  нижа (око 4 mM), равнотежне концентрације аква врсти **2a** и **3a** расту и до 83% и 95% (Табела 3.9). Слична расподела је очекивана и за комплекс **1** на основу NMR добијене вредности константе K: 21% аква комплекса **1a** у раствору који садржи 104 mM NaCl, и 87% у 4 mM раствору NaCl.

**Табела 3.9.** Расподела одговарајућих врсти за комплексе **2** и **3** у 0,1 М раствору NaClO<sub>4</sub> при успостављању равнотеже на 298 К, при биолошки релевантним концентрацијама Cl<sup>-</sup><sup>a</sup>

Комплекс	[Cl <sup>-</sup> ] mM		% врсте	
			хлоридо	аква
[Ru([9]aneS3)(en)Cl] <sup>+</sup> ( <b>1</b> ) <sup>b</sup>	104	плазма	79,3	20,7
	22,7	цитоплазма	45,5	54,5
	4	једро	13,0	87,0
[Ru([9]aneS3)(bpy)Cl] <sup>+</sup> ( <b>2</b> )	104	плазма	83,5	16,5
	22,7	цитоплазма	52,6	47,4
	4	једро	16,6	83,4
[Ru([9]aneS3)(pic)Cl] ( <b>3</b> )	104	плазма	57,8	42,2
	22,7	цитоплазма	23,0	77,0
	4	једро	5,1	94,9

<sup>a</sup>Иницијална концентрација комплекса је 80,0 μМ, тј. IC<sub>50</sub> вредност израчуната за атиквнији комплекс **1**.

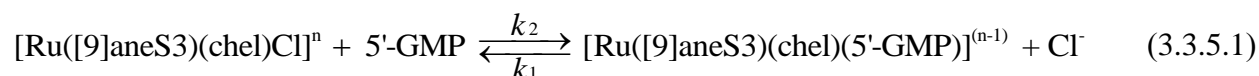
<sup>b</sup>Резултати засновани на вредностима К комплекса **1** добијених помоћу NMR експеримената, тј. K<sub>aq</sub> = 27,2 × 10<sup>-3</sup> М.

### 3.3.5. UV-Vis испитивања реакције комплекса **1**, **2** и **3** са 5'-GMP

Испитивања супституционих реакција [Ru([9]aneS3)(en)Cl][PF<sub>6</sub>] (**1**), [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF<sub>6</sub>] (**2**) и [Ru([9]aneS3)(pic)Cl] (**3**) комплекса са 5'-GMP вршена су UV-Vis спектрофотометријски праћењем промене апсорбанце раствора на одговарајућој радној таласној дужини у функцији времена. Реакције су започете мешањем 0,3 ml раствора комплекса са 2,7 ml раствора лиганда у кварцној кивети. Концентрација лиганда је увек била у вишку (најмање 10 пута) у односу на концентрацију комплекса, како би се обезбедили услови реакције *pseudo*-првог реда. Све супституционе реакције изучаване су у присуству 30 mM NaCl, како би се сузбила хидролиза комплекса. Добијена промена

апсорбанце је показала најбоље слагање када је посматрана као експоненцијална функција првог реда помоћу компјутерског програма Origin 8.

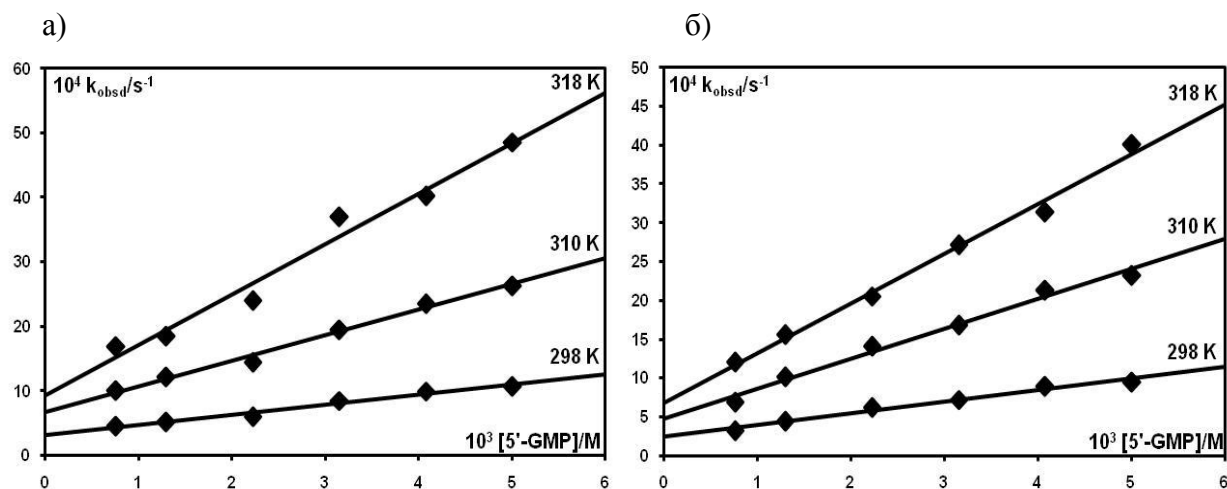
Супституционе реакције комплекса **1**, **2** и **3** са 5'-GMP могу бити представљене једначином (3.3.5.1), у којој chel означава бидентатни инертни лиганд (en, бру и pic), при чему је  $n = +1$  или 0 у зависности од наелектрисања бидентатног хелатног лиганда.

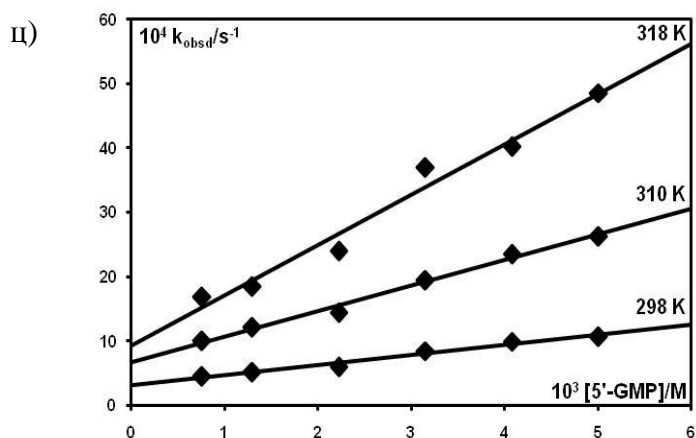


Константа брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , одређена помоћу програма Origin 8, посматрана је у зависности од концентрације улазног лиганда. Резултати су приказани на Слици 3.74, на основу којих се може видети да је зависност константе  $k_{\text{obsd}}$  од концентрације лиганда линеарна у свим случајевима. Вредност константе брзине директне реакције,  $k_2$ , одређује се из нагиба праве  $k_{\text{obsd}} = f([\text{L}])$ , на основу једначине (3.3.5.2).

$$k_{\text{obsd}} = k_1[\text{Cl}^-] + k_2[5'\text{-GMP}] \quad (3.3.5.2)$$

Константа  $k_1$ , описује повратну реакцију и одређује се из одсечка подељена са концентрацијом хлорида,  $[\text{Cl}^-]$ , (30 mM NaCl). Израчунате вредности за константе  $k_2$  и  $k_1$  дате су у Табели 3.10.





**Слика 3.74.** Зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , од концентрације лиганда и температуре за реакције супституције комплекса  $[Ru([9]aneS_3)(en)Cl]^+$  (1, а)  $[Ru([9]aneS_3)(bpy)Cl]^+$  (2, б),  $[Ru([9]aneS_3)(pic)Cl]$  (3, ц) са 5'-GMP у 25 mM *Hepes* пуферу (30 mM NaCl, pH = 7,2)

**Табела 3.10.** Константе брзине и активациони параметри за реакције супституције комплекса 1, 2 и 3 са 5'-GMP (25 mM *Hepes* пуфер, 30 mM NaCl, pH = 7,2)

	T [K]	$k_2 [10^{-1} M^{-1} s^{-1}]$	$k_1 [10^{-3} M^{-1} s^{-1}]$	$\Delta H_2^\ddagger [kJmol^{-1}]^{[a]}$	$\Delta S_2^\ddagger [JK^{-1}mol^{-1}]^{[a]}$
<b>1</b>	298	$0,67 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,20$	$60 \pm 2$	$-84 \pm 5$
	310	$1,74 \pm 0,13$	$0,80 \pm 0,30$		
	318	$3,29 \pm 0,11$	$1,83 \pm 1,13$		
<b>2</b>	298	$1,49 \pm 0,12$	$8,17 \pm 1,23$	$56 \pm 3$	$-91 \pm 8$
	310	$3,84 \pm 0,23$	$16,10 \pm 2,40$		
	318	$6,39 \pm 0,29$	$22,83 \pm 3,03$		
<b>3</b>	298	$1,58 \pm 0,14$	$10,37 \pm 1,40$	$61 \pm 3$	$-75 \pm 10$
	310	$3,97 \pm 0,19$	$22,40 \pm 1,97$		
	318	$7,80 \pm 0,62$	$31,23 \pm 6,47$		

<sup>[a]</sup> Вредности које се односе на директну супституциону реакцију ( $k_2$ )

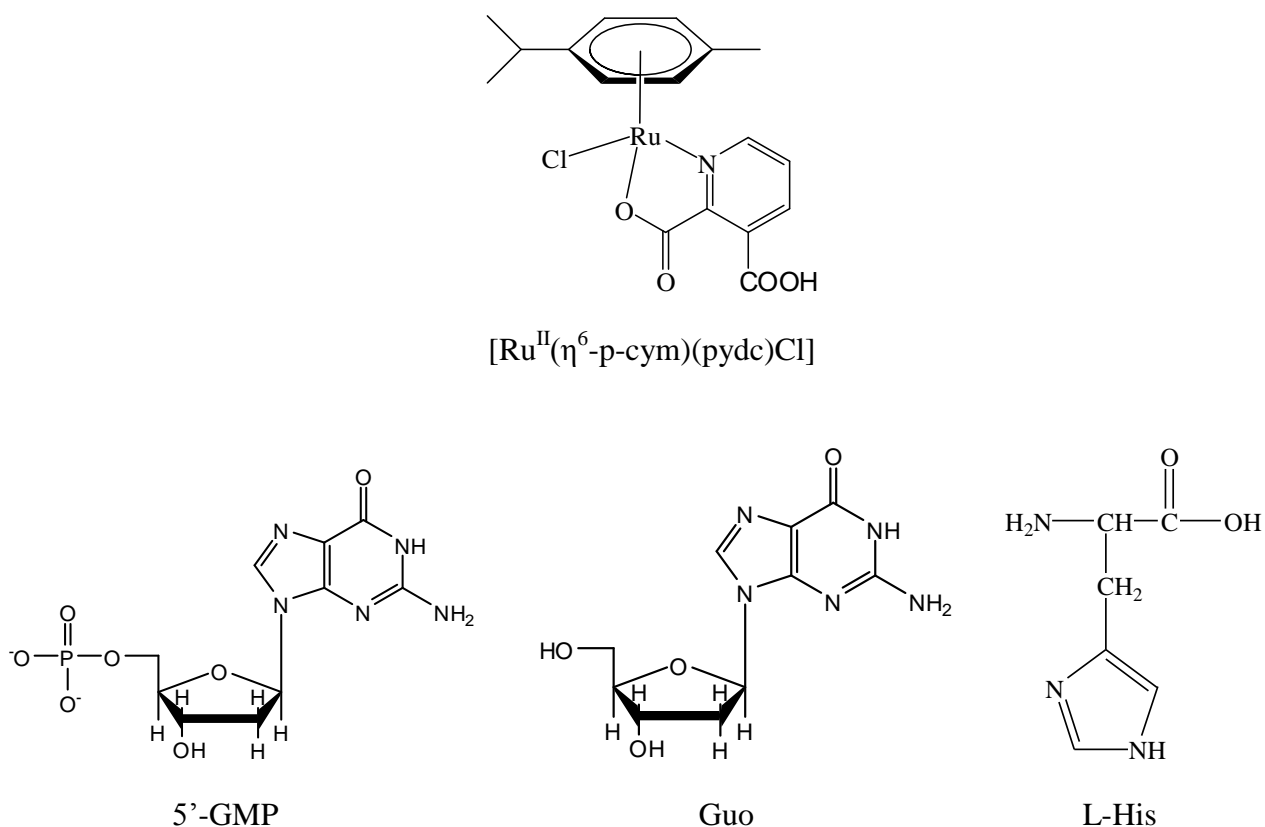
Испитивање реакција супституције изучаваних комплекса са 5'-GMP на три различите температуре омогућило је одређивање вредности термодинамичких параметара које су дате у Табели 3.10. Мале вредности за  $\Delta H^\ddagger$  и негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују на асоцијативни механизам супституције. Овај механизам је предложен и за реакције супституције органометалних рутенијум арена комплекса са биолошки релевантним лигандима (Guo, 5'-GMP и L-His).<sup>132</sup>

На основу добијених резултата може се закључити да константе брзина зависе од природе хелатног бидентатног лиганда: комплекси **2** и **3** реагују 2,5 пута брже од комплекса **1**. На пример, вредности константи брзина реакције другог реда,  $k_2$ , на 310 К износе  $1,74 \pm 0,13 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $3,84 \pm 0,23 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , и  $3,97 \pm 0,19 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  за комплексе **1**, **2** и **3**. Комплекси **2** и **3** садрже  $\pi$ -акцепторске пиридилске прстенове у *cis* положају у односу на одлазећи лиганд. Присуство  $\pi$ -акцепторских лиганда повећава електрофилност јона метала, а са тим и његову реактивност. У складу са овим, координовање 5'-GMP преко кисеоника фосфатне групе примећено је само за комплекс **1**, одговарајући интермедијери за комплексе **2** и **3** имају веома кратко полувреме реакције да би били детектовани помоћу NMR спектроскопије.

### 3.4. Кинетика и механизам супституционих реакција рутенијум(II) арена комплекса са биолошки релевантним лигандима

Последњих година многобројна истраживања су фокусирана на органометална рутенијум(II) арена једињења, која поседију антитуморску активност у *in vitro*, а у неким случајевима, и у *in vivo* условима. Синтетитзована је серија нових рутенијум(II) арена комплекса опште формуле  $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{Ru}(\text{L})\text{Cl}_2]$ , где је L = 3-ацетилпиридин, 4-ацетилпиридин, 2-амино-5-хлоропиридин, изоникотинска или никотинска киселина, и  $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{Ru}(\text{HL})\text{Cl}]$  где је HL = 2,3-пиридин-, 2,4-пиридин-, 2,5-пиридин- и 2,6-пиридин-дикарбоксилат (Слика 1.7 приказана у одељку 1.4).<sup>59</sup>

Изучавање интеракција рутенијум(II) арена комплекса са нуклеобазама је од изузетне важности с обзиром да је ДНК примарна мета антитуморских комплекса као што је цисплатина. Стога, у овом раду испитиване су реакције  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  комплекса са дериватима гуанина (Guo и 5'-GMP), као и са L-His (Слика 3.75).



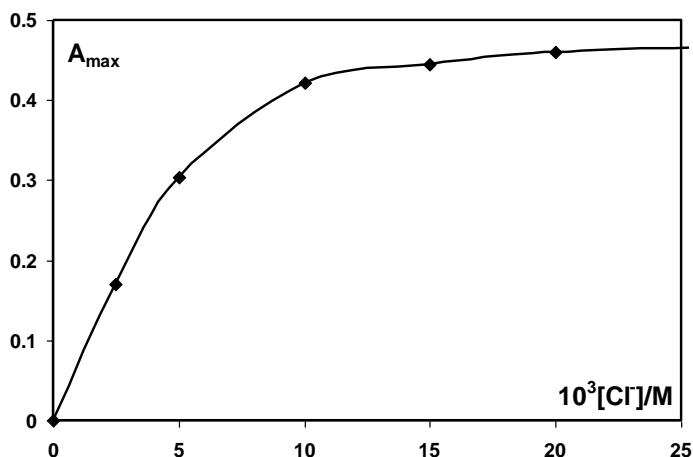
Слика 3.75. Структурне формуле испитиваног комплекса и лиганда

### 3.4.1. UV-Vis кинетичка мерења

Кинетика супституционих реакција  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  комплекса са 5'-GMP, Guo и L-His испитивана је UV-Vis спектрофотометријски праћењем промене апсорбције раствора на одговарајућој таласној дужини у функцији времена. Реакције су изучаване на  $\text{pH} = 2,5$  (0,1 M  $\text{NaClO}_4$ ) и на  $\text{pH} = 7,2$  (25 mM HEPES пуфер) у присуству 10 mM NaCl на 310 K, изузев реакције са 5'-GMP, која је изучавана и на 298 K и 318 K. У свим системима концентрација лиганда била је у великом вишку (најмање 10 пута) у односу на концентрацију полазног комплекса, како би се обезбедили услови реакције *pseudo*-првог реда. Ова вредност је одређена пре кинетичких мерења као минимална концентрација хлорида за коју нису уочене спектралне промене (Слика 3.76). Добијена промена

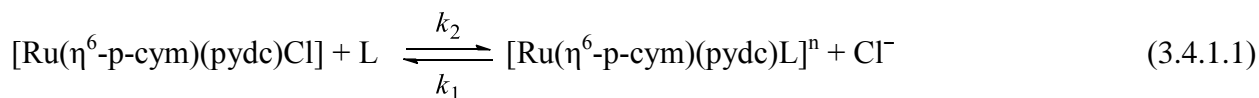


апсорбанце је показала најбоље слагање када је посматрана као експоненцијална функција првог реда помоћу компјутерског програма Origin 8.



Слика 3.76. Промена апсорбанце у зависности од концентрације хлорида,  $[\text{Cl}^-]$ , за  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})(\text{H}_2\text{O})]^+$  комплекс на 291 nm у 0,1 M  $\text{NaClO}_4$  (310 K)

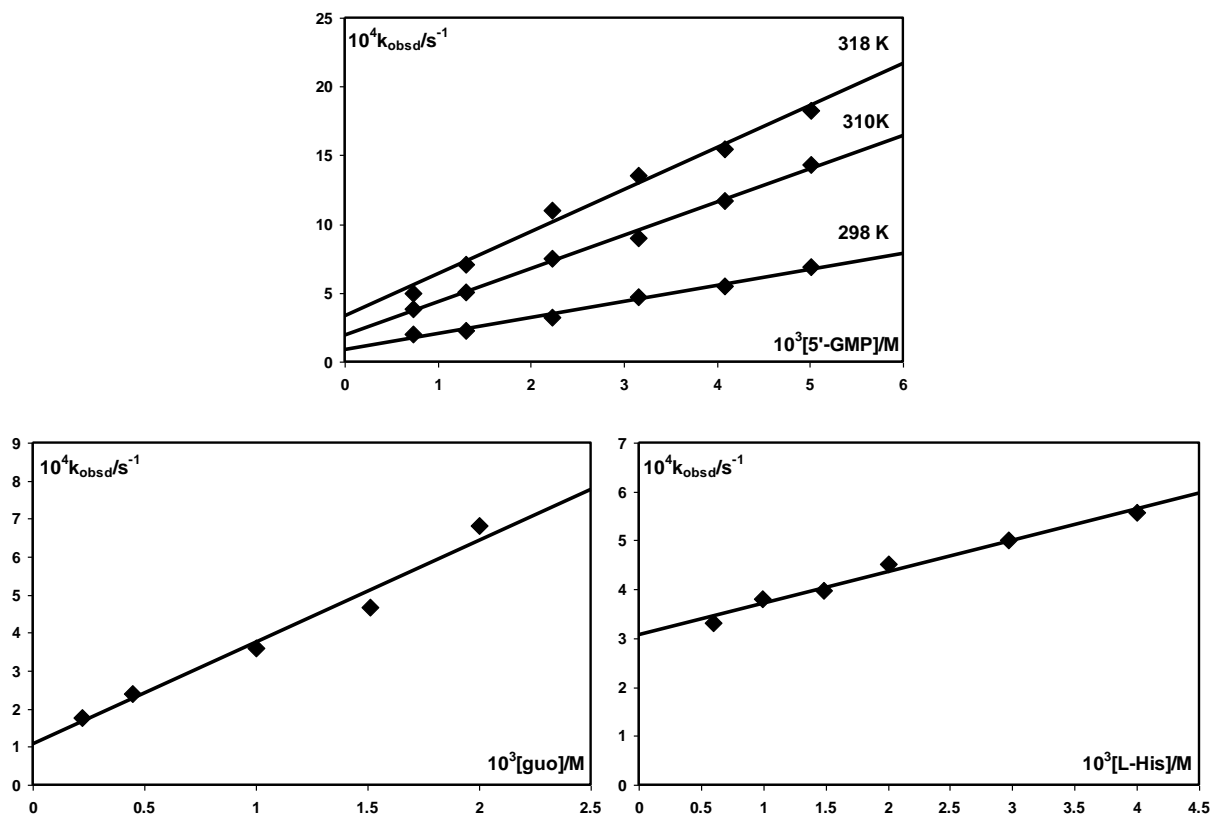
Супституционе реакције  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  комплекса са N-донорским лигандима могу бити представљене једначином (3.4.1.1), у којој  $\text{pydc}$  означава бидентатни инертни лиганд, а L улазни лиганд (5'-GMP, Guo и L-His ), при чему је  $n = -1$  или  $+1$  у зависности од наелектрисања улазног лиганда. Константа  $k_2$  је константа брзине реакције другог реда и карактерише реакцију директне супституције, док константа  $k_1$  карактерише реверзибилни процес.



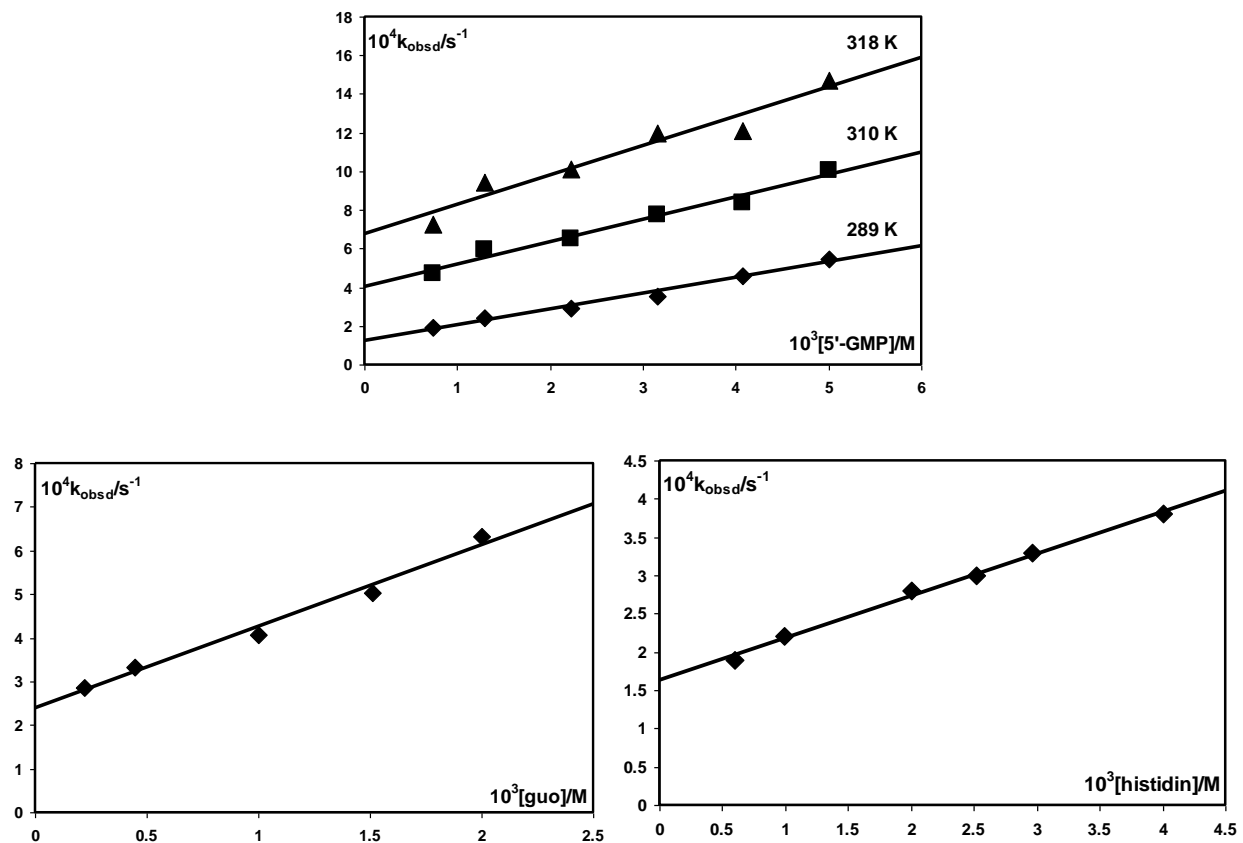
Повезаност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , са поменутиим константама за директан и повратан процес супституције дата је једначином (3.4.1.2):

$$k_{\text{obsd}} = k_1[\text{Cl}^-] + k_2[\text{L}] \quad (3.4.1.2)$$

Константа брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , одређена помоћу програма Origin 8, испитивана је у зависности од концентрације улазног лиганда. Резултати су приказани на Сликама 3.76 и 3.77, на основу којих се може видети да је зависност константе  $k_{\text{obsd}}$  од концентрације лиганда линеарна у свим случајевима. Вредност константе брзине директне реакције,  $k_2$ , одређује се из нагиба праве  $k_{\text{obsd}} = f([L])$ . Добијене вредности за константе брзине дате су у Табели 3.11.



Слика 3.76. Зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , од концентрације лиганда и температуре за реакције супституције  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  комплекса са 5'-GMP, Guo и L-His, у 25 mM *Hepes* пуферу (10 mM NaCl, pH = 7,2)



Слика 3.77. Зависност константе брзине реакције pseudo-првог реда,  $k_{obsd}$ , од концентрације лиганда и температуре за реакције супституције  $[Ru(\eta^6-p-cym)(pydc)Cl]$  комплекса са 5'-GMP, Guo и L-His, у 0,1 M  $NaClO_4$  (10 mM NaCl, pH = 2,5)

**Табела 3.11.** Константе брзине и активациони параметри за реакције супституције [Ru( $\eta^6$ -p-cym)(pydc)Cl] комплекса са 5'-GMP, Guo и L-His

Комплекс <sup>a</sup>	T/K	pH	$k_2$ [ $10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_1$ [ $10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$\Delta H_2^\ddagger$ [kJmol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_2^\ddagger$ [JK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
Guo	310	2,5	2,00 ± 0,20	2,40 ± 0,20	-	-
5'-GMP			1,20 ± 0,10	4,10 ± 0,30	22 ± 2	-193 ± 6
L-His			0,55 ± 0,02	1,70 ± 0,05	-	-
Guo	310	7,2	2,70 ± 0,30	1,10 ± 0,40	-	-
5'-GMP			2,50 ± 0,10	2,00 ± 0,30	37 ± 6	-142 ± 19
L-His			0,70 ± 0,05	3,10 ± 0,20	-	-
Комплекс <sup>b</sup>	T/K	pD	$k_2$ [ $10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]			
Guo	295	8,4	4,30 ± 0,03			
5'-GMP			3,40 ± 0,02			
L-His			0,60 ± 0,01			

<sup>a</sup>Константе одређене помоћу UV-Vis експеримената у 0,1 M NaClO<sub>4</sub> и 25 mM HEPES пуферу.

<sup>b</sup>Константе одређене помоћу <sup>1</sup>H NMR спектроскопије.

Испитивање реакција супституције [Ru( $\eta^6$ -p-cym)(pydc)Cl] комплекса са 5'-GMP на три различите температуре омогућило је одређивање вредности термодинамичких параметара које су дате у Табели 3.11. Мале вредности за  $\Delta H^\ddagger$  и негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују на асоцијативни механизам супституције.

На основу добијених резултата може се видети да су одговарајући азот-донорски биомолекули веома добри улазни лиганди за рутенијум(II) комплексе. Гуанозин је најбољи нуклеофил, при чему реактивност лиганда опада у низу: Guo > 5'-GMP > L-His. Редослед реактивности испитиваних лиганда идентичан је на pH = 2,5 и на pH = 7,2. Међутим, константе брзина реакције другог реда имају веће вредности на pH = 7,2 у односу на pH = 2,5.

Молекула 5'-GMP може да се координује за јоне метала преко N1 и N7 доворских атома. У неутралној и слабо киселој средини N1 атом у молекулу 5'-GMP је протонан,  $pK_a(N1) = 9,3$ ,<sup>133</sup> док је N7 атом, чија је константа киселости  $pK_a(N7) = 2,48$ ,<sup>133</sup> у тим условима депротонан. На тај начин се објашњава фаворизовано координовање јона метала преко N7 атома из 5'-GMP у биолошким системима.<sup>154-157</sup> Guo се понаша веома слично с обзиром да су  $pK_a$  вредности сличне:  $pK_a(N7) = 2,11$  и  $pK_a(N1) = 9,22$ .<sup>148</sup> Аминокиселина L-His се може координовати за јоне метала преко N1 и N3 атома имидазоловог прстена. Координација се превасходно врши преко N3 атома ( $pK_a(N3) = 6,5$ ).<sup>158,159</sup> 5'-GMP је у свим случајевима показао већу реактивност у односу на аминокиселину L-His. Већа реактивност 5'-GMP се може објаснити дејством јаким електростатичким интеракција између полазног комплекса и 5'-GMP који је при одабраним експерименталним условима наелектрисан 2-.<sup>133</sup>

### 3.4.2. <sup>1</sup>H NMR кинетичка мерења

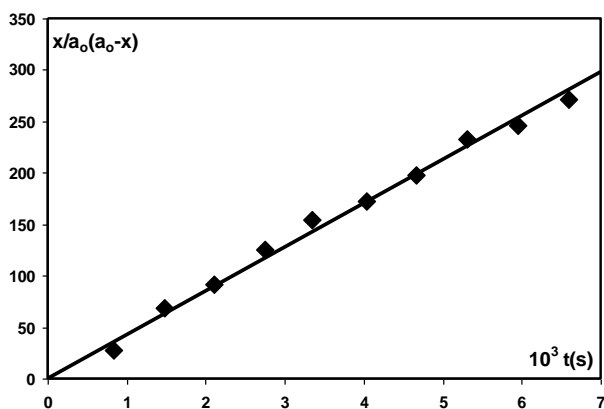
При физиолошким условима метални комплекси обично подлежу трансформацијама пре него што стигну до одговарајуће мете. Трансформација комплекса може укључити реакције измене лиганда или редукцију јона метала. Општи механизам активације монофункционалних органометалних комплекса укључује брзу хидролизу хлоридо лиганда и формирање активног аква комплекса.<sup>62</sup>

Хлоридо лиганд у  $[Ru(\eta^6\text{-p-cym})(pydc)Cl]$  комплексу је веома лабилан у воденом раствору и лако подлеже супституцији. Овај аква комплекс подлеже веома брзо хидролизи, већ у току снимања првог NMR спектра, формирајући одговарајући аква комплекс. Додатак вишка NaCl у равнотежни раствор доводи до померања равнотеже ка формирању хлоридо комплекса.

Кинетика супституционих реакција  $[Ru(\eta^6\text{-p-cym})(pydc)(H_2O)]^+$  комплекса са азот-донорским лигандима (5'-GMP, Guo и L-His) испитивана је и помоћу <sup>1</sup>H NMR спектроскопије. Реакције су праћене у еквимоларном односу комплекса и лиганда (4 mM) на pH = 8,40 у временском интервалу од 5 сати. Константа брзине реакције другог реда,  $k_2$ , у овом случају, одређена је на основу једначине (3.4.2.1):

$$k_2 t = \frac{x}{a_0(a_0-x)} \quad (3.4.2.1)$$

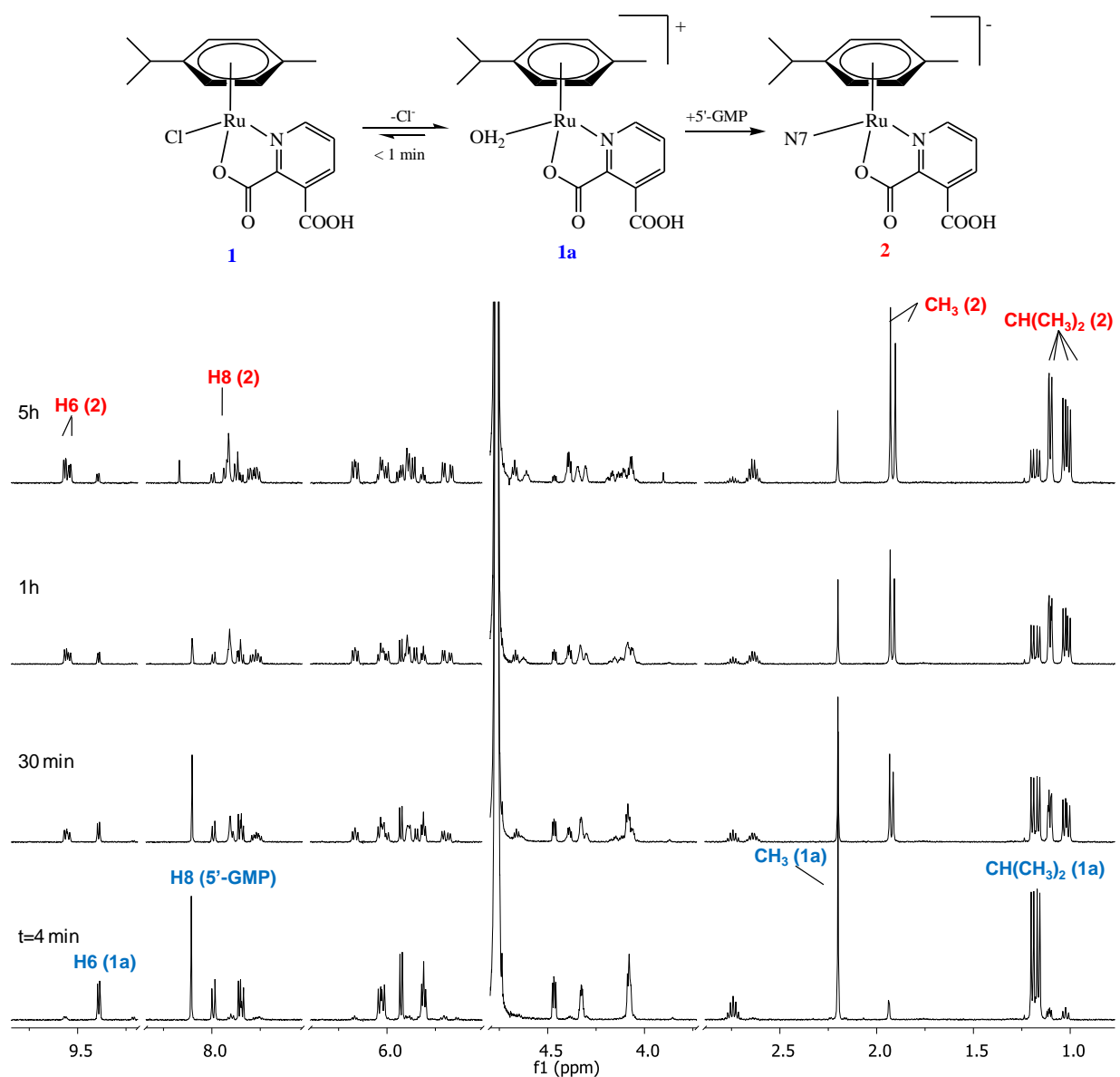
у којој  $a_0$  представља почетну концентрацију аква рутенијум(II) комплекса, а  $x$  концентрацију производа супституционе реакције.<sup>96</sup> Израчунавање концентрације производа реакције је вршено на основу интензитета одговарајућих сигнала у  $^1\text{H}$  NMR спектру који потичу од координованог и слободног лиганда (грешка процене је 5%). Вредности за константе брзина (Табела 3.11) добијају се из нагиба Гугенхајмове (Guggenheim) праве,<sup>101,160</sup> која представља зависност  $x/a_0(a_0-x)$  од времена  $t$  (Слика 3.78). На основу израчунатих константи може се потврдити исти редослед реактивности испитиваних лиганда. Поред тога, константе добијене  $^1\text{H}$  NMR спектроскопијом су од 3 до 9 пута мање од вредности добијених помоћу UV-Vis спектрофотометрије, што се може приписати утицају температуре, имајући у виду да су  $^1\text{H}$  NMR експерименти извођени на 295 К.



**Слика 3.78.** Guggenheim-ова зависност  $x/a_0(a_0-x)$  у функцији од времена  $t$  за реакцију супституције (4 mM)  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  комплекса са (4 mM)  $\text{Guo}$  на 295 К на  $\rho D = 8,40$

Интеракција  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  (1) комплекса са 5'-GMP (1 eq, 4 mM) у  $\text{D}_2\text{O}$  испитивана је помоћу моно- ( $^1\text{H}$ ) и дво-димензионалне ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) NMR спектроскопије (Слика 3.79 и 3.80). Анализом добијених спектра може се уочити нов сет Н8 и  $\text{CH}_3$  сигнала ( $\delta = 7,91, 1,93$  и  $1,91$  ppm), који је померен ка нижим вредностима

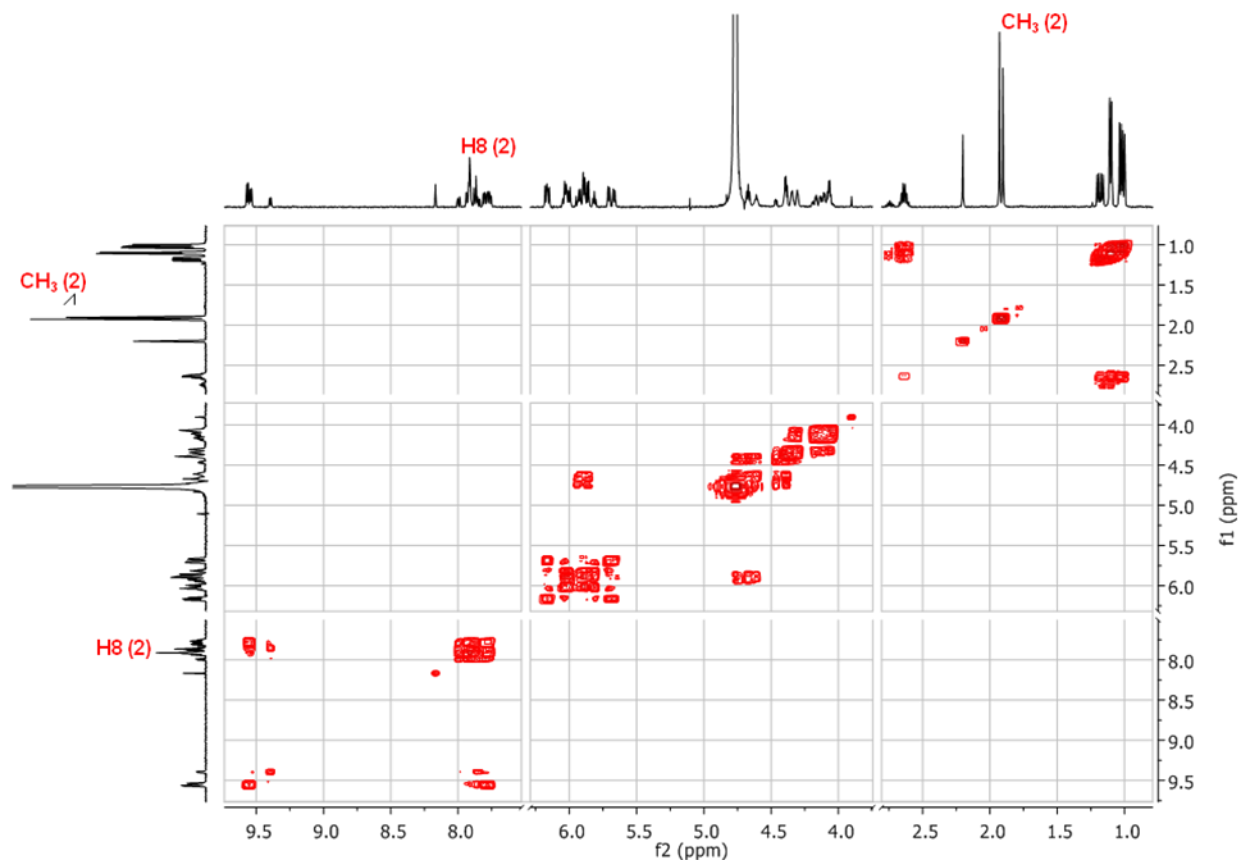
хемијског померања у односу на сигнале слободног лиганда и арена комплекса ( $\delta = 8,11$  и  $2,20$  ppm).



**Слика 3.79.**  $^1\text{H}$  NMR спектралне промене током интеракције  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-cym})(\text{pudc})\text{Cl}]$  комплекса са 5'-GMP (1 eq, 4 mM) у  $\text{D}_2\text{O}$  на 295 K

Нов сет сигнала који потиче од pudc и координованог 5'-GMP приписан је производу  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pudc})(5'\text{-GMP-N7})]^-$  (**2**). Аналогне спектралне промене су добијене, такође, и у области H6 протона pudc лиганда и  $\text{CH}_3$  протона изопропил групе ( $\delta = 9,39$  и  $1,18$  ppm),

где се појављују по два нова дублета ( $\delta = 9,55, 1,10$  и  $1,02$  ppm). Важно је напоменути да је рутенијум хирални центар у арена комплексу, имајући три различита донорска атома, тако да координовањем 5'-GMP сваки сигнал је раздвојен на два сигнала једнаких интензитета, који се могу приписати једнаким количинама дијастереоизомера. Равнотежа је постигнута након 5 сати са 75% производа **2**.

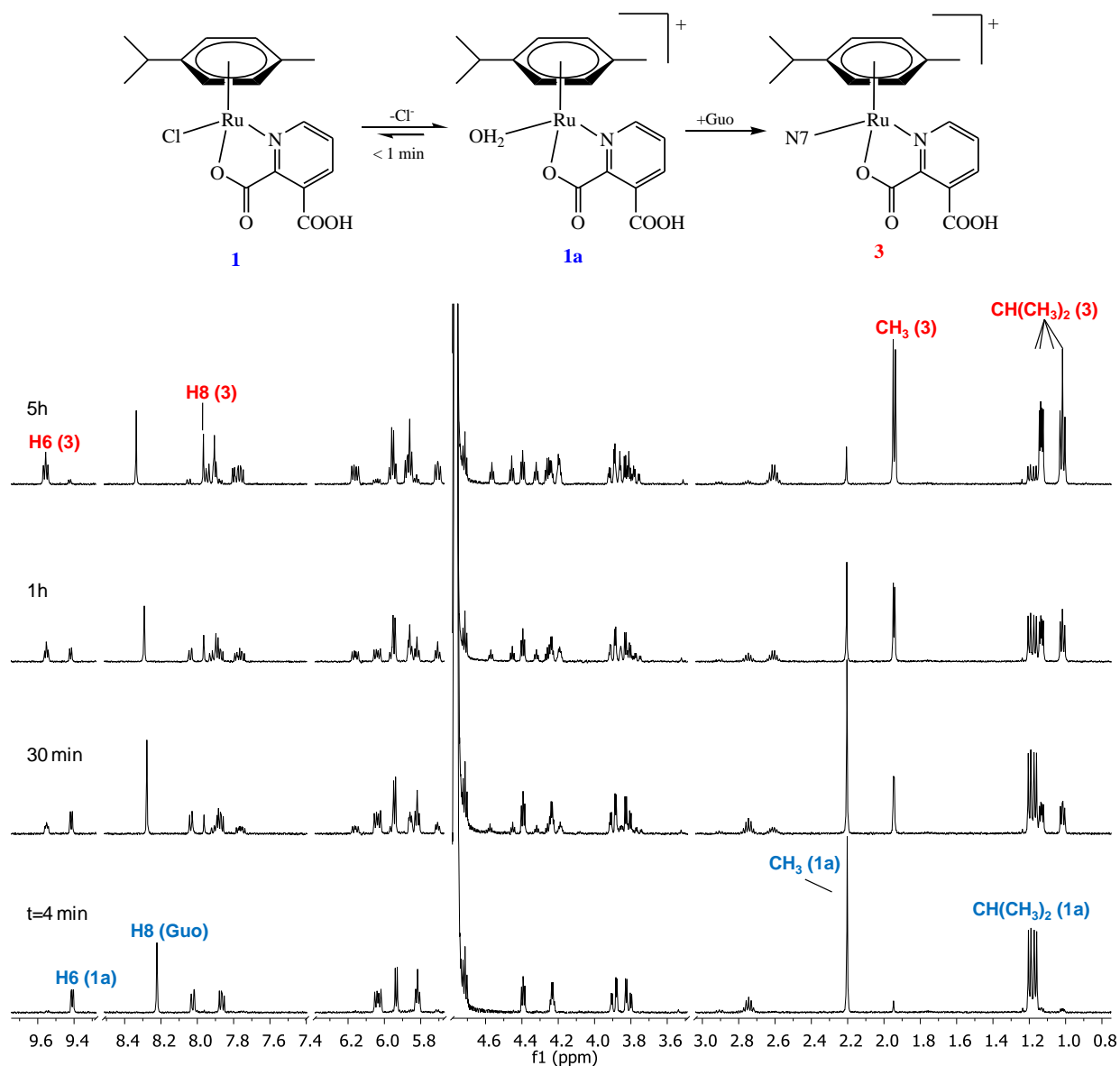


Слика 3.80.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR спектар снимљен 5 сати након интеракције  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-sym})(\text{pudc})\text{Cl}]$  комплекса са 5'-GMP (1 eq, 4 mM) у  $\text{D}_2\text{O}$  на 295 K.

Испитивана је и реакција комплекса **1** са Guo (1eq, 4 mM) помоћу моно- ( $^1\text{H}$ ) и дводимензионалне ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) NMR спектроскопије (Слика 3.81 и 3.82). Анализом спектра може се приметити, такође, појава два дијастереоизомера  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-sym})(\text{pudc})(\text{Guo-N7})]^+$  (**3**). Два нова синглета  $\text{CH}_3$  протона једнаких интензитета су јасно раздвојена на  $\delta = 1,95$  и  $1,94$  ppm, док су остале резонанце Guo и pudc лиганда делимично преклопљене. Интензитет нових резонанци H8, H6 и  $\text{CH}_3$  протона изопропил групе ( $\delta = 9,56, 8,34, 1,13$  и  $1,02$  ppm) расте у току реакције, док интензитет сигнала



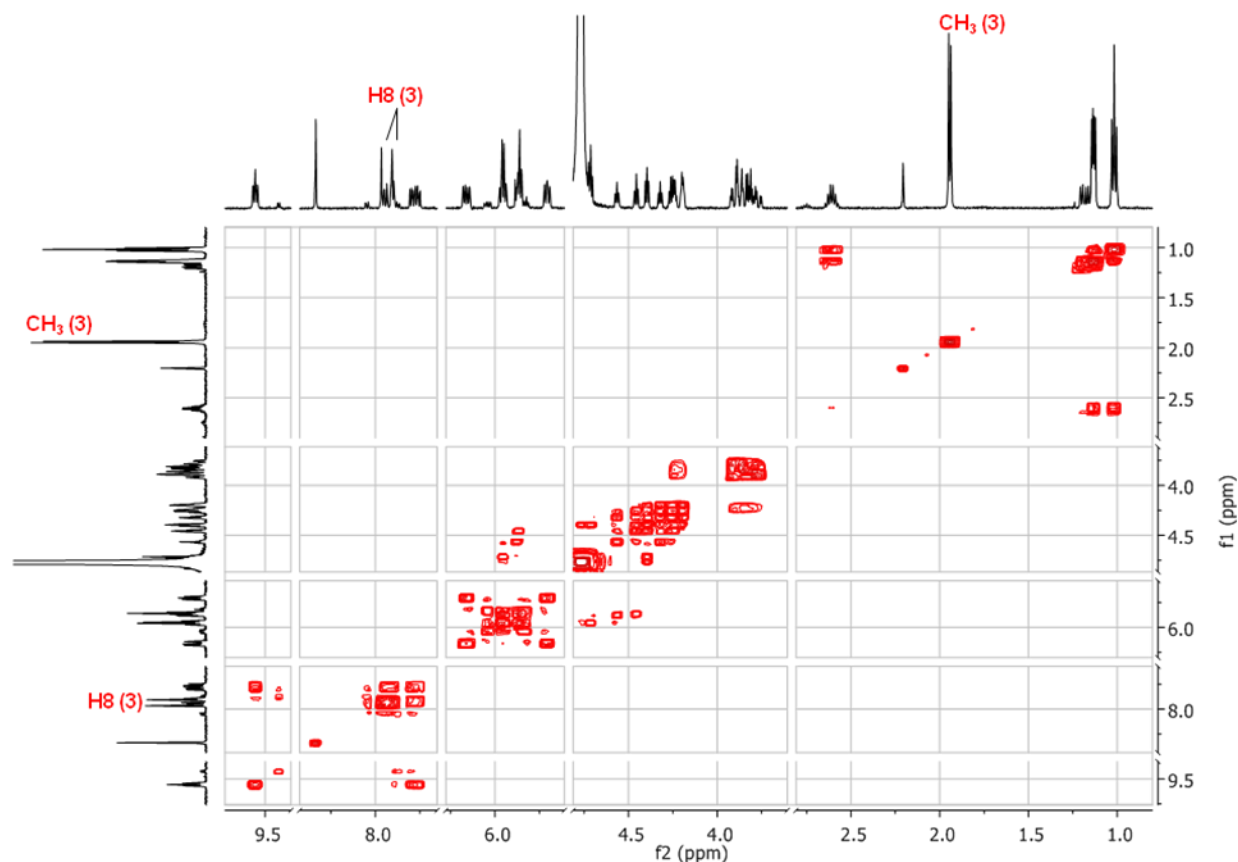
слободног Guo и арена комплекса опада ( $\delta = 9,43, 8,23, 1,20$  и  $1,17$  ppm) са временом. Равнотежа је постигнута након 5 сати са 82% производа **3**.



**Слика 3.81.**  $^1\text{H}$  NMR спектралне промене током интеракције  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  комплекса са Guo (1 eq, 4 mM) у  $\text{D}_2\text{O}$  на 295 K

NMR експериментални резултати показују да  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  комплекс реагује са азот-донорским биомолекулима дајући монофункционалне производе. Брзина реакције за испитивани рутенијум(II) арена комплекс расте у следећем низу: Guo > 5'-GMP

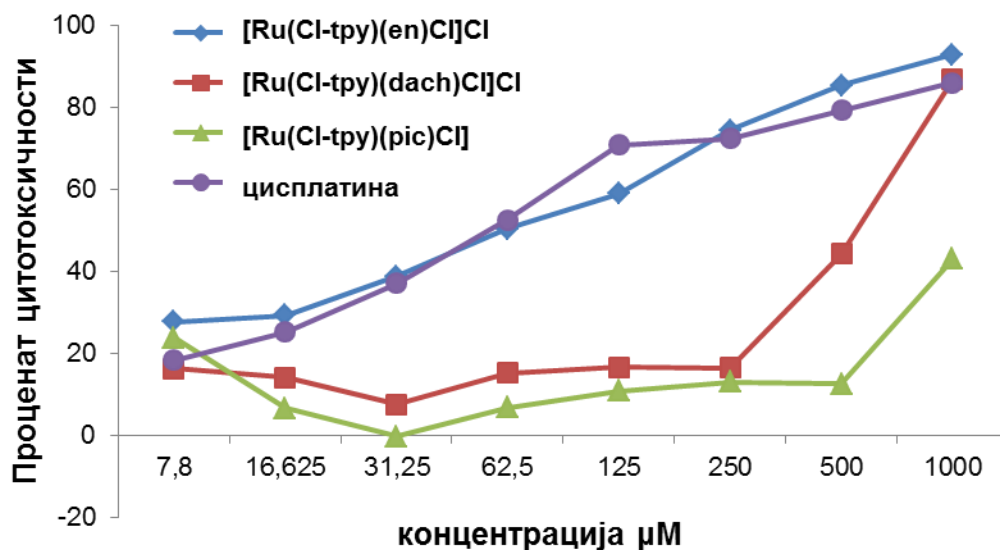
> L-His. Важно је напоменути да нису детектовани интермедијери, тј. везивање 5'-GMP преко кисеоника фосфатне групе, као у случају „half sandwich” рутенијум(II) тритиа комплекса.<sup>62,129</sup>



Слика 3.82.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR спектар снимљен 5 сати након интеракције  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  комплекса са Guo (1 eq, 4 mM) у  $\text{D}_2\text{O}$  на 295 K

### 3.5. Испитивање цитотоксичности рутенијум(II) полипиридил комплекса

Цитотоксичност рутенијум(II) полипиридил комплекса,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}]\text{Cl}$ ,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}]\text{Cl}$  и  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{pic})\text{Cl}]$ , испитивана је према ћелијској линији тумора дебелог црева миша (CT26). На Слици 3.83 прказани су резултати испитивања. Добијени резултати су упоређивани са цитотоксичношћу цисплатине према истој ћелијској линији.



Слика 3.83. Цитотоксичност тестираних комплекса мерена помоћу МТТ теста

Цитотоксична активност испитиваних рутенијум(II) терпиридин комплекса зависи од врсте комплекса, дозе комплекса и времена излагања. Највећи цитотоксични ефекат је примећен код [Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl комплекса. Он је показао скоро идентичан ефекат на СТ26 ћелијама као и цисплатина. У концентрацијама већим од 125  $\mu\text{M}$  [Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl је уништавао преко 50% СТ26 ћелија, а у концентрацији 1000  $\mu\text{M}$  готово све СТ26 ћелије (92,84%). Цитотоксичност [Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl комплекса је значајно већа у односу на остала два комплекса рутенијума(II). [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl и [Ru(Cl-tpy)(pic)Cl] комплекси су показали слабу цитотоксичност, изразито слабију у односу на цисплатину. Процент мртвих СТ26 ћелија након третирања са комплексима [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl и [Ru(Cl-tpy)(pic)Cl] у концентрацијама 7,8-250  $\mu\text{M}$  је био релативно низак < 15%. [Ru(Cl-tpy)(pic)Cl] комплекс је и у концентрацијама 500  $\mu\text{M}$  (процент мртвих ћелија је 12,6) и 1000  $\mu\text{M}$  (процент мртвих ћелија је 43,06) имао слабу цитотоксичну активност. [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl комплекс је тек у концентрацији од 1000  $\mu\text{M}$  имао релативно високу цитотоксичност, 86,73% мртвих ћелија.

## ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата у оквиру ове докторске дисертације могу се извести следећи закључци:

### *1. Нови рутенијум(II) терпиридин комплекси: синтеза, карактеризација, активациона кинетика и интеракција са дериватима гуанина:*

- Резултати рендгенске структурне анализе су показали да комплекси имају типичну издужену октаедарску структуру, који садрже тридентатни Cl-tpy или tpy лиганд у очекиваном меридијалном положају, *N-N* бидентатни хелатни лиганд и шесто место окупирано је јоном хлора (у комплексу **3<sub>Cl</sub>**) или молекулом dmsо-S координованог преко сумпора (у комплексима **6**, **8** и **10**).
- Сви новосинтетизовани комплекси су добро растворни у води (> 25 mg/mL), осим [Ru(Cl-tpy)(bpy)(dmsо-S)][Y]<sub>2</sub> комплекса (**8**, Y = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> или PF<sub>6</sub>).
- Хлоридо деривати **1-5** хидролизују релативно брзо, док су dmsо деривати инертни у воденом раствору.
- Ред реактивности испитиваних комплекса за реакцију хидролизе зависи од природе бидентатног хелатног лиганда: **2** (dach) > **1** (en).
- За одговарајуће рутенијум(II)-tpy комплексе одређене су рK<sub>a</sub> вредности: 10,50 ± 0,03 за **1aq**, 10,26 ± 0,02 за **2aq** и 9,56 ± 0,01 за **3aq**. Депротонација аква комплекса зависи од природе *N-N* хелатног лиганда: присуство ароматичног bpy повећава киселост аква лиганда, док измена en са dach лигандом има веома мали утицај.
- Ред реактивности испитиваних комплекса за реакцију супституције са 9MeG и 5'-GMP зависи од природе хелатног лиганда **2** (dach) > **1** (en), као и од наелектрисања улазног лиганда (5'-GMP > 9-MeG).
- Интеракцијом испитиваних рутенијум-tpy комплекса са дериватима гуанина настаје само један монофункционални производ Ru-(N7)DNA.

- Комплекс **1** показује селективност при координовању за 5'-GMP у конкуренцији са 5'-AMP.

**2. Интеракција рутенијум(II) терпиридин комплекса са сумпор- и азот-донорским биомолекулима:**

- Резултати испитивања супституционих реакција два рутенијум(II)-трп комплекса, [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl] (**1**) и [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] (**2**), са Tu, L-Cys, L-Met, Pz, Tz и Ру јасно показују да брзина реакције зависи од природе хелатног лиганда: en комплекс **1** реагује 2 пута брже у односу на dach комплекс **2**.
- Реактивност изучаваних лиганда опада у следећем низу: Tu > L-Cys > Pz > Tz > Ру > L-Met.
- Негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују на асоцијативни механизам супституције.
- ДФТ израчунавања указују на јасну предност координације гуанина у односу на координацију тиоетра.
- У складу са NMR резултатима, реакције комплекса **1** и **2** воде ка формирању тиолато комплекса [Ru(Cl-tpy)(en)(SR)]<sup>+</sup> (**4**) и [Ru(Cl-tpy)(dach)(SR)]<sup>+</sup> (**11**), а затим до оксидације тиолног сумпора везаног за рутенијум(II), формирајући сулфенато комплексе [Ru(Cl-tpy)(en)(RSO)]<sup>2+</sup> (**5**) и [Ru(Cl-tpy)(dach)(RSO)]<sup>2+</sup> (**12**).
- Разлика у стабилности N2 и N4 производа је поред NMR спектроскопије додатно потврђена и помоћу ДФТ израчунавања.

**3. Фактори који утичу на антипролиферативну активност Ru<sup>II</sup>-[9]aneS3 комплекса, активациона кинетика и интеракције са дериватима гуанина:**

- Брзина реакције хидролизе [Ru([9]aneS3)(en)Cl][PF<sub>6</sub>] (**1**), [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl][PF<sub>6</sub>] (**2**) и [Ru([9]aneS3)(pic)Cl] (**3**) комплекса зависи од природе и наелектрисања бидентатног хелатног лиганда: **1** (en) > **3** (pic) > **2** (bpy).
- Ред реактивности испитиваних комплекса за интеракције са 5'-GMP зависи такође од природе хелатног лиганда: **3** (pic) > **2** (bpy) > **1** (en).

- Интеракцијом испитиваних рутенијум-третиа комплекса са дериватима гуанина настаје само један монофункционални производ Ru-(N7)DNA, директно или преко интермедијера.
- Рендгенска структурна анализа комплекса [Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)][PF<sub>6</sub>]<sub>2</sub> (**4**) и [Ru([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)][PF<sub>6</sub>] (**10**) показује да када хелатни лиганд поседује могућност формирања водоничне везе (chel = en), долази до додатне стабилизације стварањем интрамолекуларске водоничне везе између C(6)=O гуанина и NH групе en.
- Негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују на асоцијативни механизам супституције.

**4. Кинетика и механизам супституционих реакција рутенијум(II) арена комплекса са биолошки релевантним лигандима:**

- Ред реактивности испитиваних лиганада у реакцији са рутенијум(II) арена комплексом, [Ru<sup>II</sup>( $\eta^6$ -p-cym)(pydc)Cl], је исти на обе рН вредности: Guo > 5'-GMP > L-His.
- Испитиван рутенијум(II) арена комплекс је показао већу реактивност на рН = 7,2 у односу на реактивност на рН = 2,5.
- Негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују да се процес супституције испитиваног комплекса одвија по асоцијативном механизму.
- Хидролиза [Ru<sup>II</sup>( $\eta^6$ -p-cym)(pydc)Cl] комплекса је веома брза и завршава се за време снимања првог спектра.

**5. Испитивање цитотоксичности рутенијум(II) полипиридил комплекса:**

- Цитотоксичност [Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl комплекса према ћелијској линији тумора дебелог црева (СТ26) је значајно већа у односу на [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl и [Ru(Cl-tpy)(pic)Cl] комплексе.
- [Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl комплекс је показао скоро идентичан ефекат на СТ26 ћелији као и цисплатина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. A. Levina, A. Mitra and P. A. Lay, *Metallomics*, 2009, **1**, 458-470.
2. a) H. Taube, *Surv. Prog. Chem.*, 1973, **6**, 1-46; b) H. Taube, *Coord. Chem. Rev.*, 1978, **26**, 1-5.
3. J. E. Huheey, *Principles of Structure and Reactivity*, 2<sup>nd</sup> edn., Ed. Harper and Row, New York, 1978, p. 276.
4. H. Krentzien and H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 6379-6380.
5. a) M. J. Clarke, F. Zhu and D. R. Frasca, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2511-2533; b) M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **236**, 209-233.
6. a) A. D. Kelman, M. J. Clarke, S. D. Edmonds and H. J. Peresie, *J. Clin. Hem. Onc.*, 1977, **7**, 274-288; b) M. J. Clarke, *Met. Complexes Cancer Chemother.*, 1993, 129-157.
7. P. Schluga, C. G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, M. A. Jakupec and B. K. Keppler, *Dalton Trans.*, 2006, **14**, 1796-1802.
8. C. S. Allarduce and P. J. Dyson, *Platinum Met. Rev.*, 2001, **45**, 62-69.
9. G. Sava and A. Bergamo, *Int. J. Oncol.*, 2000, **17**, 353-365.
10. S. C. Srivastava, L. F. Mausner and M. J. Clarke, *Prog. Clin. Biochem. Med.*, 1989, **10**, 112-49.
11. G. Sava, S. Zorzet, T. Giralidi, G. Mestroni and G. Zassinovich, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1984, **20**, 841-847.
12. M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **232**, 69-93.
13. Y. J. Chang, H. L. Kim, S. J. Sacket, K. Kim, M. Han, J. Y. Jo, D. S. Im, *J. Appl. Pharmacol.*, 2007, **15**, 150-155.
14. G. Mestroni, E. Alessio, G. Sava, S. Pacor, M. Coluccia and A. Boccarelli, *Metal-Based Drugs*, 1994, **1**, 41-63.
15. E. Alessio, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 4203-4242.
16. I. Bratsos, A. Bergamo, G. Sava, T. Gianferrera, E. Zangrando and E. Alessio, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 606-617.
17. I. Bratsos, S. Jedner, T. Gianferrera and E. Alessio, *Chimia*, 2007, **61**, 692-697.

18. E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo and G. Sava, *Met. Ions Biol. Syst.*, 2004, **42**, 323-351.
19. A. Bergamo and G. Sava, *Dalton. Trans.*, 2007, 1267-1272.
20. E. Reisner, V. B. Arion, B. K. Keppler and A. J. L. Pombeiro, *Inorg. Chim. Acta*, 2008, **361**, 1569-1583.
21. C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessler, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson and B. K. Keppler, *Chem. Biodiversity*, 2008, **5**, 2140-2155.
22. C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas and B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 891-904.
23. N. J. Wheate, C. R. Brodie, J. G. Collins, S. Kemp and J. R. Aldrich-Wright, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2007, **7**, 627-648.
24. E. Corral, A. C. G. Hotze, H. den Dulk, A. Leczkowska, A. Rodger, M. J. Hannon and J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, **14**, 439-448.
25. D. Chatterjee, A. Mitra and G. S. De, *Platinum Met. Rev.*, 2006, **50**, 2-12.
26. W. H. Ang and P. J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 4003-4018.
27. S. J. Dougan and P. J. Sadler, *Chimia*, 2007, **61**, 704-715.
28. P. J. Dyson, *Chimia*, 2007, **61**, 698-703.
29. Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam and P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, 2005, 4764-4776.
30. M. Melchart and P. J. Sadler, in *Bioorganometallics*, Ed. G. Jaouen, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2006, pp. 39-64.
31. A. Bergamo, A. Masi, P. J. Dyson and G. Sava, *Int. J. Oncol.*, 2008, **33**, 1281-1289.
32. V. Brabec, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2002, **71**, 1-68.
33. V. Brabec and O. Novakova, *Drug Resist. Updates*, 2006, **9**, 111-122.
34. A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko and B. Keppler, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 2224-2248.
35. D. Kalinowski and D. R. Richardson, *Pharmacol. Rev.*, 2005, **57**, 547-583.
36. B. Gava, S. Zorzet, P. Spessotto, M. Cocchietto and G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, **317**, 284-291.
37. G. Sava, F. Frausin, M. Cocchietto, F. Vita, E. Podda, P. Spessotto, A. Furlani, V. Scarcia and G. Zabucchi, *Eur. J. Cancer*, 2004, **40**, 1383-1396.



38. G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. DiGiovine, G. Pezzoni, L. Sartor and S. Garbisa, *Clin. Cancer Res.*, 2003, **9**, 1898–1905.
39. A. Casini, C. Gabbiani, F. Sorrentino, M. P. Rigobello, A. Bindoli, T. J. Geldbach, A. Marrone, N. Re, C. G. Hartinger, P. J. Dyson and L. Messori, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 6773–6781.
40. W. H. Ang, A. De Luca, C. Chapuis-Bernasconi, L. Juillerat-Jeanneret, M. Lo Bello and P. J. Dyson, *ChemMedChem*, 2007, **2**, 1799–1806.
41. D. Chatterjee, A. Mitra, A. Levina and P. A. Lay, *Chem. Commun.*, 2008, 2864–2866.
42. E. Meggers, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007, **11**, 287–292.
43. P. C. A. Bruijninx and P. J. Sadler, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, **12**, 197–206.
44. G. I. Pascu, A. C. G. Hotze, C. Sanchez-Cano, B. M. Kariuki and M. J. Hannon, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 4374–4378.
45. a) G. Sava, E. Alessio, A. Bergamo and G. Mestroni, in *Topics in Biological Inorganic Chemistry*, Eds. M. J. Clarke and P. J. Sadler, Springer, Berlin, 1999, p. 143; b) E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo and G. Sava, *Curr. Topics Med. Chem.*, 2004, **4**, 1525–1535.
46. G. Sava, A. Bergamo, S. Zorzet, B. Gava, C. Casarsa, M. Cocchietto, A. Furlani, V. Scarcia, B. Serli, E. Iengo, E. Alessio and G. Mestroni, *Eur. J. Cancer*, 2002, **38**, 427–435.
47. M. Brindell, D. Piotrowska, A. A. Shoukry, G. Stochel and R. Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 809–818.
48. M. Groessl, E. Reisner, C. G. Hartinger, R. Eichinger, O. Semenova, A. R. Timerbaev, M. A. Jakupec, V. B. Arion and B. K. Keppler, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 2185–2193.
49. M. Brindell, I. Stawoska, J. Supel, A. Skoczowski, G. Stochel and R. Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, **13**, 909–918.
50. G. Sava, I. Capozzi, K. Clerici, G. Gagliardi, E. Alessio and G. Mestroni, *Clin. Exp. Metastasis*, 1998, **16**, 371–379.
51. E. S. Antonarakis and A. Emadi, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2010, **66**, 1–9.
52. H. Chen, J. A. Parkinson, S. Parsons, R. A. Coxall, R. O. Gould and P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 3064–3082.

53. Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam and P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, 2005, 4764-4776.
54. R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler and D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer*, 2002, **86**, 1652-1657.
55. A. F. A. Peacock and P. J. Sadler, *Chem Asian J.*, 2008, **3**, 1890-1899.
56. R. E. Morris, R. E. Aird, P. del S. Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell and P. J. Sadler, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 3616-3621.
57. R. Fernandez, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons and P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.*, 2004, **10**, 5173-5179.
58. A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernandez, S. Parsons, I. D. H. Oswald, A. Parkin, F. P. A. Fabbiani, J. E. Davidson, A. Dawson, R. E. Aird, D. I. Jodrell and P. J. Sadler, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 6858-6868.
59. S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, G. Rakić, N. Todorović, N. Gligorijević, S. Radulović, V. B. Arion, B. K. Keppler and Ž. Lj. Tešić, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 1051-1058.
60. N. Gligorijević, S. Arandelović, L. Filipović, K. Jakovljević, R. Janković, S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, S. Radulović and Ž. Lj. Tešić, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **108**, 53-61.
61. I. Ivanović, S. Grgurić-Šipka, N. Gligorijević, S. Radulović, A. Roller, Ž. Lj. Tešić and Bernhard K. Keppler, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2011, **76**, 53-61.
62. H. Chen, J. A. Parkinson, R. E. Morris and P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 173-186.
63. F. Wang, H. Chen, S. Parsons, I. D. H. Oswald, J. E. Davidson and P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.*, 2003, **9**, 5810-5820.
64. H.-K. Liu, S. J. Berners-Price, F. Wang, J. A. Parkinson, J. Xu, J. Bella and P. J. Sadler, *Angew. Chem.*, 2006, **45**, 8153-8156.
65. O. Novakova, H. Chen, O. Vrana, A. Rodger, P. J. Sadler and V. Brabec, *Biochem.*, 2003, **42**, 11544-11554.
66. J. Reedijk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, **100**, 3611-3616.
67. F. Wang, H. Chen, J. A. Parkinson, P. del S. Murdoch and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 4509-4523.

68. L. Messori, P. Orioli, D. Vullo, E. Alessio and E. Iengo, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 1206-1213.
69. F. Piccioli, L. Messori, P. Orioli, B. Keppler, E. Alessio and G. Sava, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, **86**, 379-379.
70. F. Wang, J. Xu, A. Habtemariam, J. Bella and P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 17734-17743.
71. a) F. Y. Wang, J. Bella, J. A. Parkinson and P. J. Sadler, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2005, **10**, 147-155; b) J. P. Williams, J. M. Brown, I. Campuzano and P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 5458-5460; c) I. W. McNae, K. Fishburne, A. Habtemariam, T. M. Hunter, M. Melchart, F. Y. Wang, M. D. Walkinshaw and P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, 2004, **16**, 1786-1787.
72. a) A. Casini, C. Gabbiani, E. Michelucci, G. Pieraccini, G. Moneti, P. J. Dyson and L. Messori, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, **14**, 761-770; b) A. Casini, A. Karotki, C. Gabbiani, F. Rugi, M. Vasak, L. Messori and P. J. Dyson, *Metallomics*, 2009, **1**, 434-441; c) S. M. Meier, M. Hanif, W. Kandioller, B. K. Keppler and C. G. Hartinger, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **108**, 91-95.
73. W. Hu, Q. Luo, X. Ma, K. Wu, J. Liu, Y. Chen, S. Xiong, J. Wang, P. J. Sadler and F. Wang, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 6586-6594.
74. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellis and S. L. Heath, *Chem. Comm.*, 2001, **15**, 1396-1397.
75. C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurencyzy, T. J. Geldbach, G. Sava and P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4161-4171.
76. B. Serli, E. Zangrando, T. Gianferrara, C. Scolaro, P. J. Dyson, A. Bergamo and E. Alessio, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2005, 3423-3434.
77. I. Bratsos, S. Jedner, A. Bergamo, G. Sava, T. Gianferrara, E. Zangrando and E. Alessio, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 1120-1133.
78. I. Bratsos, G. Birarda, S. Jedner, E. Zangrando and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2007, 4048-4058.
79. I. Bratsos, E. Mitri, F. Ravalico, E. Zangrando, T. Gianferrara, A. Bergamo and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 7358-7371.

80. I. Bratsos, D. Urankar, E. Zangrando, P. Genova-Kalou, J. Košmrlj, E. Alessio and I. Turel, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 5188-5199.
81. I. Bratsos, C. Simonin, E. Zangrando, T. Gianferrara, A. Bergamo and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 9533-9543.
82. O. Novakova, J. Kasparkova, O. Vrana, P. M. van Vliet, J. Reedijk and V. Brabec, *Biochemistry*, 1995, **34**, 12369-12378.
83. P. M. van Vliet, S. M. S. Toekim, J. G. Haasnoot, J. Reedijk, O. Novakova, O. Vrana and V. Brabec, *Inorg. Chim. Acta*, 1995, **231**, 57-64.
84. P. M. van Vliet, J. G. Haasnoot and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 1934-1939.
85. F. Zobi, M. Hohi, I. Zimmermann and R. Alberto, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 2771-2772.
86. C. C. Cheng, W. L. Lee, J. G. Su and C. L. Liu, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2000, **47**, 213-220.
87. E. Corral, A. C. G. Hotze, D. M. Tooke, A. L. Spek and J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 2006, **359**, 830-838.
88. K. Karidi, A. Garoufis, N. Hadjiliadis, M. Lutz, A. L. Spek and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 10282-10292.
89. E. Corral, A. C. G. Hotze, A. Magistrato and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 6715-6722.
90. A. H. Velders, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, D. de Vos and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 2966-2967.
91. A. C. G. Hotze, S. E. Caspers, D. de Vos, H. Kooijman, A. L. Spek, A. Flamigni, M. Bacac, G. Sava, J. G. Haasnoot and J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2004, **9**, 354-364.
92. A. C. G. Hotze, M. Bacac, A. H. Velders, B. A. J. Jansen, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot and J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 1743-1750.
93. A. C. G. Hotze, E. P. L. van der Geer, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot and J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2005, 2648-2657.
94. R. van Eldik, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1649-1662.
95. C. H. Langford and H. B. Gray, in *Ligand Substitution Processes*, Benjamin, New York, 1974, ch. 2.
96. M. L. Tobe and J. Burgess, in *Inorganic Reaction Mechanism*, Longman, England, 1999, ch. 2, 4.

97. Ž. D. Bugarčić, u *Kinetika i Mehanizam Supsticionih Reakcija*, PMF Kragujevac, 1996, pp. 12-32.
98. M. Kotowski and R. van Eldik, in *Inorganic High Pressure Chemistry, Kinetics and Mechanism*, Ed. R. van Eldik, Elsevier, Amsterdam, 1986, ch. 1, 3, 4.
99. R. van Eldik, T. Asano and W. J. Le Noble, *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 549-593.
100. I. Gal, u *Mehanizmi Neorganskih Reakcija*, Naučna knjiga, 1979, ch. 2, 3.
101. C. E. Housecroft and A. G. Sharpe, in *Inorganic Chemistry*, Prentice Hall, Essex, England, 2001, ch. 6, 19, 20, 25.
102. K. J. Laidler, in *Chemical Kinetics*, Harper and Row, New York, 1987, ch. 4, 6.
103. J. H. Espenson, in *Chemical Kinetics and Reaction Mechanism*, 2<sup>nd</sup> Ed., McGraw Hill, New York, 1995, ch. 2, 6.
104. F. Basolo and R. C. Johnson, in *Coordination Chemistry*, 2<sup>nd</sup> Ed., Science Reviews, London, 1987, ch. 6.
105. S. B. Jensen, S. J. Rodger and M. D. Spicer, *J. Organomet. Chem.*, 1998, **556**, 151-158.
106. I. Bratsos and E. Alessio, *Inorg. Synth.*, 2010, **35**, 148-152.
107. B. P. Sullivan, J. M. Calvert and T. Meyer, *J. Inorg. Chem.*, 1980, **19**, 1404-1407.
108. R. Ziessel, V. Grosshenny, M. Hissler and C. Stroh, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 4262-4271.
109. D. J. Wasylenko, C. Ganesamoorthy, B. D. Kolvisto, M. A. Henderson and C. P. Berllnguette, *Inorg. Chem.*, 2010, **49**, 2202-2209.
110. W. Huang and H. Qian, *J. Mol. Struct.*, 2008, **874**, 64-76.
111. a) A. D. Becke, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 5648-5652; b) C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, *Phys. Rev.*, 1988, **37**, 785-789; c) P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski and M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 11623-11627; d) T. H. Dunning and P. J. Hay, *Mod. Theor. Chem.*, 1976, **3**, 1-28; e) P. J. Hay and W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, **82**, 270-283; f) P. J. Hay and W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, **82**, 284-298; g) P. J. Hay and W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, **82**, 299-310; h) *Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations* (Ed.: S. Huzinaga), Elsevier, Amsterdam, 1984.
112. The performance of the computational level employed in this study is well documented, see for example: a) R. Puchta, R. Meier, N. J. R. van Eikema Hommes and R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, **56**, 4063 – 4067; b) A. Scheurer, H. Maid, F. Hampel, R. W. Saalfrank, L. Toupet, P. Mosset, R. Puchta and N. J. R. Van Eikema Hommes, *Eur. J.*

- Org. Chem.*, 2005, **63**, 2566-2574; c) P. Illner, A. Zahl, R. Puchta, N. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid and R. van Eldik, *J. Organomet. Chem.*, 2005, **690**, 3567-3576; d) Ch. F. Weber, R. Puchta, N. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid and R. van Eldik, *Angew. Chem.*, 2005, **117**, 6187-6192; e) Ch. F. Weber, R. Puchta, N. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid and R. van Eldik, *Angew. Chem Int. Ed.*, 2005, **44**, 6033-6038.
113. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, J. T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez and J. A. Pople, Gaussian 03, (Revision B.03), Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2004.
114. a) V. Barone and M. Cossi, *J. Phys. Chem.*, 1998, **102**, 1995-2001. b) M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega and V. J. Barone, *Comp. Chem.*, 2003, **24**, 669-681.
115. A. Altomare, M. C. Burla, M. Camalli, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. G. G. Moliterni, G. Polidori and R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.*, 1999, **32**, 115-119.
116. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, 2008, **64**, 112-122.
117. A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo and A. Guagliardi, *J. Appl. Crystallogr.*, 1993, **26**, 343-350.
118. L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, 1999, **32**, 837-838.
119. Y. Mulyana, G. Collins and R. Keene, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, 2011, **71**, 371-379.
120. D. Chatterjee, A. Sengupta and A. Mitra, *Polyhedron*, 2007, **26**, 178-183.

121. M. N. Patel, D. S. Gandhi, P. A. Parmar and H. N. Joshi, *J. Coord. Chem.*, 2012, **65**, 1926-1936.
122. G. S. Papaefstathiou, A. Sofetis, C. P. Raptopoulou, A. Terzis, G. A. Spyroulias and T. F. Zafiroopoulos, *J. Mol. Struct.*, 2007, **837**, 5-14.
123. K. Nakamoto, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, Part B*. 6<sup>th</sup>, Ed. John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, New Jersey, 2009.
124. A. A. Rachford, J. L. Petersen and J. J. Rack, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 8065-8075.
125. J. J. Rack, A. A. Rachford and A. M. Shelker, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 7357-7359.
126. A. M. Heyns, *Spectrochim. Acta, Part A*, 1977, **33**, 315-322.
127. S. E. Miller and D. A. House, *Inorg. Chim. Acta*, 1991, **187**, 125-132.
128. K. J. Takeuchi, M. S. Thompson, D. W. Pipes and T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 1845-1851.
129. A. Rilak, I. Bratsos, E. Zangrando, J. Kljun, I. Turel, Ž. D. Bugarčić and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 11608-11618.
130. H. Sigel, *Pure Appl. Chem.*, 2004, **76**, 1869-1886.
131. S. S. Massoud, N. A. Corfu, R. Griesser and H. Sigel, *Chem. Eur. J.*, 2004, **10**, 5129-5137.
132. A. Rilak, B. Petrović, S. Grgurić-Šipka, Ž. Tešić and Ž. D. Bugarčić, *Polyhedron*, 2011, **30**, 2339-2344.
133. N. Summa, W. Schiessl, R. Puchta, N. Eikema Hommes and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2948-2959.
134. M. Brindell, K. Dyduch, A. Adamowicz, E. Urbanowicz, M. Oszejca, A. Michalak, G. Stochel and R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, 1333-1344.
135. A. Rilak, I. Bratsos, E. Zangrando, J. Kljun, I. Turel, Ž. D. Bugarčić and E. Alessio, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 6113-6126.
136. M. T. Ashby, *Comments Inorg. Chem.*, 1990, **10**, 297-313.
137. S. G. Murray and F. R. Hartley, *Chem. Rev.*, 1981, **81**, 365-414.
138. R. M. Smith and A. E. Martel, in *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, 1989, p.20.
139. J. A. Joule, K. Mills, in *Heterocyclic Chemistry at the Glance*, 2nd edn., Eds. J. Wiley and Sons, United Kingdom, 2013, p.10.

140. G. Enos, A. Mambanda and D. Jaganyi, *J. Coord. Chem.*, 2013, **66**, 4280-4291.
141. J. Bogojeski, Ž. D. Bugarčić, R. Puchta and R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010, 5439-5445.
142. Ž. D. Bugarčić, J. Rosić, B. Petrović, N. Summa, R. Puchta and R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 1141-1150.
143. D. Reddy, K. J. Akerman, M. P. Akerman and D. Jaganyi, *Transition Met. Chem.*, 2011, **36**, 593-602.
144. a) NBO 3.1, E. D. Glendening, A. E. Reed, J. E. Carpenter, and F. Weinhold, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, 1996; b) J. P. Foster and F. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 7211-18; c) A. E. Reed and F. Weinhold, *J. Chem. Phys.*, 1983, **78**, 4066-73; d) A. E. Reed, R. B. Weinstock, and F. Weinhold, *J. Chem. Phys.*, 1985, **83**, 735-46; e) A. E. Reed and F. Weinhold, *J. Chem. Phys.*, 1985, **83**, 1736-40; f) J. E. Carpenter and F. Weinhold, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 1988, **46**, 41-62; g) A. E. Reed, L. A. Curtiss, and F. Weinhold, *Chem. Rev.*, 1988, **88**, 899-926; h) F. Weinhold and J. E. Carpenter, in *The Structure of Small Molecules and Ions*, Ed. R. Naaman and Z. Vager, Plenum, 1988, pp. 227-236.
145. A. Dorcier, C. G. Hartinger, R. Scopelliti, R. H. Fish, B. K. Keppler and P. J. Dyson, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 1066-1076.
146. Y. N. Tian, P. Yang, Q. S. Li, M. L. Guo and M. G. Zhao, *Polyhedron*, 1997, **16**, 1993-1998.
147. E. Alessio, Y. Xu, S. Cauci, G. Mestroni, F. Quadrifoglio, P. Viglino and L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 7068-7071.
148. R. B. Martin, *Acc. Chem. Res.*, 1985, **18**, 32-38.
149. T. Bugarčić, A. Habtemariam, J. Stepankova, P. Heringova, J. Kasparkova, R. J. Deeth, R. D. L. Johnstone, A. Prescimone, A. Parkin, S. Parsons, V. Brabec and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 11470-11486.
150. B. J. Goodfellow, V. Felix, S. M. D. Pacheco, J. Pedrosa De Jesus and M. G. B. Drew, *Polyhedron*, 1997, **16**, 393-401.
151. B. Lippert, *Prog. Inorg. Chem.*, 2007, **37**, 1-97.
152. G. Lancelot and C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, **74**, 4872-4875.
153. W. J. Moore, *Physical Chemistry*, Longmans, London, 4th edn, 1962, p.368.



154. Ž. D. Bugarčić, F. W. Heinemann and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2004, 279-286.
155. J. Arpalahti and B. Lippert, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 104-110.
156. J. P. Caradonna and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 1988, **27**, 1454-1466.
157. M. Mikola, K. D. Kilika and J. Arpalahti, *Chem. Eur. J.*, 2000, 3404-3413.
158. M. Perutz, *Nature*, 1970, **228**, 726-734.
159. J. A. Tainer, E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson and D. C. Richardson, *J. Mol. Biol.*, 1982, **160**, 181-217.
160. B. J. Corden, *Inorg. Chim. Acta*, 1987, **137**, 125-130.

## БИОГРАФИЈА

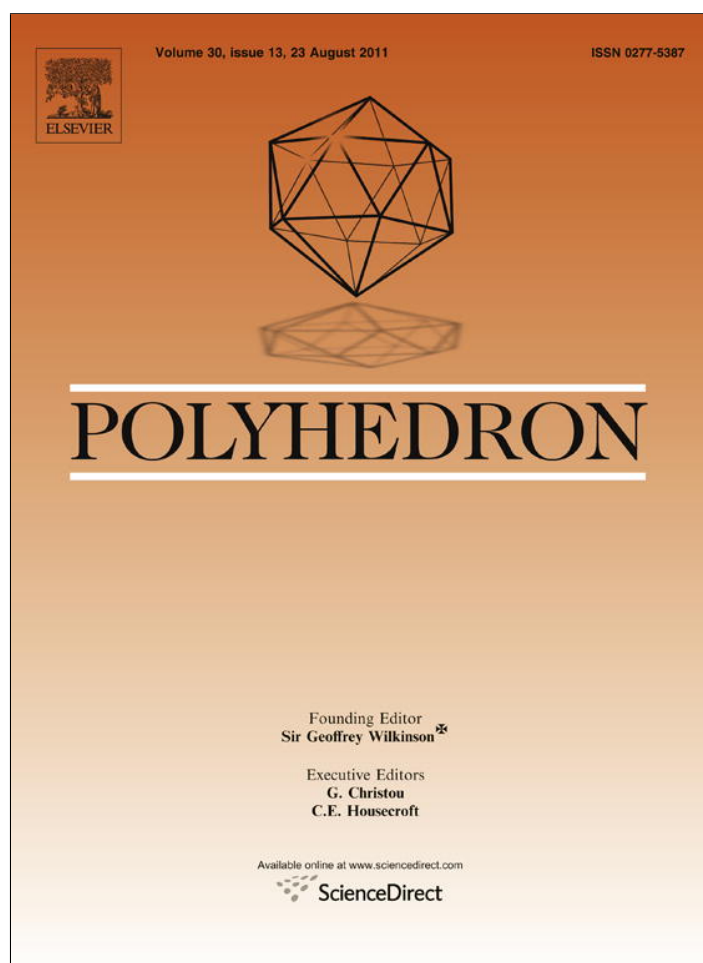


Ана Рилак Симовић је рођена 21.08.1985. године у Крагујевцу. Основну и Средњу Медицинску школу (смер Фармацеутски техничар) завршила је у Крагујевцу. Природно-математички факултет, група хемија, смер истраживање и развој, Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2004/2005. године, где је дипломирала јуна 2009. године са просечном оценом у току студија 9,03. Добитница је награде која се додељује најбољем студенту хемије за школску 2009/2010. годину на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, као и Годишње награде Српског хемијског друштва за 2009. годину за изузетан успех у току студија.

Докторске студије, смер Неорганска хемија, уписала је школске 2009/2010 године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Од 29.10.2009. године запослена је на Природно-математичком факултету у Крагујевцу као истраживач-приправник, а 18.01.2012. године изабрана је у звање истраживач-сарадник. Ангажована је на пројекту бр. 172011 који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. У току докторских студија провела је годину дана на Универзитету у Трсту, Италија, у групи проф. Енца Алесија (Enzo Alessio), као стипендиста CSIUT-Consortium for International Development of the University of Trieste.

# **ПРИЛОГ**

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Polyhedron

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/poly](http://www.elsevier.com/locate/poly)

## Kinetics and mechanism of the reactions of Ru(II)–arene complex with some biologically relevant ligands

Ana Rilak<sup>a</sup>, Biljana Petrović<sup>a</sup>, Sanja Grgurić-Šipka<sup>b</sup>, Živoslav Tešić<sup>b</sup>, Živadin D. Bugarčić<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Kragujevac, Faculty of Science, R. Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Studentski trg 12–16, 11000 Belgrade, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 April 2011

Accepted 21 June 2011

Available online 28 June 2011

#### Keywords:

Ru(II)

Arene

Guanosine-5'-monophosphate

Guanosine

L-Histidine

### ABSTRACT

The reactions of ruthenium(II)–arene complex  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  (where p-cym = p-isopropyl toluene, pydc = 2,3-pyridinedicarboxylato) with biologically nitrogen-donor nucleophiles, such as guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP), guanosine (Guo) and L-histidine (L-His) were studied by UV–Vis spectrophotometry and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. The reactions were studied at pH 2.5 and at 7.2. All reactions were followed under *pseudo*-first order conditions with large excess of the nucleophiles. The selected nucleophiles have a high affinity for Ru(II)–arene complex. The reactivity of the used ligands follow the same order at both pH values: Guo > 5'-GMP > L-His, while the reactions at pH 7.2 are always faster. The negative entropies of activation ( $\Delta S^\ddagger$ ) support an associative mode of activation. However, the rate constants obtained by  $^1\text{H}$  NMR at 295 K in  $\text{D}_2\text{O}$  follow the same order of the ligand reactivity. The hydrolysis of the  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  complex was very fast and completed by the time the first spectrum was measured. Addition of excess of NaCl to equilibrium solutions reversed the hydrolysis.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The interactions of metal complexes and biologically relevant molecules are very important not only from the fundamental, but also from the biological and medical point of view. However, transition metals and their reactions are in general important in the biology and medicine (biological electron transfer, toxicology and use of metal complexes as drugs). Moreover, non-essential metal ions are very often used in biological systems either for therapeutic application or as diagnostic aids.

Metal complexes have been used for decades as drugs in medicine [1]. For instance, platinum-based antitumor drugs such as cisplatin, the second generation carboplatin and a third generation oxaliplatin are still the most widely used agents for the treatment of different types of cancer. The success of cisplatin has aroused great interest in the study of metal complexes as possible application in medicine [2–4]. The use of cisplatin is restricted by its side-effects, which include kidney toxicity, neurotoxicity, gastrointestinal toxicity, ototoxicity, etc. A limiting factor in the use of

platinum based drugs is resistance of cells to these drugs being developed with time [4].

Ruthenium complexes have potential as anticancer drugs [5]. Moreover, ruthenium based drugs are generally less toxic than the platinum based derivatives, which makes them suitable for medical applications. Different types of ruthenium complexes have been tested with the aim of discovering behaviors similar to that of cisplatin, but it has been found that just a few exhibit this [5]. Ruthenium complexes of the most common oxidation states, Ru(II) ( $d^6$  diamagnetic) and Ru(III) ( $d^5$  paramagnetic), are octahedral in geometry and inert to ligand substitution, especially Ru(III) complexes [6]. This makes them attractive as drugs as they should ideally arrive at the target intact.

The most significant was the entry of two Ru(III) octahedral complexes into clinical trials for cancer treatment. They have low toxicity towards cancer cells, but is particularly effective against solid tumor metastases [7,8]. It has been suggested that Ru(III) complexes are activated by reduction *in vivo* to Ru(II) and they should coordinate more rapidly to biomolecules [9,10] due to the increased lability of Ru(II)–Cl bonds compared to that in Ru(III) complexes, which tend to be more inert towards ligand substitution. Two Ru(III) complexes, [(Him)*trans*-[RuCl<sub>4</sub>(S-DMSO)(im)] (im = imidazole) known as NAMI-A, and Hind *trans*-[RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>] (ind = indazole) known as KP1019 have attracted much attention since they have completed phase I in clinical investigation as anticancer drugs [11,12].

The piano-stool organoruthenium complexes of the type  $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}^{\text{II}}(\text{chel})\text{X}]^+$  (where arene is benzene (bz) or bz derivatives,

**Abbreviations:**  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$ , chlorido(p-cymene)(2,3-pyridinedicarboxylato)ruthenium(II); p-cym, p-isopropyl toluene; pydc, 2,3-pyridinedicarboxylato; 5'-GMP, guanosine-5'-monophosphate; Guo, guanosine; L-His, L-histidine; Hepes buffer, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; TSP, trimethylsilylpropionic acid.

\* Corresponding author. Tel.: +381 (0)34300262; fax: +381 (0)34335040.

E-mail address: [bugarcic@kg.ac.rs](mailto:bugarcic@kg.ac.rs) (Ž.D. Bugarčić).

chel = chelating ligand and X = halide) have been studied as potential anticancer agents [13–15]. These complexes display a *pseudo*-octahedral structure, with the arene occupying three coordination sites forming the “seat” of the stool and the other ligands occupying the three remaining coordination sites forming the “legs”. In this type of complexes, the arene provides a hydrophobic face for the complex and stabilize Ru in the +2 oxidation state so that oxidation to Ru(III) is difficult. The arene is considered as a  $\pi$ -acceptor ligand towards Ru and the chelating ligands provide additional stability. Complexes containing chelating ligands tend to be more active than those containing monodentate ligands [13]. The nature of the chelating ligand can play a crucial role in anticancer activity [13–15]. The structure activity relationships of these complexes have been discussed [13–17].

Antitumor activity of Ru complexes have been explained by the interactions with DNA [5,18], forming intrastrand crosslinks to adjacent guanosine residues [19]. The mechanism of cytotoxic action of Ru(II) arene complexes is thought to involve hydrolysis of the Ru–X bond generating reactive Ru–OH<sub>2</sub> species that can future bind to DNA and form monofunctional adducts. Therefore the hydrolysis rates are of high importance in order to relate them to anticancer activity [20].

In this paper we report the kinetics of complexation between the monofunctional Ru(II)–arene complex, [Ru<sup>II</sup>( $\eta^6$ -p-cym)(pydc)Cl], and nitrogen-donor ligands, namely guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP), guanosine (Guo) and L-histidine (L-His), Fig. 1.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and ligands

RuCl<sub>3</sub> × H<sub>2</sub>O was purchased from Precious metal Online and was used as received (Ru content about 40%). The ligands

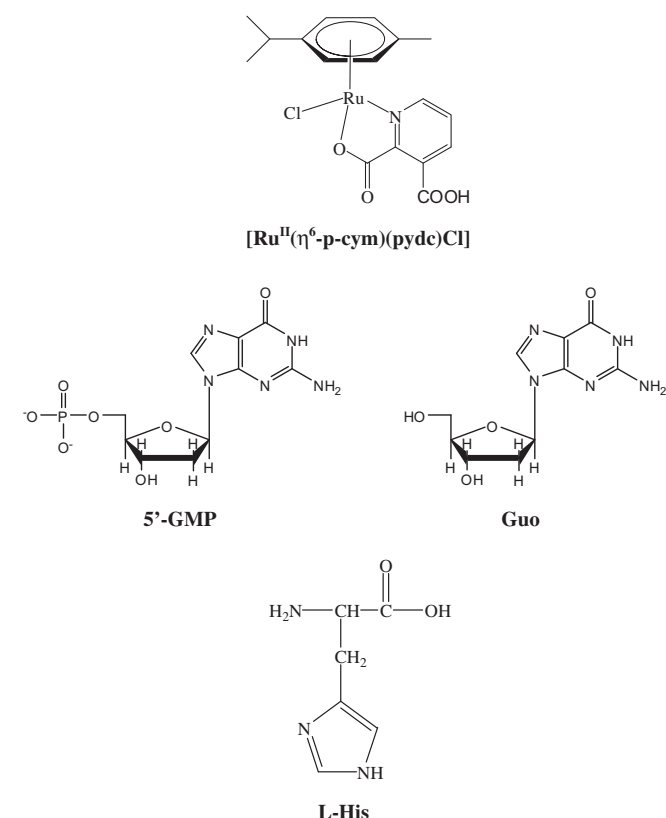


Fig. 1. The structures of investigated complexes and ligands.

guanosine-5'-monophosphate disodium salt (99%), guanosine hydrate (99%), L-histidine (98%) and 2,3-pyridinedicarboxylic acid (99%) were obtained from Acros Organics. Nucleophile stock solutions were prepared shortly before use by dissolving the chemicals. Methanol (Centrohem, p.a) was dried over Mg/I<sub>2</sub>. Deuterium-oxide (99.9% Deutero GmbH) is commercially available and used as received. Hepes buffer (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 99.5%) were obtained from Sigma–Aldrich Co. All other chemicals were of the highest purity commercially available and were used without further purification. Ultra pure water was used in all experiments involving aqueous solutions.

### 2.2. Synthesis of the complex

The complexes [( $\eta^6$ -p-cym)RuCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> and [Ru<sup>II</sup>( $\eta^6$ -p-cym)(pydc)Cl] were prepared according to literature methods [21,22].

### 2.3. Instrumentation and measurements

Chemical analyses were performed on a Carlo Erba Elemental Analyser 1106. <sup>1</sup>H NMR measurements were performed on Varian Gemini 2000, 200 MHz NMR spectrometer and on Bruker Avance III 500 spectrometer (500.26 MHz). The measurements were performed with a commercial 5 mm Bruker broadband probe. All chemical shifts are referenced to TSP (trimethylsilylpropionic acid). In D<sub>2</sub>O solutions, the pH\* (pD = pH + 0.4) was measured with an inoLab SenTix<sup>®</sup> Mic pH Microelectrode.

UV–Vis spectra and kinetic traces were recorded on a Perkin–Elmer Lambda 35 double-beam spectrophotometer in thermostated 1.00 cm quartz Suprasil cells. Temperature was controlled to  $\pm 0.1$  °C. The pH of the solution was measured using a Mettler Delta 350 digital pH meter with a combined glass electrode. This electrode was calibrated using standard buffer solutions of pH 4, 7 and 9 obtained from Sigma.

### 2.4. Kinetics measurements

The kinetics of the substitution of coordinated chloride was followed spectrophotometrically by following the change in absorbance at working wavelengths as a function of time. The working (suitable) wavelengths were determined by recording spectra of the reaction mixture over the wavelength range 220–450 nm (Representative graph is shown in Supplementary data Fig. 1S). The wavelength with the largest change of the absorbance of the solution with the time is taken as working wavelength. All kinetic experiments were performed under *pseudo*-first-order conditions, for which the concentration of the nucleophile was always in at least a 20-fold excess. The reactions were initiated by mixing 0.5 ml of Ru(II) complex solution with 2.5 ml of thermally equilibrated nucleophile solution in the UV–Vis cuvette and reactions were followed for at least 8 half-lives. The observed *pseudo*-first-order rate constants,  $k_{\text{obsd}}$ , represent an average value of two to three independent kinetic runs for each experimental condition. Reactions were studied at three temperatures (298, 310 and 318 K) in 0.1 M NaClO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl at pH 2.5. To be closer to physiological conditions the reactions were also studied in an aqueous 25 mM Hepes buffer at pH 7.2 in the presence of 10 mM NaCl. Hepes buffer was selected because it is sterically more crowded than Tris and do not coordinate. The experimental data are summarized in the Supplementary data (Tables 1S–6S). The values of constants and other thermodynamic parameters were determined using the computer programs MICROSOFT EXCEL 2007 and ORIGINPRO 8.

#### 2.4.1. <sup>1</sup>H NMR kinetic experiments

<sup>1</sup>H NMR kinetic measurements of the reaction of the Ru(II) complexes with nitrogen-bonding ligands were done on a freshly

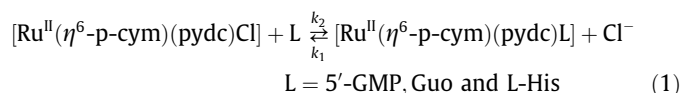
prepared sample of the reactants. All reactions were carried out in NMR tubes. D<sub>2</sub>O was used as a solvent. A 8 mM solution of the complex was prepared in 300 μL D<sub>2</sub>O approximately 10 min prior to the start of the kinetic experiment and put in an ultrasonic bath until complete dissolution (2 min). Also 8 mM solutions of the ligands were prepared in 300 μL of D<sub>2</sub>O. NMR spectra were recorded at 295 K over a period of 3 h, until completion of the reaction was reached. No buffer was used to prevent increased activation of the complexes due to coordination of phosphate, or interfering signals in the observed peak area. The pH\* changed slightly from 7.4 to 8.4 upon completion of the reaction.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. UV-Vis measurements

The kinetics of the substitution of coordinated chlorido ligand from the complex, [Ru<sup>II</sup>(η<sup>6</sup>-p-cym)(pydc)Cl], was investigated spectrophotometrically by following the change in absorbance at working wavelengths as a function of time. Guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP), guanosine (Guo) and L-histidine (His) were investigated as nucleophiles because of their different nucleophilicity, steric hindrance, binding properties and biological relevance (see Fig. 1). As mentioned above, all kinetic experiments were performed under pseudo-first-order conditions with respect to the nucleophile in order to force the reactions to go to the completion. To suppress spontaneous hydrolysis of the chlorido from the coordination sphere of the complex all reactions were studied in the presence of 10 mM NaCl. This concentration is determined before kinetic measurements according to the changes of absorbance at different chlorido concentration (Fig. 2S, Supplementary data).

The substitution reactions of the complex, [Ru<sup>II</sup>(η<sup>6</sup>-p-cym)(pydc)Cl], with 5'-GMP, Guo and L-His can be represented by Eq. (1).



Here,  $k_2$  is the second-order rate constant for the forward reaction,  $k_1$  accumulates the rate of solvolysis reaction followed by the very fast displacement of water molecule by the nucleophile. The second-order rate constants  $k_2$  were obtained directly from the slopes of plots of  $k_{\text{obsd}}$  versus entering nucleophile concentration. The rate of the reaction is described by Eqs. (2) and (3).

$$-\frac{d[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]}{dt} = k_{\text{obsd}}[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}] \quad (2)$$

$$k_{\text{obsd}} = k_1[\text{Cl}^-] + k_2[\text{L}] \quad (3)$$

All kinetic runs could be fitted by a single exponential function and no subsequent reactions were observed. The observed pseudo-first-order rate constants,  $k_{\text{obsd}}$ , were calculated as the average value from two to three independent runs.

The experimental results for the substitution reactions of [Ru<sup>II</sup>(η<sup>6</sup>-p-cym)(pydc)Cl] complex with 5'-GMP at pH 7.2 is shown in Fig. 2 (Graphs for the other substitution reactions are given in Supplementary data Figs. 3S–7S). A linear dependence on the nucleophile concentration was observed for all reactions.

The kinetic data clearly show that these nitrogen-bonding nucleophiles are very good entering ligands for the Ru(II) complexes. Guanosine is the best nucleophile and the order of reactivity is: Guo > 5'-GMP > L-His. Furthermore, the pH at which antitumor complexes bind to DNA is significantly higher than 2.5, so we studied the complex formation at pH 7.2 as well. However, the second order rate constants for the forward reactions are higher at pH 7.2 than at pH 2.5.

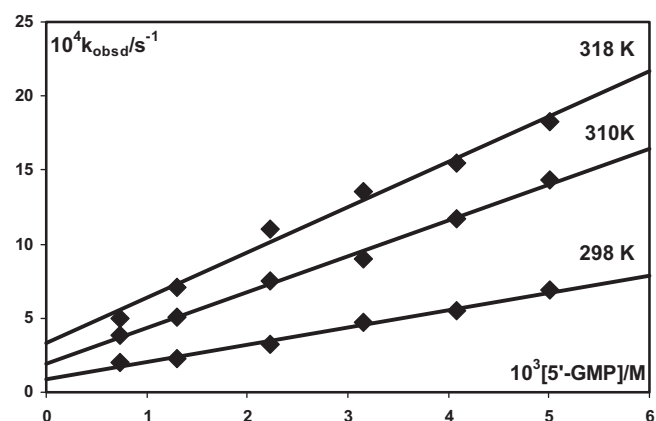


Fig. 2. Pseudo-first order rate constants,  $k_{\text{obsd}}$ , as a function of ligand concentration and temperature for the substitution reactions of [Ru<sup>II</sup>(η<sup>6</sup>-p-cym)(pydc)Cl] complex with 5'-GMP in 25 mM Hepes buffer, 10 mM NaCl, pH 7.2.

The temperature dependence of these rate constants enabled the calculation of the activation enthalpies ( $\Delta H^\ddagger$ ) and entropies ( $\Delta S^\ddagger$ ) by use of the Eyring equation. Rate constants and activation parameters derived from these experiments are summarized in Table 1.

Guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) and guanosine (Guo) can coordinate to metal ions via N1 and N7, while L-histidine can coordinate via N3 ( $\text{p}K_{\text{a}}(\text{N}3) = 6.02$ ) [23]. Under our experimental conditions (pH 2.5) only the N7 position of 5'-GMP will bind to the central metal atom ( $\text{p}K_{\text{a}} = 1.2$ ) since at this pH the N1 position is protonated ( $\text{p}K_{\text{a}} = 8.88$ ) [24]. Binding through the N7 position in a neutral or weakly acidic medium has been verified [25–28]. Guo behaviors similar because its  $\text{p}K_{\text{a}}$  values are  $\text{p}K_{\text{a}}(\text{N}7) = 2.11$  and  $\text{p}K_{\text{a}}(\text{N}1) = 9.22$  [24].

The second order rate constants,  $k_2$ , were studied as a function of temperature. All available activation parameters support the operation of an associative mechanism [29]. The significantly negative activation entropies for the forward reactions in (1) suggest that the activation process in the studied systems seems to be strongly dominated by bond making [29]. The results are in excellent agreement with data reported before [30–32].

#### 3.2. NMR spectroscopy

Under physiological conditions metal complexes usually undergo transformation before reaching the target. The transformation of the complex can include ligand substitution, reduction of the metal ion or modification of the ligands that are still bound to the metal. The general mechanism for monofunctional complexes [(η<sup>6</sup>-arene)Ru<sup>II</sup>(chel)Cl]<sup>+</sup> involves the rapid hydrolysis of the chlorido with formation of more reactive aqua species [19].

The chlorido ligand in the complex, [Ru<sup>II</sup>(η<sup>6</sup>-p-cym)(pydc)Cl], is very labile in aqueous solution. The hydrolysis of the [Ru<sup>II</sup>(η<sup>6</sup>-p-cym)(pydc)Cl] complex was very fast and completed by the time when the first spectrum was measured. Addition of excess of NaCl to equilibrium solutions reversed the hydrolysis, as shown in Fig. 3.

We also studied the complex formation of the complex [Ru<sup>II</sup>(η<sup>6</sup>-p-cym)(pydc)D<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> with N-bonding ligands by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The obtained results are also presented in Table 1.

The reactions of [Ru<sup>II</sup>(η<sup>6</sup>-p-cym)(pydc)Cl] complex (4 mM) and 5'-GMP, Guo or L-His, (4 mM) at pD = 8.4 and 295 K were studied by <sup>1</sup>H NMR for a period of 5 h. Second-order rate constants,  $k_2$ , were obtained from Eq. (4).

$$k_2 t = x/a_0(a_0 - x) \quad (4)$$



**Table 1**  
Rate constants for the substitution reactions between  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  complex with nucleophiles.

$[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]^a$	$T$ (K)	pH	$10^1 k_2^a/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$10^4 k_1^a/\text{s}^{-1}$	$\Delta H_2^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_2^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Guo	310	2.5	$1.87 \pm 0.14$	$2.38 \pm 0.17$	–	–
5'-GMP			$1.15 \pm 0.09$	$4.05 \pm 0.27$	$22 \pm 2$	$-193 \pm 6$
L-His			$0.55 \pm 0.02$	$1.64 \pm 0.05$	–	–
Guo	310	7.2	$2.69 \pm 0.25$	$1.07 \pm 0.40$	–	–
5'-GMP			$2.41 \pm 0.10$	$1.96 \pm 0.30$	$37 \pm 6$	$-142 \pm 19$
L-His			$0.65 \pm 0.05$	$3.07 \pm 0.20$	–	–
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]^b$	$T$ (K)	pD	$10^2 k_2^b/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$			
Guo	295	8.4	$4.26 \pm 0.03$			
5'-GMP			$3.34 \pm 0.02$			
L-His			$0.58 \pm 0.01$			

<sup>a</sup> Rate constants obtained by UV-Vis experiments in 0.1 M  $\text{NaClO}_4$ , 10 mM NaCl.

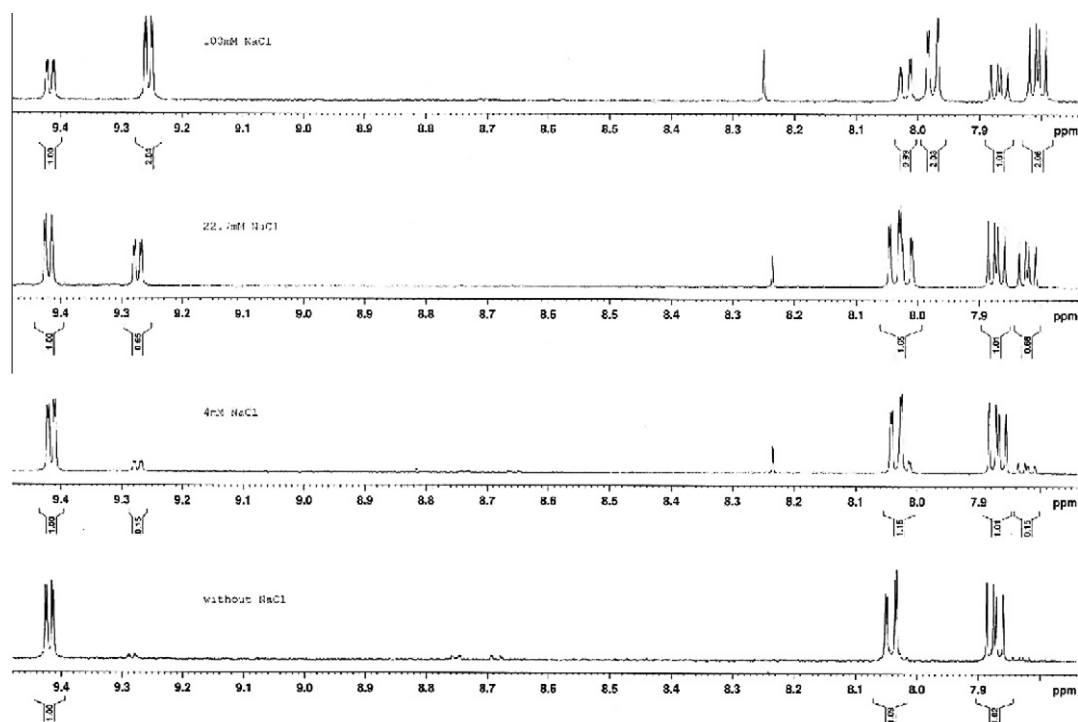
<sup>b</sup> Rate constants obtained by  $^1\text{H}$  NMR.

where  $x$  is the amount of  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})(\text{L})]$  ( $\text{L}$  is 5'-GMP, Guo or L-His) and  $a_0$  is initial concentration of aqua  $\text{Ru}(\text{II})$ -arene complex. Calculations were performed by relative integration (estimated error is 5%) of suitable proton signals of both reaction products and starting materials during the reaction. The values of the rate constants were determined from Guggenheim plot, in which  $x/a_0(a_0 - x)$  is plotted against time, shows a straight line passing through the origin as shown in Fig. 4. The values of the second-order rate constants,  $k_2$ , were calculated from the slope of this line. The obtained  $^1\text{H}$  NMR kinetic data are given in Table 1 as well. There is a difference in the values of the second order rate constant,  $k_2$ , obtained by UV-Vis and NMR because the experimental conditions were different. In the UV-Vis experiments we used constant ionic medium 0.1 M  $\text{NaClO}_4$ , 10 mM NaCl, pH was 7.2 and the temperature was 37 °C. In the NMR experiments temperature was 22 °C and experiments performed in  $\text{D}_2\text{O}$  at pD 8.4 without the ionic medium or any buffer.

Ru is a chiral center in p-cymene complex having three different donor atoms. The representative  $^1\text{H}$  NMR spectra of the reaction

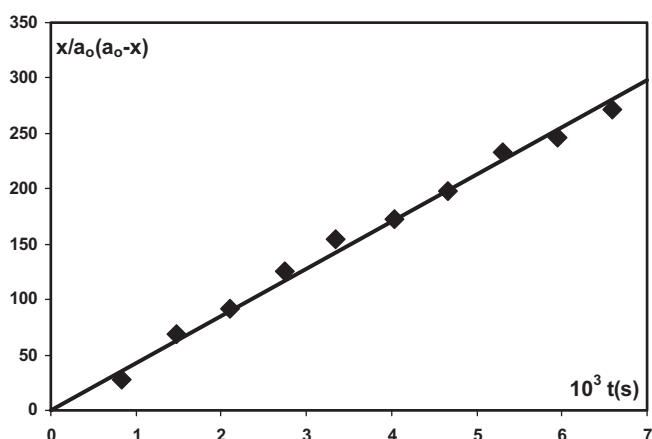
between  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  complex and Guo is shown in Fig. 5. The singlet at 2.225 ppm corresponds to methyl group of cymene ligand of started aqua (deutero)  $\text{Ru}(\text{II})$  complex. During the reaction with Guo signal at 2.225 ppm decrease, while the signal of the product,  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})(\text{Guo})]$ , appear at 1.925 ppm and increase with the time. However, the singlet gives two signals which correspond to the products of two diastereoisomers. Two doublets at 1.205 ppm and 1.195 ppm correspond to two methyl protons of isopropyl-group of cymene ligand for the started complex. The intensities of these signals decrease with time in the reaction with Guo forming the signals in the range between 1.100 ppm and 0.900 ppm. These signals also confirm the presence of mixture of diastereoisomers. NMR spectra and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spectrum are given in Supplementary data Figs. (8S and 9S). The reaction between the complex and ligand could be also seen from the signals of Guo as well. The signal at 8.220 ppm is a signal for the free Guo, and the signal at 7.950 ppm corresponds to the coordinated ligand.

The recorded spectra for the reaction between  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  complex and 5'-GMP also confirm the fact that the

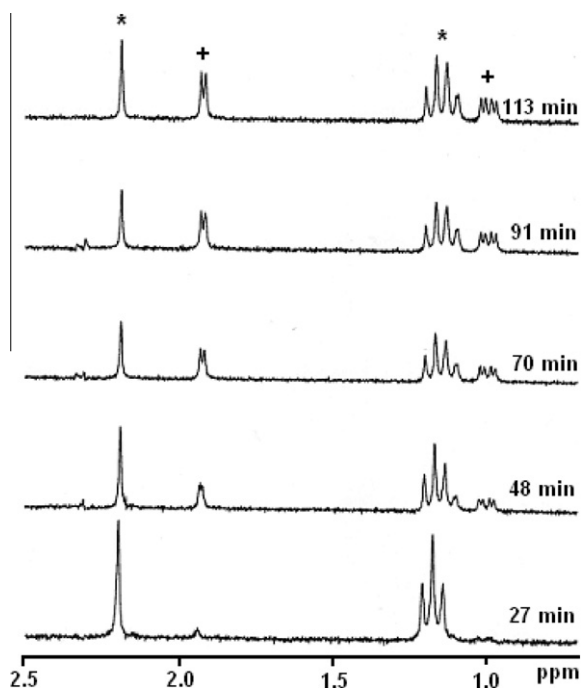


**Fig. 3.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of the studied complex in  $\text{D}_2\text{O}$ , and with solutions of NaCl.





**Fig. 4.** Guggenheim plots for the reaction of  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  complex (4 mM) and Guo (4 mM) at  $\text{pD} = 8.4$  and 295 K.



**Fig. 5.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of the substitution reaction between  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{pydc})\text{Cl}]$  complex (4 mM) and Guo (4 mM) in  $\text{D}_2\text{O}$  at 295 K,  $\text{pD} = 8.4$ .

products of the substitution exist as two diastereoisomers (Figs. 10S and 11S, [Supplementary data](#)). The free 5'-GMP has a signal at 8.220 ppm and the coordinated at 7.956 ppm. During the time the peak correspond to coordinated ligand increase with time, and for the free ligand decrease with time ([Supplementary data](#) Fig. 10S).

It is assumed that chlorido Ru(II) arene complexes are dominant species in blood plasma ( $\text{pH} 7.4$ ) where the chloride concentration is *ca.* 104 mM. In the cell nucleus where the chloride concentration is lower (*ca.* 4–20 mM) increased concentration of aqua Ru(II) species is more likely to occur. Once a Ru(II) arene complex is activated through hydrolysis and the aqua species is formed, Ru is potential center for nucleophilic attack by biomolecules. Moreover, DNA is an important potential target for many metal-based anticancer agents [3]. The binding of Ru(II) arene complexes to 5'-GMP, constituents of DNA, is special interest. Therefore it is of great importance to understand binding of nitrogen-bonding ligands to Ru complexes.

## Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia, project No. 172011.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.poly.2011.06.019](https://doi.org/10.1016/j.poly.2011.06.019).

## References

- [1] B. Rosenberg, L. van Camp, T. Krigas, *Nature* 205 (1965) 698.
- [2] (a) S.H. van Rijt, P.J. Sadler, *Drug Discov. Today* 14 (2009) 1084; (b) M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, *Dalton Trans.* (2008) 183; (c) C. Moucheron, *New J. Chem.* 33 (2009) 235; (d) X. Wang, Z. Guo, *Dalton Trans.* (2008) 1521; (e) L. Ranconi, P.J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 1633.
- [3] Y. Yung, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* 107 (2007) 1387.
- [4] M.A. Fuertes, C. Alonso, J.M. Perez, *Chem. Rev.* 103 (2003) 645.
- [5] (a) M.J. Clarke, F. Zhu, D.R. Frasca, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2511; (b) M.J. Clark, *Coord. Chem. Rev.* 236 (2003) 209; (c) G. Sava, E. Alessio, A. Bergamo, G. Mestroni, *Top. Biol. Inorg. Chem.* 1 (1999) 143; (d) M. Galanski, V.B. Arion, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 2078; (e) P.A. Dyson, G. Sava, *Dalton Trans.* (2006) 1929.
- [6] M.J. Clarke, S. Bitler, D. Rennert, M. Buchbinder, A.D. Kelman, *J. Inorg. Biochem.* 12 (1980) 79.
- [7] J.M. Rademaker-Lakhai, D. Van Der Bongaard, D. Pluim, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 3717.
- [8] S. Kapitzka, M. Pongratz, M.A. Jakupec, P. Heffeter, W. Berger, L. Lacking, B.K. Keppler, B. Marian, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131 (2005) 101.
- [9] A.D. Kelman, M.J. Clarke, S.D. Edmonds, H.J. Peresie, *J. Clin. Hematol. Oncol.* 7 (1977) 274.
- [10] M.J. Clarke, *Met. Complexes Cancer Chemother.* (1993) 129.
- [11] (a) E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, G. Sava, *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 1525; (b) E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, G. Sava, *Met. Ions Biol. Syst.* 42 (2004) 323; (c) B. Serli, E. Zangrando, T. Gianferrara, L. Yellowlees, E. Alessio, *Coord. Chem. Rev.* 245 (2003) 73; (d) A. Bergamo, G. Sava, *Dalton Trans.* (2007) 1267.
- [12] (a) B.K. Keppler, K.G. Lippomer, B. Stenzel, F. Kratz, in: B.K. Keppler (Ed.), *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, Weinheim, Germany, 1993, p. 187; (b) A. Küng, T. Pieper, R. Wissiack, E. Rosenberg, B.K. Keppler, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 292; (c) J. Malina, O. Novakova, B.K. Keppler, E. Alesio, V. Brabec, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 435; (d) G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M.R. Soranzo, G. Zubucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. DiGiiovane, G. Pezzoni, L. Sartor, S. Garbisa, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1898; (e) M. Groessl, E. Reissner, C.G. Hartinger, R. Eichinger, O. Semenova, A.R. Timerbaev, M.A. Jakupec, V.B. Arion, B.K. Keppler, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 2185.
- [13] R.E. Aird, J. Cummings, A.A. Ritchie, M. Muir, R.E. Morris, H. Chen, P.J. Sadler, D.I. Jodrell, *Br. J. Cancer* 86 (2002) 1652.
- [14] R.E. Morris, R.E. Aird, P.d.S. Murdock, H. Chen, J. Cummings, N.D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D.I. Jodrell, P.J. Sadler, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 3616.
- [15] Y.K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P.J. Sadler, *Chem. Commun.* (2005) 4764.
- [16] S.J. Dougan, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 1508.
- [17] A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernandez, S. Parsons, I.D.H. Oswald, A. Parkin, F.P.A. Fabbiani, J.E. Davidson, A. Dawson, R.E. Aird, D.I. Jodrell, P.J. Sadler, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6858.
- [18] (a) G. Sava, S. Pacor, M. Coluccia, M. Mariggio, M. Cocchietto, E. Alessio, G. Mestroni, *Drug. Invest.* 8 (1994) 150; (b) O. Novakova, J. Kasparkova, O. Vrana, P.M. van Vliet, J. Reedijk, V. Brabec, *Biochemistry* 34 (1995) 12369.
- [19] H. Chen, J.A. Parkinson, R.E. Morris, P.J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 173.
- [20] F. Wang, H. Chen, S. Parson, I.D.H. Oswald, J.E. Davidson, P.J. Sadler, *J. Chem.-A Eur. J.* 9 (2003) 5810.
- [21] S.B. Jensen, S.J. Rodger, M.D. Spicer, *J. Organomet. Chem.* 556 (1998) 151.
- [22] S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, G. Rakić, N. Todorović, N. Gligorijević, S. Radulović, V.A. Arion, B.K. Keppler, Ž.Lj. Tešić, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1051.
- [23] S.U. Rajković, M.D. Živković, C. Kallay, I. Sovago, M.I. Djuran, *Dalton Trans.* (2009) 8370.

- [24] R.B. Martin, *Acc. Chem. Res.* 18 (1985) 32.
- [25] J. Arpalahti, B. Lippert, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 104.
- [26] M. Mikola, K.D. Kilika, J. Arpalahti, *Chem. Eur. J.* (2000) 3404.
- [27] Ž.D. Bugarčić, F.W. Heinemann, R. van Eldik, *Dalton Trans.* (2004) 279.
- [28] E.P. Serjeant, B. Dempsey, *Ionization Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, Pergamon, Oxford, 1979.
- [29] M.L. Tobe, J. Burgess, *Inorganic Reaction Mechanisms*, Addison Wesley Longman Inc., Essex, 1999.
- [30] A. Wanat, T. Schnepf, A. Karocki, G. Stochel, R. van Eldik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2002) 941.
- [31] M. Brindell, D. Piotrowska, A.A. Shoukry, G. Stochel, R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 809.
- [32] D. Chatterjee, K.A. NayaK, R. van Eldik, *Dalton Trans.* 39 (2010) 1695.

Cite this: *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 11608

www.rsc.org/dalton

PAPER

## Factors that influence the antiproliferative activity of half sandwich Ru<sup>II</sup>–[9]aneS3 coordination compounds: activation kinetics and interaction with guanine derivatives†

Ana Rilak,<sup>a,b</sup> Ioannis Bratsos,<sup>\*b</sup> Ennio Zangrando,<sup>b</sup> Jakob Kljun,<sup>c</sup> Iztok Turel,<sup>c</sup> Živadin D. Bugarčić<sup>a</sup> and Enzo Alessio<sup>\*b</sup>

Received 7th June 2012, Accepted 27th July 2012

DOI: 10.1039/c2dt31225e

Half sandwich Ru(II)–[9]aneS3 complexes ([9]aneS3 = 1,4,7-trithiacyclononane) are being studied for their antiproliferative activity. We investigated here the activation kinetics of three such complexes, namely [Ru([9]aneS3)(en)Cl](PF<sub>6</sub>) (**1**), [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (**2**) and [Ru([9]aneS3)(pic)Cl] (**3**) (en = 1,2-diaminoethane, pic = picolinate), and their interaction with DNA model bases. The aim of the study was to assess how they are affected by the nature and charge of the chelating ligand. The model reactions of **1–3** with the guanine derivatives 9-methylguanine (9MeG), guanosine (Guo), and guanosine 5'-monophosphate (5'-GMP) were studied by NMR spectroscopy. All reactions lead, although with different rates and to different extents, to the formation of monofunctional adducts with the guanine derivatives N7-bonded to the Ru center. Two products, the complexes [Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)]-(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (**4**) and [Ru([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)](PF<sub>6</sub>) (**10**), were structurally characterized also by X-ray crystallography. The structure of **4** is stabilized by strong intramolecular H-bonding between an NH of en and the carbonyl O6 of 9MeG. The kinetics of aquation and anation of complexes **2** and **3**, as well as the kinetics and the mechanism of the reaction of complexes **1–3** with the biologically more relevant 5'-GMP ligand were studied by UV-Vis spectroscopy. The rate of the reaction of **1–3** with 5'-GMP depends on the nature of the chelating ligand rather than on the charge of the complex, decreasing in the order **3** ≈ **2** > **1**. The measured enthalpies and entropies of activation ( $\Delta H^\ddagger > 0$ ,  $\Delta S^\ddagger < 0$ ) support an associative mechanism for the substitution process.

<sup>a</sup>Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, P. O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Università di Trieste, Via L. Giorgieri 1, 34127 Trieste, Italy. E-mail: jbratsos@units.it, alessi@units.it

<sup>c</sup>Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Aškerčeva c. 5, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

† Electronic supplementary information (ESI) available: Tables of X-ray crystallographic data in CIF format for compounds **2**, **4** and **10**; synthetic procedure for complex **2**; <sup>1</sup>H NMR spectral changes during the reaction of **2** and **3** with 9MeG, Guo and 5'-GMP in D<sub>2</sub>O; <sup>31</sup>P NMR spectral changes during the reaction of **1–3** with 5'-GMP in D<sub>2</sub>O; <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR spectral changes during the reaction of **1** with 5'-GMP in D<sub>2</sub>O at pH 3.30; ORTEP drawing of complex **2**; the arrangement in the crystal of **2**; crystal packing of **4**; crystal packing of **10**; time evolution of UV-Vis and UV-Vis difference spectra of **2** and **3** in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> at 298 K; absorbance changes of **2** (at 446 nm) vs. [Cl<sup>-</sup>] in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> at 310 K; plots of *k*<sub>obs</sub> vs. [5'-GMP] and *T* for the substitution reactions of **2** and **3** with 5'-GMP in 25 mM Hepes buffer (30 mM NaCl, pH 7.2); table with selected chemical shifts for 9MeG, Guo and 5'-GMP and for **2–12**; table of species distribution for **2** and **3** in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> at equilibrium at 298 K under various [Cl<sup>-</sup>]; tables of *k*<sub>obs</sub> at various [5'-GMP] and *T* for the reactions of **1–3** with 5'-GMP in 25 mM Hepes buffer (30 mM NaCl, pH 7.2). CCDC 886390–886392. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c2dt31225e

### Introduction

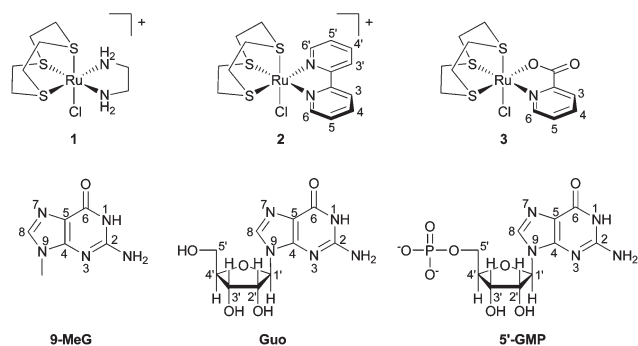
Among the several metal compounds that are currently under investigation for their anticancer activity, those of ruthenium occupy a prominent position.<sup>1</sup> Research on ruthenium-based antitumor drugs has become more intensive after two anionic Ru(III) coordination compounds developed in the late 1980s, namely NAMI-A ([Him]trans-[RuCl<sub>4</sub>(im)(dmsO-S)]), where im = imidazole and KP1019 ([Hind]trans-[RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>]), where ind = indazole, have completed phase I clinical trials with good results.<sup>2,3</sup> Currently, the investigations are mainly focused on organometallic half sandwich Ru(II)–arene compounds,<sup>4,5</sup> many of which were found to possess anticancer activity *in vitro* and, in some cases, also *in vivo*.<sup>6,7</sup> Representative examples are compounds of the type [Ru(η<sup>6</sup>-arene)(chel)X](PF<sub>6</sub>)<sub>*n*</sub> (chel = a neutral or monoanionic *N–N*, *N–O*, or *O–O* chelating ligand; X = halide; *n* = 1 or 0, depending on the charge of chel) and [Ru(η<sup>6</sup>-arene)X<sub>2</sub>(pta)] (X = Cl or X<sub>2</sub> = chelating dicarboxylate; pta = 1,3,5-triaza-7-phosphatricyclo[3.3.1.1]decane) developed, respectively, by Sadler and Dougan<sup>8</sup> and by Dyson and co-workers.<sup>9</sup>

In particular, those with the general formula [Ru(η<sup>6</sup>-arene)(en)Cl](PF<sub>6</sub>) (en = 1,2-diaminoethane) have been studied in great

detail as they show promising anticancer activity, both *in vitro* against human cancer cell lines, including the cisplatin-resistant variant A2780cis, and *in vivo* with significant growth delay against A2780 and A2780cis xenografts.<sup>10–12</sup> These compounds are considered as *prodrugs* with a mechanism of action similar to Pt-based drugs (*functional compounds*):<sup>13</sup> their activation is believed to involve rapid dissociation of the Cl ligand, thus generating an active mono-functional Ru–OH<sub>2</sub> metabolite that targets DNA,<sup>14</sup> binding preferentially to guanine residues *via* N7 coordination.<sup>15</sup> Both [Ru( $\eta^6$ -arene)(en)(nucleobase)] and [Ru( $\eta^6$ -arene)(en)(nucleoside)] adducts were isolated and characterized by X-ray crystallography. According to solution and solid state evidence, the main Ru–N7(guanine) coordination bond is assisted by stereospecific hydrogen bonding between the carbonyl O6 of guanine and one NH of en, and by  $\pi$ – $\pi$  stacking between the aromatic ligand and the nucleobase.<sup>16</sup>

In this context, we have developed a series of new half sandwich Ru(II) coordination compounds of the general formula [Ru(fcl)(chel)X](Y)<sub>*n*</sub>, in which the arene has been replaced by a neutral face-capping macrocyclic ligand (fcl) such as 1,4,7-trithiacyclononane ([9]aneS3) or 1,4,7-triazacyclononane ([9]aneN3), chel is a neutral or anionic chelating ligand (*N–N*, *e.g.* en, 1,2-diaminocyclohexane (dach), bpy or substituted bpy, substituted triazoles; *O–O*, *e.g.* oxalate, malonate, acac; *N–O*, *e.g.* picolinate (pic)), X is either Cl or dmsO-S, and Y = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, PF<sub>6</sub>, Cl (*n* depends on the charge of chel and X).<sup>17–21</sup> We found that most of the new compounds have no significant antiproliferative activity against the breast carcinoma MDA-MB-231 cell line; only [Ru([9]aneS3)(en)Cl](PF<sub>6</sub>) and [Ru([9]aneS3)(dach)Cl](PF<sub>6</sub>) showed moderate *in vitro* cytotoxicity, with an IC<sub>50</sub> *ca.* 80 and 124  $\mu$ M, respectively,<sup>20</sup> *i.e.* one order of magnitude higher than that of the most potent organometallic compound [Ru( $\eta^6$ -bip)(en)Cl](PF<sub>6</sub>) (bip = biphenyl; IC<sub>50</sub> = 10  $\mu$ M).<sup>18</sup> It is worth noting that both Ru–[9]aneS3 complexes hydrolyze the chloride ligand at a reasonable rate (*i.e.* within minutes) and are capable of acting as hydrogen bond donors through the chelating ligand. These two features seem to be a prerequisite for antiproliferative activity. Complexes such as [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl](PF<sub>6</sub>), that release the Cl ligand at a rate comparable to that of [Ru([9]aneS3)(en)Cl](PF<sub>6</sub>) but lack the possibility to behave as H-bond donors, display very low – if any – antiproliferative activity. On the other hand, complexes such as [Ru([9]aneN<sub>3</sub>)(chel)(dmsO-S)](PF<sub>6</sub>)<sup>20</sup> and *fac*-[Ru(dmsO-S)<sub>3</sub>(chel)Cl](PF<sub>6</sub>)<sup>22</sup> (where chel = en or dach), that are substitutionally inert, are also inactive.

With the aim of gaining insight into the factors that influence the activity of our *coordination* half sandwich compounds, including hydrolysis rates, binding of Ru to guanine, preferred binding sites and additional interactions, *e.g.* H-bonding between the chelating ligand and the nucleobases, we have now studied the reactions of three Ru(II)–[9]aneS3 complexes, [Ru([9]aneS3)(en)Cl](PF<sub>6</sub>) (**1**), [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (**2**) and [Ru([9]aneS3)(pic)Cl] (**3**), with the guanine derivatives 9-methylguanine (9MeG), guanosine (Guo) and guanosine 5'-monophosphate (5'-GMP) (Fig. 1). The characterization of the final products and of the intermediates was performed in solution using NMR spectroscopy, while the molecular structures of two products, *i.e.* [Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (**4**) and [Ru([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)](PF<sub>6</sub>) (**10**), were determined also in the solid state



**Fig. 1** Schematic structures of the half sandwich Ru(II)–[9]aneS3 coordination compounds **1–3** and of the guanine derivatives used in the present study with numbering schemes.

by X-ray crystallography. In addition, the kinetics of aquation and anation of complexes **2** and **3**, as well as the thermodynamics and kinetics of selected reactions were studied using UV-Vis spectrophotometry.

## Experimental

### Materials

9-Methylguanine (9MeG), guanosine hydrate (Guo) and guanosine 5'-monophosphate disodium salt hydrate (5'-GMP-Na<sub>2</sub>) were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. The complexes [Ru([9]aneS3)(en)Cl](PF<sub>6</sub>) (**1**) and [Ru([9]aneS3)(pic)Cl] (**3**) were synthesized according to published procedures.<sup>20</sup> The preparation of [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (**2**, ESI<sup>+</sup>) is similar to that previously described for the corresponding CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> compound.<sup>17</sup>

### Instrumental methods

Mono- (<sup>1</sup>H (400 or 500 MHz), <sup>13</sup>C (100.5 MHz), <sup>31</sup>P (202 MHz)) and bi-dimensional (<sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HMBIC) NMR spectra were recorded on a JEOL Eclipse 400FT or on a Varian 500 spectrometer. <sup>1</sup>H chemical shifts in D<sub>2</sub>O were referenced to the internal standard 2,2-dimethyl-2,2-silapentane-5-sulfonate (DSS) at  $\delta$  = 0.00, while those in CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> were referenced to the peak of the residual non-deuterated solvent ( $\delta$  = 4.33). All NMR spectra were run at 298 K. The UV-Vis spectra were obtained on a Jasco V-500 UV-Vis spectrophotometer equipped with a Peltier temperature controller or on a Perkin-Elmer Lambda 35 double beam spectrophotometer, using 1.0 cm path-length quartz cuvettes (3.0 mL).

### X-ray crystallography

Crystals of **2** suitable for X-ray analysis were obtained from a methanol solution of **2** saturated with diethyl ether upon standing at room temperature. Yellow crystals of [Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (**4**) and of [Ru([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)](PF<sub>6</sub>) (**10**) suitable for X-ray analysis were obtained from the aqueous solutions of the reactions of **1** and of **3** with 9MeG, respectively, upon addition of a large excess of NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> after

**Table 1** Crystallographic data for compounds **2**, **4**·H<sub>2</sub>O and **10**·1.5(H<sub>2</sub>O)

	<b>2</b>	<b>4</b> ·H <sub>2</sub> O	<b>10</b> ·1.5(H <sub>2</sub> O)
Formula	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>2</sub> PRuS <sub>3</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> F <sub>12</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> P <sub>2</sub> RuS <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> F <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4.50</sub> PRuS <sub>3</sub>
Formula mass	618.01	814.63	740.67
Crystal system	Monoclinic	Triclinic	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>
<i>a</i> (Å)	16.6200(14)	8.5941(2)	10.3000(10)
<i>b</i> (Å)	9.6130(9)	11.3013(2)	14.2830(11)
<i>c</i> (Å)	14.6900(11)	14.8054(3)	18.1920(14)
$\alpha$ (°)	90	99.263(1)	90
$\beta$ (°)	111.888(9)	91.080(1)	91.741(11)
$\gamma$ (°)	90	92.016(1)	90
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	2177.8(3)	1417.90(5)	2675.1(4)
<i>Z</i>	4	2	4
<i>D</i> <sub>calcd</sub> (g cm <sup>-3</sup> )	1.885	1.908	1.839
$\mu$ (Mo-K $\alpha$ ) (mm <sup>-1</sup> )	1.262	0.995	8.272 <sup>a</sup>
<i>F</i> (000)	1232	816	1496
$\theta$ range (°)	2.59–26.42	3.05–27.45	3.94–64.35
No. of reflns collectd	33 504	11 707	24 838
No. of indep reflns	4301	6449	4325
<i>R</i> <sub>int</sub>	0.0341	0.0198	0.0760
No. of reflns <i>I</i> > 2 $\sigma$ ( <i>I</i> )	3347	6449	2995
No. of refined params	297	386	369
Goodness-of-fit ( <i>F</i> <sup>2</sup> )	0.992	1.131	0.961
<i>R</i> <sub>1</sub> , w <i>R</i> <sub>2</sub> ( <i>I</i> > 2 $\sigma$ ( <i>I</i> )) <sup>b</sup>	0.0361, 0.0986	0.0271, 0.0585	0.0571, 0.1421
<i>R</i> <sub>1</sub> , w <i>R</i> <sub>2</sub> (all data)	0.0451, 0.1016	0.0354, 0.0612	0.0759, 0.1503
Residuals (e Å <sup>-3</sup> )	0.616, -0.426	0.409, -0.679	1.056, -1.530

<sup>a</sup>  $\mu$ (Cu-K $\alpha$ ). <sup>b</sup>  $R_1 = \sum||F_o| - |F_c||/\sum|F_o|$ ,  $wR_2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2/\sum w(F_o^2)]^{1/2}$ .

completion of the reaction (controlled by NMR spectroscopy) and standing for several days at room temperature. Data collections of **2**, **4** and **10** were carried out on a Nonius DIP-1030H system (Mo-K $\alpha$  radiation,  $\lambda = 0.71073$  Å,  $T = 293(2)$  K), on a Nonius Kappa CCD diffractometer (Mo-K $\alpha$  radiation,  $\lambda = 0.71073$  Å,  $T = 150(2)$  K) and on a Cu rotating anode equipped with a Bruker CCD2000 detector ( $\lambda = 1.54178$  Å,  $T = 293(2)$  K), respectively. Cell refinement, indexing and scaling of the data sets were performed using the programs Denzo and Scalepack.<sup>23</sup> All structures were solved by direct methods implemented in SIR92<sup>24</sup> (for **4**) or SIR97<sup>25</sup> (for **2** and **10**) and subsequent Fourier analyses<sup>26</sup> and refined by the full-matrix least-squares method based on *F*<sup>2</sup> with all observed reflections.<sup>26</sup> The hydrogen atoms were either placed at calculated positions and treated using appropriate riding models or determined from the difference electron density map (water molecules at full occupancy in **4** and **10**, and N(1)–H of 9MeG in **4**). The PF<sub>6</sub> anion in **2** was found to be disordered over two positions with the occupancy of F atoms refined at 0.804(7)/0.196(7). The asymmetric unit of complex **4** contains three crystallographically independent PF<sub>6</sub> anions, two of which are at half occupancy with their P atoms located on centers of inversion. All the calculations were performed using the WinGX System, Ver 1.80.05.<sup>27</sup>

Crystal data and details of data collections and refinements for the structures reported are summarized in Table 1.

### Kinetic analysis

The kinetics of aquation of complexes **2** and **3** and those of anation of the corresponding aqua species [Ru([9]aneS3)(bpy)-(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (**2a**) and [Ru([9]aneS3)(pic)(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup> (**3a**) were studied by UV-Vis spectrophotometry by following the change in

absorbance at specific wavelengths as a function of time. The working wavelength for each reaction corresponded to that of a maximum change in absorption (derived from the difference spectra). The samples (0.1 mM) for the aquation studies – performed at 298 K – were prepared in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> and the absorbance at the selected wavelength was recorded every 30 s. The absorption/time data for each complex were computer fitted to the first-order rate equation (eqn (1)), which gave the *k*<sub>H<sub>2</sub>O</sub> value (*k*) for each aquation process:

$$A = C_0 + C_1 e^{-kt} \quad (1)$$

*C*<sub>0</sub> and *C*<sub>1</sub> are computer-fitted constants, and *A* is the absorbance at time *t*.

For the anation studies a 10 mL stock solution of each compound (0.1 mM) in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> was prepared. An aliquot (2.5 mL) of this solution was transferred into a cuvette and this sample was used for the aquation studies. The rest of the stock solution was left to equilibrate. When the sample reached equilibrium, the stock solution was dispensed in three additional cuvettes, an appropriate amount of solid NaCl was added to each cuvette and the absorbance at selected wavelengths was measured every 30 s. Four NaCl concentrations were investigated: 50, 100, 200 and 300 mM. The second-order rate constants *k*<sub>Cl</sub> of the anation reactions were calculated from the slope of the *pseudo*-first-order rate constants (*k'*<sub>Cl</sub>) versus chloride concentration [Cl<sup>-</sup>].

The equilibrium constants *K*<sub>aq</sub> for the aquation reactions of **2** and **3** were calculated from the equation  $K_{aq} = k_{H_2O}/k_{Cl}$ .

The kinetics of the substitution reactions of complexes **1–3** with 5'-GMP were studied also spectrophotometrically. All kinetic measurements were performed under *pseudo*-first-order conditions (*i.e.* the concentration of the nucleophile was at least



20-fold that of the complex). The reactions were initiated by mixing a solution of each complex (0.3 mL, 1.00 mM) with 2.7 mL of a thermally equilibrated nucleophile solution (5.56 mM) in the UV-Vis cuvette and the reactions were followed for at least 8 half-lives. The observed *pseudo*-first-order rate constants,  $k_{\text{obs}}$ , represent an average value of two to three independent kinetic runs for each experimental condition. Reactions were studied at three different temperatures (298, 310 and 318 K) in 25 mM Hepes buffer containing 30 mM NaCl at pH 7.2. The second-order rate constants  $k_2$  for the substitution reactions with 5'-GMP were obtained directly from the slopes of  $k_{\text{obs}}$  plots *versus* the concentration of the nucleophile. All kinetic data were computer-fitted to the appropriate equation using the programs Microsoft Excel 2007 and Origin 8.

## Results and discussion

### Chemical behavior of Ru-[9]aneS3 complexes 1–3 in aqueous solutions

As previously reported by us, [Ru([9]aneS3)(en)Cl](PF<sub>6</sub>) (**1**) and [Ru([9]aneS3)(pic)Cl] (**3**) in aqueous solutions undergo relatively fast hydrolysis of the Cl<sup>−</sup> ligand at ambient temperature (<2 min for **1** and *ca.* 10 min for **3**) to give the corresponding aqua species [Ru([9]aneS3)(en)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (**1a**) and [Ru([9]aneS3)(pic)(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup> (**3a**), which at equilibrium are predominant (*ca.* 90%).<sup>20</sup> The behavior of [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl]<sup>+</sup> (**2**) is similar, but the release of Cl is slower than from **1** and **3**, and occurs to a smaller extent. At NMR concentrations and room temperature, equilibrium between **2** and [Ru([9]aneS3)(bpy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (**2a**) (*ca.* 30 : 70%) is reached within *ca.* 30 min.

In the present work, the reactions of **1–3** with the guanine derivatives (9MeG, Guo and 5'-GMP) were performed by addition of the appropriate ligand to an equilibrated solution of each compound (*i.e.* 2 min, 10 min and 30 min after dissolution of **1**, **2** and **3**, respectively).

### NMR investigation

The reactivity of compounds **1–3** towards the three guanine derivatives was primarily investigated by <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR studies in D<sub>2</sub>O at 298 K. Selected chemical shifts for the products are shown in Table S1.†

**[Ru([9]aneS3)(en)Cl](PF<sub>6</sub>) (1).** The <sup>1</sup>H NMR spectrum of **1** showed no rapid changes after the addition of 1 equiv. of 9MeG (4 mM, pH 7.60) (Fig. S1†). A new set of H8 and CH<sub>3</sub> resonances ( $\delta = 8.22$  and 3.67, respectively), shifted to higher frequencies compared to those of free 9MeG ( $\delta = 7.74$  and 3.65, respectively), grew slowly with time. The remarkable downfield shift of the H8 resonance, typical for N7-binding of purine moieties to metal ions,<sup>28,29</sup> suggests that the Ru center binds to the N7 of 9MeG, and thus the new resonances were assigned to the product [Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)]<sup>2+</sup> (**4**). Equilibrium was reached after *ca.* 30 h, with a ratio between **4** and free 9MeG of *ca.* 5 : 1, and no spectral changes were observed afterwards.

Similarly, the reaction of Guo with **1** (1 : 1, 4 mM, pH 7.63) in D<sub>2</sub>O led to the exclusive formation of [Ru([9]aneS3)(en)(Guo-N7)]<sup>2+</sup> (**5**) as evidenced by the growth of a single new set

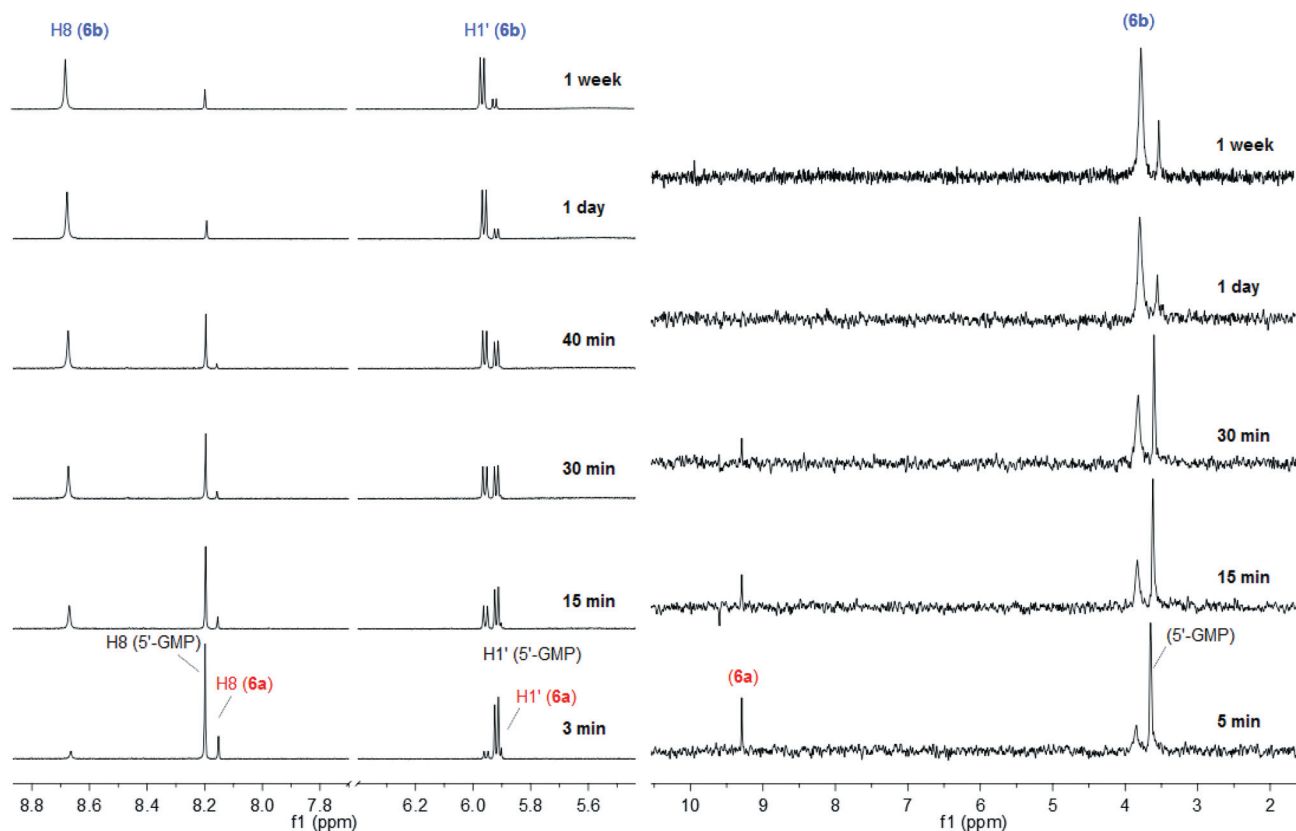
of resonances in the NMR spectrum (Fig. S2, Table S1†). At equilibrium, after *ca.* 3 days, the ratio between **5** and free Guo was *ca.* 9 : 1.

The reaction of 5'-GMP with **1** (1 : 1, 10 mM, pH 7.60) in D<sub>2</sub>O was monitored by <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy for a period of *ca.* 1 week (Fig. 2). In this case addition of 5'-GMP to an equilibrated solution of **1** induced the appearance of two new H8 signals. One signal, shifted slightly upfield compared to free 5'-GMP ( $\delta = 8.15$  vs. 8.20), appeared immediately after mixing but vanished after *ca.* 1 h. The upfield shift of the H8 resonance suggests coordination of the Ru center to the O of the phosphate group.<sup>16,30</sup> The second H8 peak, remarkably shifted downfield ( $\delta = 8.66$ ), increased gradually with time. Analogous spectral changes were observed also in the H1' region ( $\delta = 5.92$  for free 5'-GMP), where two new doublets appeared immediately after mixing: the one at  $\delta = 5.91$  was initially more intense but disappeared after *ca.* 1 h, whereas the other doublet ( $\delta = 5.95$ ) gradually increased with time. At equilibrium, which was reached in less than 24 h, *ca.* 85% of 5'-GMP was bound to Ru. The time evolution of the <sup>31</sup>P NMR spectrum (Fig. 2) was consistent with the <sup>1</sup>H NMR results. One new intense peak, very downfield shifted compared to free 5'-GMP ( $\delta = 9.29$  vs. 3.63), appeared immediately after mixing and then decreased with time, eventually disappearing after *ca.* 1 h. A second peak, only slightly downfield shifted ( $\delta = 3.80$ ), gradually increased with time and was largely predominant at equilibrium. This NMR experimental evidence suggests that the reaction of **1** with 5'-GMP proceeds through the formation of an intermediate, most likely the species with O-bonded 5'-GMP [Ru([9]aneS3)(en)(5'-GMP-O(PO<sub>3</sub>))] (**6a**), eventually yielding as a final product the corresponding Ru complex with N7-bonded 5'-GMP [Ru([9]aneS3)(en)(5'-GMP-N7)] (**6b**).

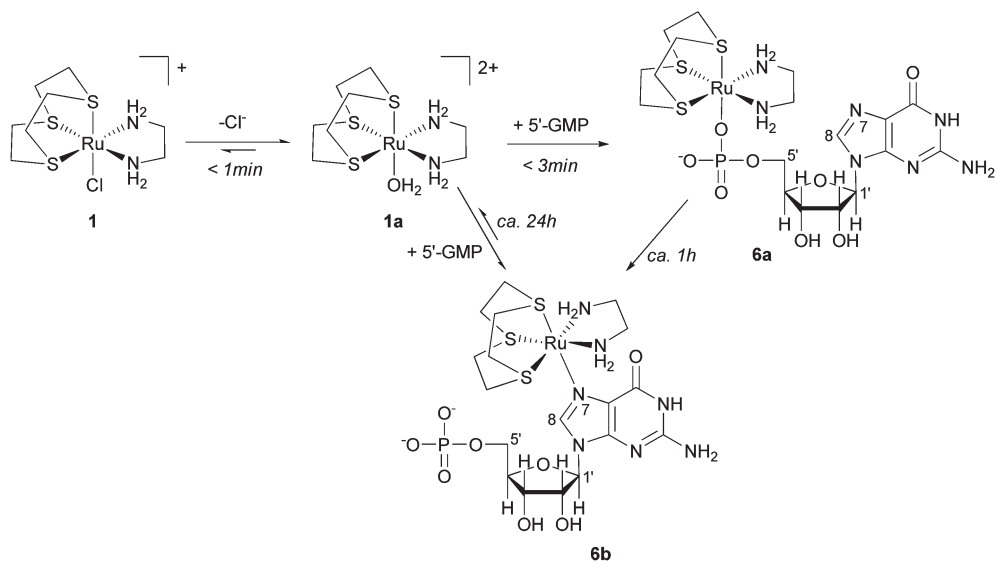
To confirm the identities of the intermediate and the product, the same reaction was performed at low pH (3.30) where the phosphate group and N1 are protonated ( $pK_a = 6.3$  and 9.5, respectively) while N7 is not ( $pK_a = 2.4$ ) and is thus available for binding.<sup>31</sup> Indeed, under these conditions the <sup>1</sup>H NMR spectrum (Fig. S3†) showed the slow formation of only one species, characterized by H8 and H1' resonances ( $\delta = 8.56$  and 5.98, respectively) downfield shifted with respect to free 5'-GMP at that pH and assignable to [Ru([9]aneS3)(en)(5'-GMP-N7)] (**6b**). Correspondingly, in the <sup>31</sup>P NMR spectrum (Fig. S4†), only one new peak ( $\delta = 0.20$ , vs. 0.16 for free 5'-GMP) slowly grew during the reaction time. These new peaks were assigned to [Ru([9]aneS3)(en)(5'-GMP-N7)] (**6b**).

These results allowed us to draw the reaction pathways shown in Scheme 1. 5'-GMP binds to **1a** either through the phosphate group (within minutes) or through the favoured N7 binding site (within hours). During the time course of the reaction, the complete migration of the Ru fragment from the phosphate group to N7 occurs. Similar observations have been reported for the reaction of the organometallic counterpart [Ru( $\eta^6$ -arene)(en)Cl](PF<sub>6</sub>) complexes with 5'-GMP.<sup>15</sup>

**[Ru([9]aneS3)(bpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (2).** Addition of 9MeG to an equilibrated solution of [Ru([9]aneS3)(bpy)Cl]<sup>+</sup> (**2**) (1 : 1, 4 mM, pH 7.88) in D<sub>2</sub>O induced slow changes in the <sup>1</sup>H NMR spectrum (Fig. S5†), where a new set of bpy resonances and of coordinated 9MeG, attributed to the product [Ru([9]aneS3)(bpy)-



**Fig. 2**  $^1\text{H}$  NMR (left, downfield region) and  $^{31}\text{P}$  NMR (right) spectral changes during the reaction of  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}]^+$  (**1**) with 5'-GMP (1 : 1, 10 mM, pH 7.60, 298 K) in  $\text{D}_2\text{O}$  at various reaction times; **6a** =  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})(5'\text{-GMP-}O(\text{PO}_3))]$ , **6b** =  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})(5'\text{-GMP-}N7)]$ .



**Scheme 1** Reaction pathways of  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\text{Cl}]^+$  (**1**) with 5'-GMP in aqueous solutions.

$(9\text{MeG-}N7)]^{2+}$  (**7**), grew with time. Equilibrium was reached after *ca.* 17 h and the distribution of the species, as determined by integration, was 55% of **7**, 38% of **2a** and 7% of **2**.

Also the reaction of **2** with Guo (1 : 1, 4 mM, pH 7.74) – according to  $^1\text{H}$  NMR evidence – led to the formation of a

single product, *i.e.*  $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{bpy})(\text{Guo-}N7)]^{2+}$  (**8**) (Fig. S6†). After mixing, a new set of resonances assignable to **8** gradually replaced those of free Guo and **2a**. As expected, the new H8 peak was shifted to higher frequency ( $\delta = 8.25$ ) and that of H1' to lower frequency ( $\delta = 5.77$ ) compared to those of free

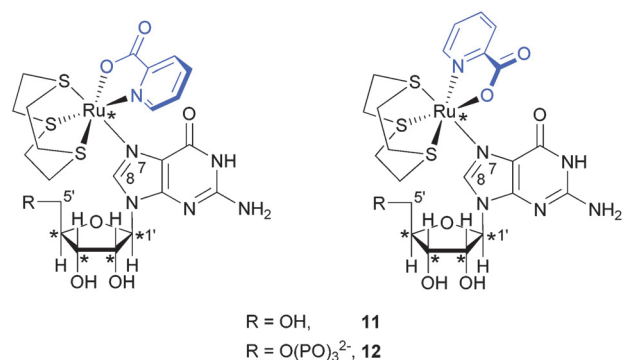
Guo ( $\delta = 7.99$  and  $5.90$ , respectively). It is worth noting that each bpy peak is split into two equally intense resonances (partially overlapped except for H<sub>6,6'</sub>): the stereogenic centers on coordinated Guo cause the loss of the symmetry plane that makes the pyridyl rings of bpy equivalent in **2**. After *ca.* 1 day the system reached equilibrium with *ca.* 40% of Guo bound to Ru (*i.e.* **8**), while in the solution remained 51% of **2a** and 9% of **2**.

Contrary to what was observed for **1**, the reaction of **2** with 5'-GMP (1 : 1, 10 mM, pH 7.65) yields only one product, that was identified by <sup>1</sup>H (Fig. S7†) and <sup>31</sup>P NMR (Fig. S8†) spectroscopy as the N7-bonded neutral species [Ru([9]aneS3)(bpy)-(5'-GMP-N7)] (**9**). No intermediates with O-bonded 5'-GMP could be detected in this case. The reaction is relatively fast, as indicated by the rapid appearance of the signals assigned to **9** immediately after mixing. However, as compound **2** does not dissolve completely at 10 mM concentration (instrumental to recording the <sup>31</sup>P NMR spectrum), the overall reaction rate was affected by the continuing dissolution process. After *ca.* 1 day the system reached equilibrium, with 30% of 5'-GMP bound to Ru (*i.e.* **9**), and remained unchanged afterwards. The unusual upfield shifts of the H8 and H1' protons in **9** ( $\delta = 8.07$  and  $5.69$ , respectively) are caused by the shielding of the bpy aromatic rings and are consistent with similar observations on organoruthenium complexes bearing bpy and substituted bpy ligands.<sup>32</sup> Also in this case, as for the Guo derivative described before, the two pyridyl rings of bpy are inequivalent, even though only the H<sub>5,5'</sub> triplets are well resolved (Fig. S7†). The <sup>31</sup>P NMR spectroscopy is consistent with the <sup>1</sup>H NMR findings: only one new peak, shifted to higher frequency ( $\delta = 3.81$ ) compared to that of free 5'-GMP ( $\delta = 3.58$ ), was detected.

**[Ru([9]aneS3)(pic)Cl] (3)**. The reaction of 9MeG with [Ru([9]aneS3)(pic)Cl] (**3**) (1 : 1, 4 mM, pH 7.73) was monitored by <sup>1</sup>H NMR for a period of 3 days (Fig. S9†). A new set of peaks assigned to the [Ru([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)]<sup>+</sup> (**10**) species, in which the H8 resonance is shifted downfield ( $\delta = 8.01$ ) – and the CH<sub>3</sub> singlet is shifted slightly upfield ( $\delta = 3.63$ ) – compared to free 9MeG, grew slowly with time. Equilibrium was reached within *ca.* 5 h, with *ca.* 78% of 9MeG bound to Ru.

The reaction of Guo with **3** (1 : 1, 4 mM, pH 7.70) induced the slow growth of a new set of resonances in the <sup>1</sup>H NMR spectrum (Fig. S10†) attributed to [Ru([9]aneS3)(pic)(Guo-N7)]<sup>+</sup> (**11**). Some of the resonances of coordinated Guo are clearly split into two signals of equal intensities: for example there are two singlets at  $\delta = 8.30$  and  $8.28$  for H8, downfield shifted compared to the free ligand. For most of the other resonances the splitting is too small and they are not resolved. As in **11** the Ru atom is also a stereogenic center (**3** is a racemic mixture containing equal amounts of the two enantiomers), these peaks can be assigned to the two equally abundant diastereomers (Fig. 3). After *ca.* 24 h the system reached equilibrium with a 2 : 1 ratio between **11** and **3a**.

Also the reaction of **3** with 5'-GMP (1 : 1, 10 mM, pH 7.95) led to the formation of two stereoisomers of formula [Ru([9]aneS3)(pic)(5'-GMP-N7)]<sup>-</sup> (**12**, Fig. 3) as evidenced by NMR spectroscopy (Fig. S11†). The two equally intense H8 singlets are well resolved at  $\delta = 8.21$  and  $8.18$ , but the splitting for the other resonances of 5'-GMP or pic is smaller and the corresponding signals are unresolved or partially overlapped at best. The



**Fig. 3** Schematic representation of the two diastereomers of [Ru([9]aneS3)(pic)(Guo-N7)]<sup>+</sup> (**11**) and of [Ru([9]aneS3)(pic)(5'-GMP-N7)]<sup>-</sup> (**12**). The asterisks indicate stereogenic centers.

reaction is remarkably faster compared to that of **3** with 9MeG and Guo: *ca.* 2 min after mixing, already 30% of 5'-GMP is bound to Ru. The system reached equilibrium after *ca.* 1 h with 65% of **12**, and no changes were observed afterwards. The <sup>31</sup>P NMR signals of the two diastereomers of **12**, two partially overlapped singlets, are shifted slightly downfield ( $\delta = 3.80$  and  $3.79$ ) compared to free 5'-GMP ( $\delta = 3.71$ ) (Fig. S12†). No other resonance, indicative of O-binding, was observed in the <sup>31</sup>P spectrum, even immediately after mixing. The full assignment of each stereoisomer was not attempted.

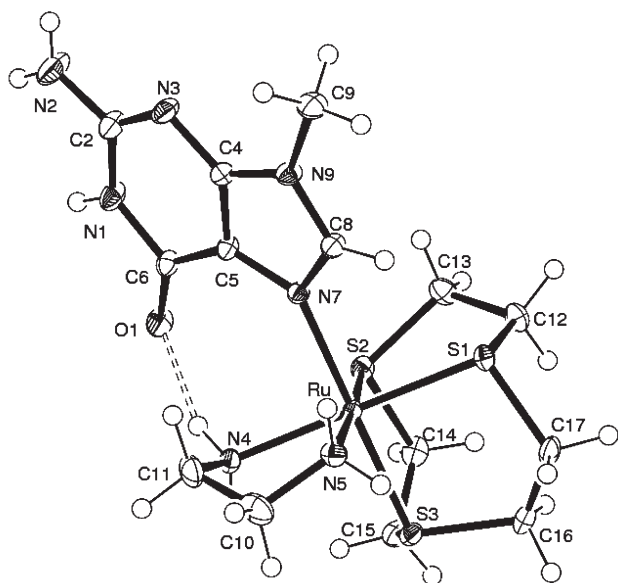
The experimental evidence shows that all three Ru-[9]aneS3 complexes react with the guanine derivatives yielding monofunctional adducts. The rate of the reaction for each complex increases in the order 5'-GMP  $\gg$  Guo > 9MeG. Most likely 5'-GMP binds to **1–3** faster than the other ligands because of its negative charge. In addition, for complexes **1–3** the rate of the reaction with each guanine derivative increases in the order **3** (pic) > **2** (bpy) > **1** (en). Thus, complex **1**, despite being readily accessible for the reaction (*i.e.* hydrolyzes rapidly), is the slowest, indicating that the rate limiting step for the reaction is not the release of Cl but rather the formation of the Ru–N7 bond.

### X-ray investigation

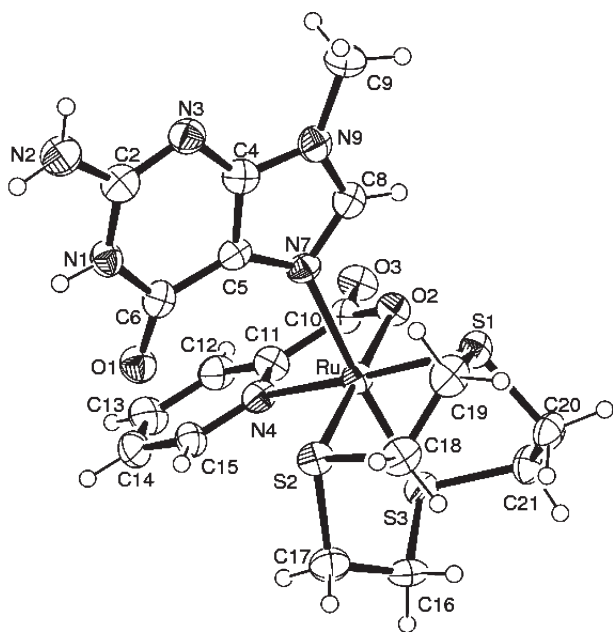
The structures of compounds **1** and **3** have been previously determined in solid state by X-ray diffraction investigations.<sup>20</sup> The molecular structure of complex **2** has also been reported earlier as Cl (**2-Cl**)<sup>33</sup> and as the CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> (**2-OTf**)<sup>17</sup> salt. In the course of this study, we obtained crystals suitable for X-ray investigation also for compound **2** as PF<sub>6</sub> salt (Fig. S13†). In **2** the ruthenium centre presents the expected octahedral coordination geometry, with Ru–ligand bond lengths closely comparable to those found in **2-Cl** and **2-OTf** derivatives. Interestingly, the plane of the bpy ligand is canted towards the chloride, an arrangement likely induced by the  $\pi$ – $\pi$  interaction (centroid-to-centroid distances of 3.766(2) Å) between bpy ligands of symmetry related complexes in the lattice (Fig. S14†).

Yellow crystals of [Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (**4**) and of [Ru([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)](PF<sub>6</sub>) (**10**) suitable for X-ray analysis slowly grew from the mother liquor of the reactions of **1** and **3** with 9MeG, respectively, upon addition of the





**Fig. 4** ORTEP view (50% probability ellipsoids) of the cation of [Ru-([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (**4**) with the atom labelling scheme.



**Fig. 5** ORTEP view (40% probability ellipsoids) of the cation of [Ru-([9]aneS3)(pic)(9MeG-N7)](PF<sub>6</sub>) (**10**) with the atom labelling scheme.

large excess of NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>. The molecular structures show that in each complex the metal ion adopts a distorted octahedral coordination geometry with the 9MeG exhibiting the typical N7 coordination (Fig. 4 and 5).<sup>34</sup>

The coordination bond distances and angles of complexes **4** and **10** are listed in Table 2. The geometrical values are unexceptional, with the Ru–N(7) bond lengths (2.1549(16) and 2.164(5) Å, respectively) comparable within their esd's. The orientation of the guanine with respect to the equatorial coordination plane is similar in complexes **4** and **10**, but the former is further stabilized by an intramolecular hydrogen bond between

**Table 2** Selected coordination bond distances (Å) and angles (°) for compounds **4** and **10**

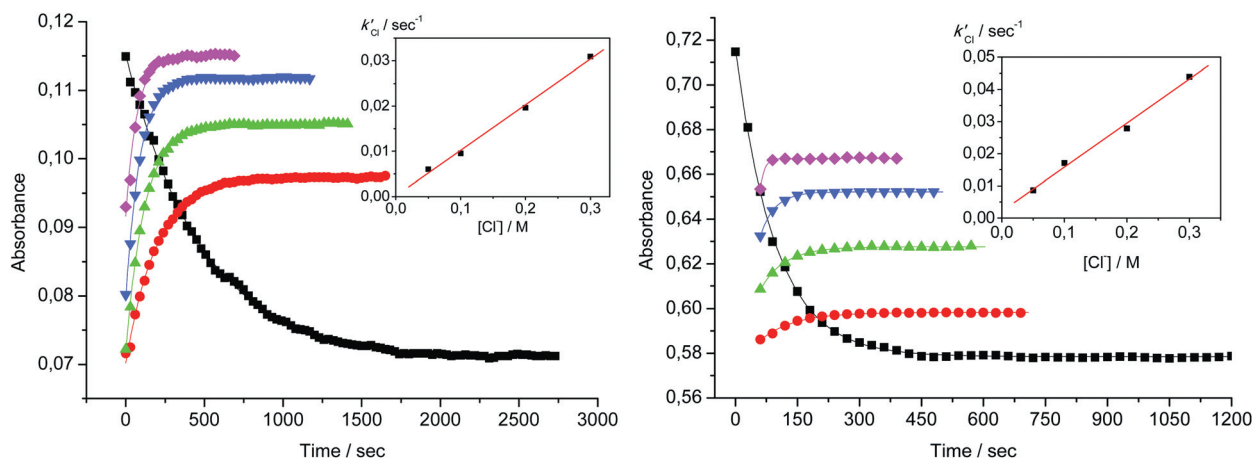
	<b>4</b> (X = N(5))	<b>10</b> (X = O(2))
Ru–N(7)	2.1549(16)	2.164(5)
Ru–S(1)	2.2934(5)	2.2984(16)
Ru–S(2)	2.2993(5)	2.2760(17)
Ru–S(3)	2.2852(5)	2.2765(17)
Ru–N(4)	2.1422(17)	2.104(5)
Ru–X	2.1609(17)	2.132(4)
N(7)–Ru–S(1)	90.48(5)	88.02(14)
N(7)–Ru–S(2)	92.58(5)	92.83(15)
N(7)–Ru–S(3)	178.54(5)	176.11(14)
N(7)–Ru–N(4)	88.97(6)	93.1(2)
N(4)–Ru–S(1)	176.26(5)	172.10(16)
N(4)–Ru–S(2)	95.66(5)	99.47(16)
N(4)–Ru–S(3)	91.72(5)	90.27(15)
S(1)–Ru–S(2)	88.065(18)	88.28(6)
S(1)–Ru–S(3)	88.753(19)	88.38(6)
S(2)–Ru–S(3)	88.636(19)	88.55(6)
N(4)–Ru–X	80.28(7)	78.48(19)
N(7)–Ru–X	87.15(6)	89.16(19)
S(1)–Ru–X	96.00(5)	93.73(12)
S(2)–Ru–X	175.93(5)	177.22(12)
S(3)–Ru–X	91.69(5)	89.58(13)

the carbonyl oxygen of 9MeG and one NH of en (see Fig. 4, N(4)⋯O1 distance of 2.865 Å, N(4)–H⋯O1 angle of 159.16°). The same N atom is involved in a hydrogen bond with the lattice water molecule (Fig. S15†). Such (en)N–H⋯O(guanine) interaction was also observed in the [(η<sup>6</sup>-arene)Ru(en)(9EtG-N7)]<sup>2+</sup> complexes reported by Sadler and co-workers,<sup>16</sup> and it has been proposed to be a crucial feature for the selective binding of the Ru–arene complexes to DNA and therefore for their antitumor activity.

Interestingly, in complex **10** the guanine forms a dihedral angle of 74.7(1)° with the equatorial S1/S2/N4/O4 mean plane, perhaps to favour the formation of intermolecular hydrogen bonds. In fact, both the N(1)H and N(2)H<sub>2</sub> groups of guanine form a pair of hydrogen bonds with the picoline carboxylate of a symmetry related complex, thus generating a 1D chain along the *a*-axis (Fig. S16†). Guanine is the only DNA base that is capable of forming these two hydrogen bonds with carboxylate groups; none of the other bases has two donor groups in the correct position.<sup>35</sup>

### UV-Vis kinetics of aquation and anation

The aquation and anation kinetics of complexes **2** and **3** were studied quantitatively by UV-Vis spectroscopy at concentrations of 0.1 mM. The aquation of complex **1**, as mentioned above, is faster – equilibration occurs within 2 min at 298 K – and thus was not investigated. Within 30 min after dissolution of each complex, the UV-Vis spectra of compounds **2** and **3** in aqueous solutions show minor – but clearly measurable – time-dependent changes in the region 200–550 nm (Fig. S17 and S18†). In each case the presence of isosbestic points suggested the occurrence of a single hydrolytic process, *i.e.* conversion of the initial chlorido complex into the corresponding aqua species, consistent with the NMR observations. The wavelength corresponding to a maximum change in absorption (Fig. S18,† difference spectra)



**Fig. 6** Time-dependence of the absorbance for the aquation of **2** and anation of **2a** (left, at 446 nm, 0.1 mM) and of **3** and **3a** (right, at 466 nm, 0.1 mM) in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> solutions at 298 K. The full lines represent computer fits giving the first order rate constants for aquation, and *pseudo*-first-order rate constants for anation. Labels: aquation (■), anation after addition of 50 (●), 100 (▲), 200 (▼) or 300 (◆) mM NaCl to the equilibrated solution. Insets: Plot of the observed *pseudo*-first-order rate constants  $k'_{\text{Cl}}$  vs.  $[\text{Cl}^-]$ .

**Table 3** Rate and equilibrium constants for aquation of complexes **2** and **3** at 298 K

	Solvent	$k_{\text{H}_2\text{O}}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	$(t_{1/2})_{\text{H}_2\text{O}}$ (min)	$k_{\text{Cl}}$ ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$K_{\text{aq}}$ ( $10^{-3} \text{ M}$ )
<b>2</b>	H <sub>2</sub> O	1.99 ± 0.01	5.80 ± 0.03		
	0.1 M NaClO <sub>4</sub>	2.07 ± 0.02	5.58 ± 0.05	0.101 ± 0.005	20.5 ± 1.2
<b>3</b>	H <sub>2</sub> O	9.73 ± 0.16	1.19 ± 0.02		
	0.1 M NaClO <sub>4</sub>	10.42 ± 0.07	1.11 ± 0.01	0.137 ± 0.008	76.1 ± 5.0

was selected for the kinetic studies (446 nm for **2** and 466 nm for **3**), performed at 298 K in 0.1 M NaClO<sub>4</sub>. In each case the time dependence of the absorbance followed first-order kinetics (Fig. 6), corresponding to the rate constants  $k_{\text{H}_2\text{O}}$  listed in Table 3. The bpy complex **2** hydrolyzes about 5 times more slowly than the pic complex **3**. The aquation rates were also determined in pure H<sub>2</sub>O (Table 3). As expected, according to the Brønsted equation,<sup>36</sup> the rate constants are almost independent of the ionic strength since at least one of the reactants is neutral (*i.e.* H<sub>2</sub>O). It is worth noting that the rate constants of Pt–Cl hydrolysis in the established anticancer drug cisplatin ( $6.32 \times 10^{-5}$  and  $2.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  for the first and second chloride ligands, respectively)<sup>37</sup> are significantly lower (*ca.* two orders of magnitude) than those found for **2** and **3**, implying that our coordination compounds evolve to the active aqua species much faster than cisplatin in low chloride concentration environments corresponding to intracellular conditions. However, it has been proved that fast aquation of complexes might lead to reduced activity and/or to increased toxicity due to their fast binding to biomolecules other than those responsible for tumor proliferation such as DNA.

As complex **1** hydrolyzes faster ( $t_{1/2} < 1$  min) than **3**, it can be concluded that the rates of aquation are strongly influenced by the nature and charge of the chelating ligand and follow the order en (**1**) > pic (**3**) > bpy (**2**). However, the X-ray structural analysis shows that, whereas the Ru–Cl bond length in **1** is the longest among the three complexes (2.4480(16) Å), it is shorter in **3** than in **2** (2.2429(16) vs. 2.4338(10) Å), implying that bond-breaking alone is not the rate-determining step of the

aquation process and suggesting that it might occur through an associative interchange mechanism ( $I_a$ ). The same  $I_a$  mechanism has been proposed also for the aquation of the active organo-ruthenium  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{en})\text{Cl}]^+$  compounds that have aquation rate constants similar to **3**.<sup>38</sup>

The reverse anation reactions were studied by adding an excess of NaCl (four different concentrations, from 50 to 300 mM) to equilibrated solutions of the chlorido complexes **2** and **3** at 298 K. The anation reactions were relatively fast (Fig. 6), and equilibrium was reached within *ca.* 10 min. The second-order rate constants  $k_{\text{Cl}}$  were calculated from the slopes of the plots of the *pseudo*-first-order rate constants  $k'_{\text{Cl}}$  vs.  $[\text{Cl}^-]$  (insets in Fig. 6) and are listed in Table 3. The *pseudo*-first-order rate constant increases linearly with increasing  $\text{Cl}^-$  concentration. It can be seen that the anation reaction of the pic aqua-species **3a** is *ca.* 1.5 times faster compared to the bpy complex **2a**, despite this latter being a dication, suggesting that variations in the steric and electronic effects of the chelating ligand prevail on the total charge of the complex in modulating the rates of the ligand exchange reactions.

The values of the equilibrium constants for the hydrolysis reaction of complexes **2** and **3** at 298 K were calculated from the ratios of  $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{Cl}}$ :  $20.5 \times 10^{-3} \text{ M}$  for **2** and  $76.1 \times 10^{-3} \text{ M}$  for **3** in 0.1 M NaClO<sub>4</sub>. These values are in qualitative agreement with those obtained from the NMR experiment ( $K = 13.6 \times 10^{-3} \text{ M}$  for **2** and  $59.0 \times 10^{-3} \text{ M}$  for **3** in D<sub>2</sub>O). In addition, the NMR results of the hydrolysis of complex **1** allowed us to calculate its equilibrium constant ( $27.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ), that has a value between **2** and **3**. For comparison, the half sandwich organometallic

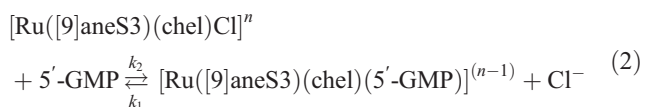
compounds  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{en})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ , that are believed to behave as monofunctional binders to DNA after chloride hydrolysis, have  $K$  values ( $7.3\text{--}9.7 \times 10^{-3}$  M) that are *ca.* from 2 to 10 times smaller than those of **2** and **3**, respectively.<sup>38</sup>

The obtained  $K$  values allowed us to predict the species distribution for the half sandwich complexes **2** and **3** under various biological conditions (Table S2†). In an aqueous solution (0.1 M  $\text{NaClO}_4$ ) containing 104 mM  $\text{NaCl}$  (extracellular  $\text{Cl}^-$  concentration) at equilibrium about 17% of **2** and 42% of **3** are aquated (*i.e.* the parent chlorido compounds are the dominant species). However, under cell nucleus conditions, where the chloride concentration is lower (*ca.* 4 mM), the equilibrium concentrations of the aqua species **2a** and **3a** increase to about 83% and 95%, respectively (Table S2†). Similar species distribution is expected also for complex **1** according to its NMR-derived  $K$  value: 21% or 87% of **1** is aquated in solutions containing 104 mM or 4 mM  $\text{NaCl}$ , respectively.

### UV-Vis studies of the reaction of compounds 1–3 with 5'-GMP

The substitution kinetics of  $\text{Cl}^-$  with 5'-GMP in complexes **1–3** were also investigated spectrophotometrically by following the change in absorbance at selected wavelengths as a function of time. All kinetic experiments were performed under *pseudo*-first-order conditions with respect to the nucleophile in order to force the reactions to go to completion. To suppress spontaneous hydrolysis of the chloride from Ru, all reactions were studied in the presence of 30 mM  $\text{NaCl}$ . This value was determined prior to kinetic measurements as the minimum chloride concentration for which no spectral changes were observed (Fig. S19†).

The substitution reactions of the complexes **1**, **2** and **3** with 5'-GMP (charge = -2) can be represented by eqn (2).



where *chel* = en, bpy or pic;  $n = +1$  or 0 depending on the charge of *chel*.

Here,  $k_2$  is the second-order rate constant for the forward reaction, involving the direct nucleophilic attack, and  $k_1$  for the reverse reaction. The second-order rate constants  $k_2$  are obtained directly from the slopes of the plots of  $k_{\text{obs}}$  versus the concentration of the entering nucleophile, whereas the  $k_1$  values are derived from the intercepts divided by  $[\text{Cl}^-]$  (*i.e.* 30 mM). Their values are listed in Table 4. The rate of the reaction is described by eqn (3) and (4).

$$-\frac{d[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{chel})\text{Cl}]^{n+}}{dt} = k_{\text{obs}}[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{chel})\text{Cl}]^{n+} \quad (3)$$

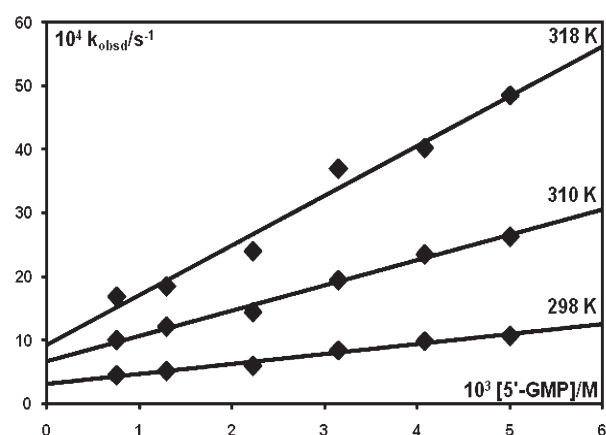
$$k_{\text{obs}} = k_1[\text{Cl}^-] + k_2[5'-\text{GMP}] \quad (4)$$

All kinetic runs could be fitted by a single exponential function and no subsequent reaction was observed. The *pseudo*-first-order rate constants,  $k_{\text{obs}}$ , were calculated as the average value of two or three independent runs and are given in Tables S3–S5.†

**Table 4** Rate constants and activation parameters for the substitution reactions between complexes **1**, **2** and **3** with 5'-GMP (25 mM Hepes buffer, 30 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7.2)

	$T$ (K)	$k_2$ ( $10^{-1}$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_1$ ( $10^{-3}$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$\Delta H_2^{\ddagger a}$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta S_2^{\ddagger a}$ ( $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ )
<b>1</b>	298	$0.67 \pm 0.02$	$0.40 \pm 0.20$	$60 \pm 2$	$-84 \pm 5$
	310	$1.74 \pm 0.13$	$0.80 \pm 0.30$		
	318	$3.29 \pm 0.11$	$1.83 \pm 1.13$		
<b>2</b>	298	$1.49 \pm 0.12$	$8.17 \pm 1.23$	$56 \pm 3$	$-91 \pm 8$
	310	$3.84 \pm 0.23$	$16.10 \pm 2.40$		
	318	$6.39 \pm 0.29$	$22.83 \pm 3.03$		
<b>3</b>	298	$1.58 \pm 0.14$	$10.37 \pm 1.40$	$61 \pm 3$	$-75 \pm 10$
	310	$3.97 \pm 0.19$	$22.40 \pm 1.97$		
	318	$7.80 \pm 0.62$	$31.23 \pm 6.47$		

<sup>a</sup> Values referring to the forward substitution reaction ( $k_2$ ).



**Fig. 7** *Pseudo*-first-order rate constants,  $k_{\text{obs}}$ , as a function of ligand concentration and temperature for the substitution reaction of  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{en})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  (**1**) with 5'-GMP in 25 mM Hepes buffer (30 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7.2).

The experimental results for the substitution reactions of the three complexes with 5'-GMP at three different temperatures are shown in Fig. 7 and S20.† A linear dependence on the nucleophile concentration was observed for all reactions. The activation parameters ( $\Delta H^{\ddagger}$  and  $\Delta S^{\ddagger}$ ), obtained from the Eyring plots, are summarized in Table 4. It can be seen that in all cases  $\Delta S^{\ddagger}$  values are negative, suggesting that the activation process is strongly dominated by bond-making. The small values of  $\Delta H^{\ddagger}$  and the negative values of  $\Delta S^{\ddagger}$  clearly support the associative mechanism for the substitution process. Similar mechanisms have been proposed for the substitution reactions of organometallic complexes with biologically relevant ligands.<sup>39</sup>

It can be seen that the rate constants depend on the nature of the chelating ligand, rather than on the charge of the complex: the half sandwich complexes **2** and **3** react *ca.* 2.5 times faster than **1** (Table 4). For example, the second-order rate constants  $k_2$  at 37.0 °C (*i.e.* the biologically relevant temperature) are  $1.74 \pm 0.13 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for **1**,  $3.84 \pm 0.23 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for **2**, and  $3.97 \pm 0.19 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for **3**. Compounds **2** and **3** contain  $\pi$ -acceptor pyridyl rings in *cis* positions relative to the leaving ligand. The presence of the  $\pi$ -acceptor ligands increases the electrophilicity of the metal center and, considering that the entering 5'-GMP has a -2 charge, is expected to stabilize the transition state better

than  $\sigma$ -donors (such as en in **1**). Consistent with these findings, binding of 5'-GMP through the phosphate group could be observed only for complex **1**: the corresponding intermediates for compounds **2** and **3** are probably too short lived to be detected by NMR spectroscopy.

## Conclusions

We have recently developed a series of half sandwich Ru(II) coordination compounds of the general formula  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})\text{(chel)Cl}](\text{PF}_6)_n$  whose *in vitro* antiproliferative activity depends on chloride hydrolysis and is tuned by the nature of the chelating ligand (chel).<sup>17,18,20,21</sup> Thus, we decided to investigate the kinetics of the aquation reaction for three selected complexes in this series, namely  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{en)Cl}](\text{PF}_6)$  (**1**),  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})\text{(bpy)Cl}](\text{PF}_6)$  (**2**), and  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{pic)Cl}](\text{PF}_6)$  (**3**). In addition, as DNA is believed to be the main biological target of the corresponding aqua species, we also investigated their binding to the guanine derivatives 9MeG, Guo and – in particular – 5'-GMP.

We have shown here that complexes **1–3** bind selectively to N7 of 9MeG, Guo and 5'-GMP, with rates and extents that depend on the nature of the chelating ligand. The X-ray molecular structures of compounds  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{en})(9\text{MeG-N7})](\text{PF}_6)_2$  (**4**) and  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{pic})(9\text{MeG-N7})](\text{PF}_6)$  (**10**) clearly showed that when the chelating ligand can act as a H-bond donor (chel = en) the binding is further stabilized by intramolecular H-bonding between C(6)=O of guanine and one NH of the en ligand.

In the early stages of the reaction between **1** and 5'-GMP, transient binding of ruthenium to the phosphate group was detected, followed by its complete migration to N7 after *ca.* 1 h. Such phosphate binding was not observed for complexes **2** and **3**, most likely because the transients are too short lived.

Hydrolysis is known to be an important mechanism of activation for *functional compounds* such as the anticancer drug cisplatin, and the aquation rate plays a crucial role in the antitumor activity of such compounds. We established that the aquation of complexes **1–3** occurs within 30 min at 298 K, which is *ca.* two orders of magnitude faster than cisplatin and one order of magnitude faster than the organometallic counterparts  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{en)Cl}]^+$ . The rate of aquation follows the order **1** (en) > **3** (pic) > **2** (bpy), suggesting that it is affected both by the nature and by the charge of the chelating ligand. As the corresponding aquation reactions (binding of  $\text{Cl}^-$  to the aqua species) are also rapid, the equilibrium constants are relatively small (*ca.*  $10^{-2}$  M). Hence, in blood plasma these complexes will exist largely as the less reactive chlorido derivatives and the percentage of aqua species will increase markedly in the cytoplasm and nucleus where the chloride concentration is lower. In addition, the aquation rate constants for **1–3** are unrelated to the Ru–Cl bond length, indicating that bond breaking is not the rate-controlling step and that an associative mechanism occurs.

The kinetic data for the reaction of compounds **1–3** with 5'-GMP clearly showed that the rate of the reaction depends on the nature of the chelating ligand rather than on the charge of the complex: the neutral complex **3** binds 5'-GMP as fast as the cationic compound **2**, and *ca.* 2.5 times faster than **1**. An associative mechanism for the substitution process is supported by the

measured enthalpies and entropies of activation ( $\Delta H^\ddagger > 0$ ,  $\Delta S^\ddagger < 0$ ).

These studies, that afforded quantitative data on how the rate and extent of chloride hydrolysis in  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{chel)Cl}](\text{PF}_6)_n$  compounds – as well as their binding to guanine derivatives – depend on the nature and charge of the chelating ligand, provide a basis for optimizing the design of this series of half sandwich Ru(II) coordination complexes and – in principle – for improving their anticancer activity. Now the question arises if the current results can be correlated to the existing cytotoxicity data to afford some tentative indication, despite the limited number of entries. As mentioned already, among the half sandwich Ru(II) coordination compounds that we tested *in vitro*, only  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{en)Cl}](\text{PF}_6)$  (**1**) showed moderate antiproliferative activity against the breast carcinoma MDA-MB-231 cell line ( $\text{IC}_{50}$  *ca.* 80  $\mu\text{M}$ ). All the others were very mildly active (*e.g.*  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS3})(\text{dach)Cl}](\text{PF}_6)$ ,  $\text{IC}_{50}$  *ca.* 124  $\mu\text{M}$ ) or not active at all, including **2** (compound **3** has not been tested *in vitro* yet).<sup>17,18,20,21</sup> We could establish that inert complexes were inactive, *i.e.* the hydrolysis of the leaving group (*i.e.* Cl) is a prerequisite for antiproliferative activity.

All three compounds investigated here have kinetics of activation that are quite fast on the time scale of the biological experiment. If we consider the overall reaction rate with the target (*i.e.* kinetics of activation plus kinetics of reaction with 5'-GMP) we notice that the most active complex **1** hydrolyses faster than the others but it is slower in reacting with the guanine derivatives. This relatively slow binding rate might be advantageous in that it allows the active aqua species to reach the target before undergoing unwanted side-reactions with other bio-ligands in the cell.

Nevertheless, we believe that the overall modest kinetic differences that we found between **1** and **2** are not sufficient to explain the different antiproliferative activities of these two very similar compounds: probably the most important feature for such complexes to have anticancer activity is the ability of the chelating ligand to act as a H-bond donor, thus stabilizing the monofunctional adducts and inducing significant perturbation to DNA.

## Acknowledgements

This work was performed within the frame of COST Action CM1105. Regione FVG (Project “Nuove Terapie e Farmaci Antitumorali”), Fondo Trieste, Fondazione Beneficentia Stiftung, the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. 172011), and the Slovenian Research Agency (Project J1-4131) are gratefully acknowledged for financial support. A. R. is grateful to the bilateral Italian–Serbian project “C.S.I.U.T” for a research fellowship at the University of Trieste, and J. K. thanks the Slovenian Research Agency for a junior researcher grant. The EN FIST Centre of Excellence, Dunajska 156, SI-1000 Ljubljana, Slovenia is acknowledged for the use of the SuperNova diffractometer.

## References

1. I. Bratsos, T. Gianferrara, E. Alessio, C. G. Hartinger, M. A. Jakupec and B. K. Keppler, in *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, ed. E. Alessio, Wiley-VCH, Weinheim, 2011, pp. 151–174.



- 2 J. M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 3717–3727.
- 3 C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessel, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson and B. K. Keppler, *Chem. Biodiversity*, 2008, **5**, 2140–2155.
- 4 G. Gasser, I. Ott and N. Metzler-Nolte, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 3–25.
- 5 C. Süss-Fink, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 1673–1688.
- 6 R. E. Morris, R. E. Aird, P. d. S. Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell and P. J. Sadler, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 3616–3621.
- 7 C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurenczy, T. J. Geldbach, G. Sava and P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4161–4171.
- 8 S. J. Dougan and P. J. Sadler, *Chimia*, 2007, **61**, 704–715.
- 9 W. H. Ang, A. Casini, G. Sava and P. J. Dyson, *J. Organomet. Chem.*, 2011, **696**, 989–998.
- 10 R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler and D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer*, 2002, **86**, 1652–1657.
- 11 A. F. A. Peacock and P. J. Sadler, *Chem.-Asian J.*, 2008, **3**, 1890–1899.
- 12 Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam and P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, 2005, 4764–4776.
- 13 T. Gianferrara, I. Bratsos and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2009, 7588–7598.
- 14 Although DNA is believed to be the main target responsible for the activity of these compounds, other biomolecules such as RNA, various serum proteins and/or enzymes have not been excluded [P. J. Dyson and G. Sava, *Dalton Trans.*, 2006, 1929–1933; A. Bergamo and G. Sava, *Dalton Trans.*, 2007, 1267–1272].
- 15 H. Chen, J. A. Parkinson, R. E. Morris and P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 173–186.
- 16 H. Chen, J. A. Parkinson, S. Parsons, R. A. Coxall, R. O. Gould and P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 3064–3082.
- 17 B. Serli, E. Zangrando, T. Gianferrara, C. Scolaro, P. J. Dyson, A. Bergamo and E. Alessio, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2005, 3423–3434.
- 18 I. Bratsos, S. Jedner, A. Bergamo, G. Sava, T. Gianferrara, E. Zangrando and E. Alessio, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 1120–1133.
- 19 I. Bratsos, G. Birarda, S. Jedner, E. Zangrando and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2007, 4048–4058.
- 20 I. Bratsos, E. Mitri, F. Ravalico, E. Zangrando, T. Gianferrara, A. Bergamo and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 7358–7371.
- 21 I. Bratsos, D. Urnkar, E. Zangrando, P. Genova-Kalou, J. Košmrlj, E. Alessio and I. Turel, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 5188–5199.
- 22 I. Bratsos, C. Simonin, E. Zangrando, T. Gianferrara, A. Bergamo and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 9533–9543.
- 23 Z. Otwinowski and W. Minor, *Methods Enzymol.*, 1997, **276**, 307–326.
- 24 A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacobozzo and A. Guagliardi, *J. Appl. Crystallogr.*, 1993, **26**, 343–350.
- 25 A. Altomare, M. C. Burla, M. Camalli, G. L. Cascarano, C. Giacobozzo, A. Guagliardi, A. G. G. Moliterni, G. Polidori and R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.*, 1999, **32**, 115–119.
- 26 G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.*, 2008, **A64**, 112–122.
- 27 L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, 1999, **32**, 837–838.
- 28 A. Dorcier, C. G. Hartinger, R. Scopelliti, R. H. Fish, B. K. Keppler and P. J. Dyson, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 1066–1076.
- 29 Y. N. Tian, P. Yang, Q. S. Li, M. L. Guo and M. G. Zhao, *Polyhedron*, 1997, **16**, 1993–1998.
- 30 E. Alessio, Y. Xu, S. Cauci, G. Mestroni, F. Quadrioglio, P. Viglino and L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 7068–7071.
- 31 R. B. Martin, *Acc. Chem. Res.*, 1985, **18**, 32–38.
- 32 T. Bugarcic, A. Habtemariam, J. Stepankova, P. Heringova, J. Kasparkova, R. J. Deeth, R. D. L. Johnstone, A. Prescimone, A. Parkin, S. Parsons, V. Brabec and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 11470–11486.
- 33 B. J. Goodfellow, V. Félix, S. M. D. Pacheco, J. Pedrosa De Jesus and M. G. B. Drew, *Polyhedron*, 1997, **16**, 393–401.
- 34 B. Lippert, *Prog. Inorg. Chem.*, 2007, **37**, 1–97.
- 35 G. Lancelot and C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1977, **74**, 4872–4875.
- 36 W. J. Moore, *Physical Chemistry*, Longmans, London, 4th edn, 1962, p. 368.
- 37 S. E. Miller and D. A. House, *Inorg. Chim. Acta*, 1991, **187**, 125–132.
- 38 F. Wang, H. Chen, S. Parsons, I. D. H. Oswald, J. E. Davidson and P. J. Sadler, *Chem.-Eur. J.*, 2003, **9**, 5810–5820.
- 39 A. Rilak, B. Petrović, S. Grgurić-Šipka, Ž. Tešić and Ž. Bugarcic, *Polyhedron*, 2011, **30**, 2339–2344.

# New Water-Soluble Ruthenium(II) Terpyridine Complexes for Anticancer Activity: Synthesis, Characterization, Activation Kinetics, and Interaction with Guanine Derivatives

Ana Rilak,<sup>†,‡</sup> Ioannis Bratsos,<sup>\*,‡,§</sup> Ennio Zangrando,<sup>‡</sup> Jakob Kljun,<sup>||,⊥</sup> Iztok Turel,<sup>||</sup> Živadin D. Bugarčić,<sup>†</sup> and Enzo Alessio<sup>\*,‡</sup>

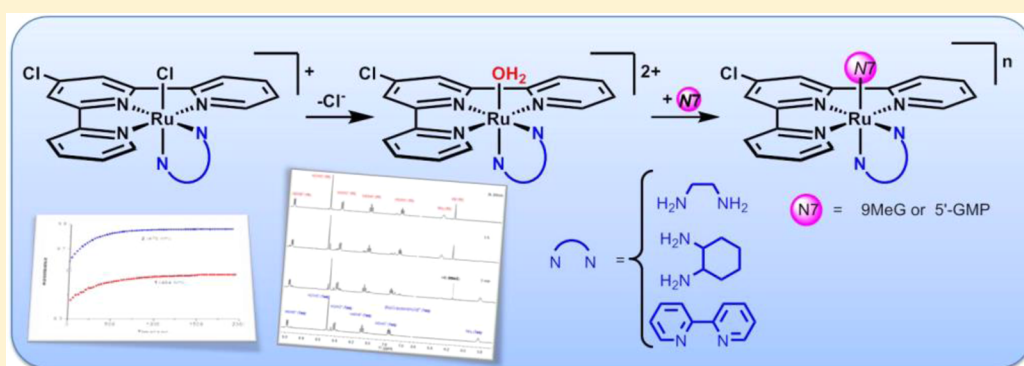
<sup>†</sup>Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>‡</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Università di Trieste, Via L. Giorgieri 1, 34127 Trieste, Italy

<sup>||</sup>Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Aškerčeva 5, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>⊥</sup>EN→FIST Centre of Excellence, Dunajska 156, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

## Supporting Information



**ABSTRACT:** With the aim of assessing whether ruthenium(II) compounds with meridional geometry might be utilized as potential antitumor agents, a series of new, water-soluble, monofunctional ruthenium(II) complexes of the general formula  $mer-[Ru(L_3)(N-N)X][Y]_n$  (where  $L_3 = 2,2':6',2''$ -terpyridine (tpy) or 4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridine (Cl-tpy),  $N-N = 1,2$ -diaminoethane (en), 1,2-diaminocyclohexane (dach), or 2,2'-bipyridine (bpy);  $X = Cl$  or  $dmsO-S$ ;  $Y = Cl, PF_6$ , or  $CF_3SO_3$ ;  $n = 1$  or 2, depending on the nature of  $X$ ) were synthesized. All complexes were fully characterized by elemental analysis and spectroscopic techniques (IR, UV/visible, and 1D and 2D NMR), and for three of them, i.e.,  $[Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl][Cl]$  (**3<sub>Cl</sub>**),  $[Ru(Cl-tpy)(en)(dmsO-S)][Y]_2$  [ $Y = PF_6$  (**6<sub>PF\_6</sub>**),  $CF_3SO_3$  (**6<sub>OTf</sub>**)] and  $[Ru(Cl-tpy)(bpy)(dmsO-S)][CF_3SO_3]_2$  (**8<sub>OTf</sub>**), the X-ray structure was also determined. The new terpyridine complexes, with the exception of **8**, are well soluble in water (>25 mg/mL). <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy studies performed on the three selected complexes  $[Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl]^+$  [ $N-N = en$  (**1**), dach (**2**), and bpy (**3**)] demonstrated that, after hydrolysis of the Cl ligand, they are capable of interacting with guanine derivatives [i.e., 9-methylguanine (9MeG) or guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP)] through N7, forming monofunctional adducts with rates and extents that depend strongly on the nature of  $N-N$ :  $1 \approx 2 \gg 3$ . In addition, compound **1** shows high selectivity toward 5'-GMP compared to adenosine-5'-monophosphate (5'-AMP), in a competition experiment. Quantitative kinetic investigations on **1** and **2** were performed by means of UV/visible spectroscopy. Overall, the complexes with bidentate aliphatic diamines proved to be superior to those with bpy in terms of solubility and reactivity (i.e., release of  $Cl^-$  and capability to bind guanine derivatives). Contrary to the chlorido compounds, the corresponding dmsO derivatives proved to be inert (viz., they do not release the monodentate ligand) in aqueous media.

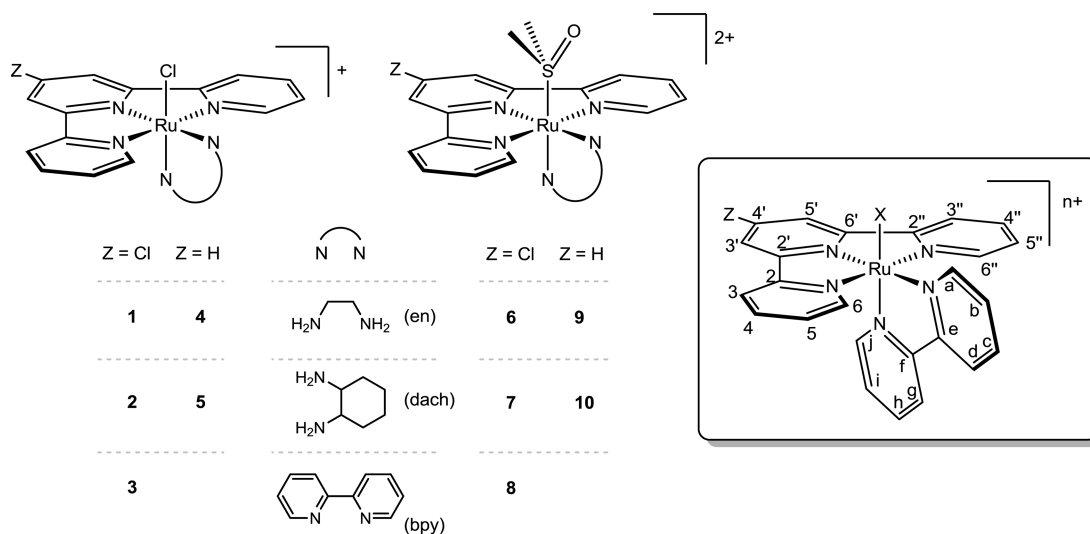
## INTRODUCTION

In the search for nonplatinum antitumor drugs with a different spectrum of activity and fewer side effects than those of cisplatin and its analogues, ruthenium compounds appear to be the front runners,<sup>1</sup> especially after the introduction of two ruthenium(III) complexes, namely,  $[indH]trans-[RuCl_4(ind)_2]$  (ind = indazole, KP1019) and  $[imH]trans-[RuCl_4(dmsO-S)(im)]$  (im = imidazole, NAMI-A), into clinical trials.<sup>2,3</sup>

During the last decades, a large interest in ruthenium polypyridyl complexes as structure- and site-specific DNA binding agents with attractive photophysical properties has grown.<sup>4,5</sup> Studies on ruthenium polypyridyl complexes that feature at least one coordination site occupied by a good

Received: March 6, 2014

Published: June 2, 2014



**Figure 1.** Schematic representation of complexes 1–10. Inset: Numbering scheme of the tpy and bpy ligands used for the NMR characterization.

leaving group revealed that, besides being good intercalators, they can also coordinate DNA nucleobases in a two-step process, similar to cisplatin:<sup>5</sup> release of the labile ligand(s) with formation of the corresponding aqua species, followed by binding on nucleobases (*functional compounds*).<sup>6</sup> Some of them were found to possess also promising *in vitro* antitumor activity. For example, the complexes *mer*-[Ru(tpy)Cl<sub>3</sub>] (tpy = 2,2':6',2''-terpyridine) and  $\alpha$ -[Ru(azpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (azpy = 2-phenylazopyridine) showed remarkably high cytotoxicity against most of the tested cell lines (with IC<sub>50</sub> values in the low micromolar range).<sup>7,8</sup> In particular, the high activity of *mer*-[Ru(tpy)Cl<sub>3</sub>] was assumed to derive from its ability to bind DNA through two guanine derivatives in a *trans* configuration, forming interstrand cross-links.<sup>9</sup> This hypothesis was supported by the observation that the monofunctional complex [Ru(tpy)(bpy)-Cl][Cl] (bpy = 2,2'-bipyridine), which can also bind to DNA, displays a markedly lower activity than *mer*-[Ru(tpy)Cl<sub>3</sub>].<sup>7</sup>

Over the past years, a number of monochloridoruthenium(II) terpyridine complexes of the type *mer*-[Ru(tpy)(N-N)Cl]<sup>+</sup>, and/or their monoaqua analogues, containing different N-donor chelating ligands (N-N), such as bpy,<sup>10</sup> 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (Me<sub>2</sub>bpy),<sup>11</sup> 4,4'-diphenyl-2,2'-dipyridine (biphpy),<sup>12</sup> 1,10-phenanthroline (phen),<sup>10,11</sup> 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline (tmphen),<sup>12</sup> dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine (dppz),<sup>10b,12</sup> *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (tmen),<sup>10a,12</sup> 2,2'-azobispyridine (apy),<sup>13</sup> azpy,<sup>13b</sup> and 2-phenylpyridinylmethylethylamine (impy),<sup>13b</sup> have been prepared and studied for their DNA binding ability. It is important to note that all of these complexes contain exclusively N-donor chelating ligands that are unable to form strong hydrogen bonds. It was found that most of the Ru<sup>II</sup>-tpy complexes are capable to bind covalently to DNA (mainly at guanine residues) forming monofunctional adducts, and some of them to stop DNA replication.<sup>7,12</sup>

On the other hand, most of the recent research on anticancer ruthenium(II) compounds has been focused on half-sandwich organometallic ruthenium(II) species of the general formula [Ru( $\eta^6$ -arene)(N-N)X][PF<sub>6</sub>], known also as “piano-stool” compounds, which were found to possess promising activity both *in vitro* (with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.6 to 9  $\mu$ M, depending on the arene and on the cell line) and *in vivo*, in particular when N-N is capable of making hydrogen bonds

[e.g., N-N = 1,2-diaminoethane (en)].<sup>14,15</sup> Their activation is believed to require dissociation of the monodentate ligand X, i.e., X = Cl,<sup>16</sup> and thus they can be classified as *prodrugs* (or *functional compounds*), with a mechanism of action similar to that of platinum drugs. These monofunctional compounds bind preferentially to N7 of guanine in DNA, and the coordinative bond can be complemented by specific hydrogen-bonding interactions between the N–H of the chelating ligand and the carbonyl C6=O of guanine, as well as by intercalative binding of the arene.<sup>17</sup> These additional interactions result in unique modes of binding to duplex DNA and structural distortions that are distinctly different from those caused by cisplatin.<sup>18</sup> Therefore, the presence of a chelating ligand capable of acting as a hydrogen-bond donor, such as en, is believed to play a crucial role in the activity of piano-stool compounds.<sup>17</sup>

Recently, our group contributed to this field, developing a series of new half-sandwich ruthenium(II) *coordination compounds* structurally similar to the organometallic complexes, i.e., with a facial tridentate ligand in place of the arene (e.g., [9]aneS3 = 1,4,7-trithiacyclononane), a bidentate chelating ligand, and a labile entity.<sup>19</sup> We found that among the new series of complexes with the general formula [Ru([9]aneS3)(N-N)Cl][PF<sub>6</sub>] only those with N-N = en or dach (dach = 1,2-diaminocyclohexane) showed moderate *in vitro* cytotoxicity, with IC<sub>50</sub> values of ca. 80  $\mu$ M (en) and 124  $\mu$ M (dach) against the MDA-MB-231 breast carcinoma cell line.<sup>19a–c</sup> It is worth noting that these are the only compounds among those tested that fulfill simultaneously two important features: both are capable of hydrolyzing the chloride ligand at a reasonable rate (i.e., within minutes) and of acting as hydrogen-bond donors through the chelating ligand. Further studies on [Ru([9]aneS3)(en)Cl][PF<sub>6</sub>] showed that this compound, similar to the organometallic analogues [Ru( $\eta^6$ -arene)(en)Cl][PF<sub>6</sub>], is capable of binding guanine derivatives through N7, forming monofunctional adducts after the relatively fast release of the Cl ligand. The coordinative binding is also assisted, as observed for the organometallic counterparts, by hydrogen bonding between the carbonyl of guanine and one NH of en, as evidenced by X-ray structural analysis in the case of [Ru([9]aneS3)(en)(9MeG-N7)][PF<sub>6</sub>]<sub>2</sub> (9MeG = 9-methylguanine).<sup>20</sup>



Therefore, it appears that both *fac* and *mer* ruthenium(II) complexes of the general formula  $[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{N-N})\text{X}]^+$  (where  $\text{L}_3$  is a tridentate ligand) are capable of making monofunctional adducts with DNA and of inducing cytotoxicity in cancer cells in vitro. However, despite some promising results, the solubility problems of terpyridine derivatives reduced the interest in the class of *mer* compounds, and they have been much less explored for anticancer activity compared to those with facial geometry.<sup>7,9,11,13</sup> It is therefore of interest in this context to obtain more insight at the molecular level on ruthenium complexes with the *mer* geometry.

In this work, building on the experience gained with half-sandwich ruthenium(II) coordination compounds, we investigated a series of *mer*- $[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{N-N})\text{X}][\text{Y}]_n$  complexes in which  $\text{L}_3$  is either tpy or Cl-tpy (4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridine), X is a supposedly labile entity (X = Cl or dmsos), N-N is a bidentate chelating ligand capable of hydrogen bonding with DNA nucleobases (N-N = en or dach), Y = Cl, PF<sub>6</sub>, or CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, and n = 1 or 2, depending on the nature of X. We focused mainly on Cl-tpy derivatives because the Cl, as a hydrogen-bond acceptor, might be advantageous by forming additional hydrogen bonds, such as O–H...Cl, N–H...Cl, and C–H...Cl, with the hydrogen-bond donors of the proteins (for transportation) and DNA (for activity).<sup>21</sup> For comparative purposes, the corresponding Ru(Cl-tpy) complexes with N-N = bpy were also prepared and investigated. All new terpyridine complexes (Figure 1) were fully characterized by elemental analysis, IR, UV/visible, and 1D and 2D NMR spectroscopy. The molecular structures of three complexes, i.e.,  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**3<sub>Cl</sub>**),  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{dmsos})][\text{Y}]_2$  [Y = PF<sub>6</sub> (**6<sub>PF<sub>6</sub></sub>**) and CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> (**6<sub>OTf</sub>**)], and  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(\text{dmsos})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  (**8<sub>OTf</sub>**), were determined also in the solid state by X-ray crystallography. The chemical behavior in aqueous solution of the new complexes and the binding properties of compounds 1–3 toward the guanine derivatives 9MeG and 5'-GMP (guanosine-5'-monophosphate), as model DNA bases, were investigated primarily by NMR spectroscopy in D<sub>2</sub>O at ambient temperature. The relative affinity of 5'-GMP and 5'-AMP (adenosine-5'-monophosphate) toward complex 1 was also established by a competition experiment. The kinetics of the aquation of 1 and 2 and of the subsequent interaction with 9MeG and 5'-GMP were established quantitatively by UV/visible spectroscopy.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** 1,2-Diaminoethane (en), (±)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane (dach), 2,2'-bipyridine (bpy), 4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridine (Cl-tpy), 2,2':6',2''-terpyridine (tpy), 9-methylguanine (9MeG), guanosine-5'-monophosphate disodium salt hydrate (5'-GMP-Na<sub>2</sub>), and adenosine-5'-monophosphate monohydrate (5'-AMP-H<sub>2</sub>O) are commercially available and were used as received. The precursors *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dmsos})_4]$ ,<sup>22</sup>  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$  (**P2**),<sup>23</sup> and  $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_2(\text{dmsos})]$  (**P4**)<sup>24</sup> were prepared as described in the literature, whereas the corresponding precursors  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})\text{Cl}_3]$  (**P1**)<sup>25</sup> and  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})\text{Cl}_2(\text{dmsos})]$  (**P3**)<sup>21</sup> were synthesized according to published procedures with some modifications and are reported in the Supporting Information (SI). All other chemicals were used as purchased without further purification.

**Instrumental Methods.** Monodimensional [<sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C (126 MHz), <sup>31</sup>P (202 MHz)] and bidimensional [<sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HMBIC] NMR spectra were recorded on a Varian 500 spectrometer. <sup>1</sup>H chemical shifts in D<sub>2</sub>O were referenced to the internal standard 2,2-dimethyl-2,2-silapentane-5-sulfonate at δ 0.00 or to added 1,4-dioxane (δ 3.75), whereas in other solvents, they

were referenced to the peak of a residual nondeuterated solvent [δ 4.33 for CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, 2.05 for (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, and 2.50 for dimethyl sulfoxide (DMSO)-*d*<sup>6</sup>]; <sup>13</sup>C chemical shifts in D<sub>2</sub>O were referenced to the peaks of traces of external solvents (δ 17.5 and 58.1 for ethanol and 39.4 for DMSO), whereas in other solvents, they were referenced to the peak of a residual nondeuterated solvent [δ 62.8 for CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, 29.84 for (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, and 39.52 for DMSO-*d*<sup>6</sup>]. <sup>31</sup>P chemical shifts were referenced to an external 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> standard at 0.00 ppm. All NMR spectra were run at 298 K. The UV/visible spectra were obtained on a Jasco V-500 UV/visible spectrophotometer equipped with a Peltier temperature controller or on a PerkinElmer Lambda 35 double-beam spectrophotometer, using 1.0-cm-path-length quartz cuvettes (3.0 mL). IR spectra were recorded on a PerkinElmer 983G spectrometer. Elemental analysis was performed at the Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, University of Udine (Italy).

**Synthetic Procedures.** In an attempt to isolate crystals suitable for X-ray analysis, most of the cationic complexes described below were synthesized with different counterions [either Cl<sup>−</sup>, PF<sub>6</sub><sup>−</sup>, or CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>−</sup> (OTf<sup>−</sup>)]; in such cases, only one preparation is reported here, whereas the others are detailed in the SI. Complexes that differ only in the nature of the counterion are labeled with the same number, as it is associated with the cation. When needed, the nature of the counterion is indicated as a subscript. The aqua species that are obtained in aqueous solution from some complexes upon hydrolysis of Cl<sup>−</sup> are labeled with the same number of the parent compound followed by "aq". The NMR assignments of these species are reported in the SI.

**General Synthetic Procedure for  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**1<sub>Cl</sub>**–**3<sub>Cl</sub>**) and  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{N-N})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**4<sub>Cl</sub>** and **5<sub>Cl</sub>**).** A weighed amount of **P1** was suspended in an ethanol/water (3:1) mixture containing 10 equiv of LiCl and 3 equiv of triethylamine (Et<sub>3</sub>N) as a reductant. The chelating ligand N-N (1.2 equiv; N-N = en, dach, and bpy) was then added, and the mixture was refluxed for ca. 3 h under vigorous stirring. The violet-to-purple solution was filtered while hot to remove any undissolved material. Rotary concentration under reduced pressure to ca. 1/4 of the initial volume and storage at 4.0 °C for 24 h induced formation of the product as a dark solid. It was collected by filtration, washed with ice-cold water, cold acetone, and diethyl ether, and vacuum-dried. The corresponding tpy complexes 4 and 5 were prepared with a similar procedure using **P2** as the starting material.

$[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**1<sub>Cl</sub>**). A total of 100.0 mg (0.210 mmol) of **P1**, 16.8 μL (0.252 mmol) of en, 89.0 mg (2.100 mmol) of LiCl, and 87.9 μL (0.630 mmol) of Et<sub>3</sub>N in 20 mL of ethanol/water afforded **1** as a dark-purple solid. Yield: 70.6 mg (67%). Anal. Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>Ru (499.79): C, 40.9; H, 3.63; N, 14.01. Found: C, 40.8; H, 3.71; N, 13.92. Complex **1** is soluble in water, methanol, and ethanol and slightly soluble in acetone and nitromethane, whereas it is insoluble in chloroform and dichloromethane. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): δ 8.92 (d, 2H, J = 5.5 Hz, C6H/C6''H), 8.42 (s, 2H, C3'H/C5''H), 8.35 (d, 2H, J = 8.0 Hz, C3H/C3''H), 7.99 (t, 2H, J = 7.7 Hz, C4H/C4''H), 7.71 (ddd, 2H, J = 7.4, 5.6, and 1.3 Hz, C5H/C5''H), 5.71 (t br, 2H, J = 5.1 Hz, NH<sub>2</sub> en), 3.25 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2.69 (s br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 2.36 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>): δ 8.95 (d, 2H, J = 5.5 Hz, C6H/C6''H), 8.42 (d, 2H, J = 8.1 Hz, C3H/C3''H), 8.38 (s, 2H, C3'H/C5''H), 8.06 (t, 2H, J = 7.6 Hz, C4H/C4''H), 7.73 (t, 2H, J = 6.3 Hz, C5H/C5''H), 5.34 (s br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 3.48 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2.62 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2.02 (overlapped with the H<sub>2</sub>O resonance, NH<sub>2</sub> en). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>): δ 162.4 (C2'/C6'), 160.8 (C2/C2''), 153.6 (C6H/C6''H), 137.6 (C4H/C4''H), 136.7 (C4'), 128.7 (C5H/C5''H), 124.4 (C3H/C3''H), 122.5 (C3'H/C5''H), 46.92 (CH<sub>2</sub> en), 46.91 (CH<sub>2</sub> en). Selected IR (KBr, cm<sup>−1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3256 (m); ν<sub>tpy</sub> 3036 (m), 1599 (s), 1474 (m), 1423 (s), 1119 (s), 787 (s), 566 (w); ν<sub>Ru–Cl</sub> 320 (m). UV/visible spectrum [H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub> nm (ε, M<sup>−1</sup> cm<sup>−1</sup>): 239 (24310), 277 (20993), 317 (29034), 370 (4375), 503 (4390), 562 (3830).

$[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$  (**2<sub>Cl</sub>**). A total of 100.0 mg (0.210 mmol) of **P1**, 30.3 μL (0.252 mmol) of dach, 89.0 mg (2.100 mmol) of LiCl, and 87.9 μL (0.630 mmol) of Et<sub>3</sub>N in 20 mL of ethanol/water (3:1) afforded **2** as a dark-purple solid. Yield: 80.2 mg (69%). Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>Ru (553.88): C, 45.5; H, 4.37; N, 12.64. Found: C, 45.4;



H, 4.29; N, 12.72. Complex **2** is soluble in water, methanol, and ethanol and partially soluble in nitromethane, whereas it is insoluble in acetone, chloroform, and dichloromethane.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.98 (d, 1H,  $J = 5.1$  Hz, C6H), 8.89 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz, C6'H), 8.45 (s, 1H, C3'H), 8.44 (s, 1H, C5'H), 8.37 (t, 2H,  $J = 6.5$  Hz, C3H/C3'H), 8.01 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz, C4H/C4'H), 7.71 (t, 2H,  $J = 6.1$  Hz, C5H/C5'H), 6.05 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, NH dach), 5.19 (m, 1H, NH dach), 2.76–2.61 (m, 2H, NH + CH dach), 2.61–2.51 (m, 1H, CH dach), 2.37 (m, 1H, NH dach), 2.09–1.97 (m, 1H, CH dach), 1.83–1.69 (m, 2H, CH dach), 1.55 (d, 2H,  $J = 10.1$  Hz, CH dach), 1.24 (m, 1H, CH dach), 1.11 (m, 1H, CH dach), 0.89 (m, 1H, CH dach).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ):  $\delta$  8.98 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz, C6H), 8.93 (d, 1H,  $J = 5.1$  Hz, C6'H), 8.42 (t, 2H,  $J = 8.9$  Hz, C3H/C3'H), 8.37 (dd, 2H,  $J = 10.7$  and 1.7 Hz, C3'H/C5'H), 8.05 (t, 2H,  $J = 7.8$  Hz, C4H/C4'H), 7.72 (m br, 2H, C5H/C5'H), 5.68 (d br, 1H, NH dach), 4.85 (t, 1H,  $J = 12.2$  Hz, NH dach), 2.94 (m, 1H, CH dach), 2.69 (d br, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 2.31 (m, 1H, CH dach), 2.11 (overlapped with the H<sub>2</sub>O resonance, NH dach), 1.92–1.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub> dach), 1.74 (br m, 1H, NH dach), 1.68 (d br, 1H,  $J = 13.1$  Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1.59 (d br, 1H,  $J = 12.7$  Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1.34 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1.21 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1.01 (ddd, 2H,  $J = 24.9$ , 12.5, and 3.5 Hz, CH<sub>2</sub> dach).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ):  $\delta$  162.44 (C2'), 162.37 (C6'), 160.8 (C2), 160.7 (C2''), 153.7 (6'H), 153.6 (C6H), 137.6 (C4H), 137.5 (C4'H), 137.0 (C4'), 128.9 (C5'H), 128.6 (C5H), 124.4 (C3H), 124.3 (C3'H), 122.54 (C3'H), 122.48 (C5'H), 61.9 (CH dach), 61.7 (CH dach), 36.4 (CH<sub>2</sub> dach), 35.1 (CH<sub>2</sub> dach), 25.7 (CH<sub>2</sub> dach), 25.3 (CH<sub>2</sub> dach). Selected IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{NH}}$  3285 (m);  $\nu_{\text{tpy}}$  2930 (m), 1602 (s), 1472 (m), 1423 (m), 1109 (s), 785 (s), 563 (w);  $\nu_{\text{Ru-Cl}}$  310 (w). UV/visible spectrum [ $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 239 (24530), 278 (21080), 317 (29220), 369 (4430), 502 (4690), 561 (4010).

[Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl][Cl] (**3<sub>Cl</sub>**). A total of 50.0 mg (0.105 mmol) of **P1**, 19.7 mg (0.126 mmol) of bpy, 44.5 mg (1.050 mmol) of LiCl, and 43.9  $\mu\text{L}$  (0.315 mmol) of Et<sub>3</sub>N in 10 mL of ethanol/water afforded **3** as a dark-red crystalline solid. Yield: 48.8 mg (78%). An alternative, less efficient, preparation of this complex has been recently reported.<sup>25</sup> Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>Ru (595.87): C, 50.4; H, 3.04; N, 11.75. Found: C, 50.4; H, 3.13; N, 11.71. Crystals suitable for X-ray analysis were obtained from an aqueous solution of **3<sub>Cl</sub>** to which an excess of NaCl had been added. Complex **3** is soluble in water, methanol, ethanol, acetone, chloroform, dichloromethane, and nitromethane.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  9.95 (d, 1H,  $J = 5.5$  Hz, CaH), 8.67 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8.66 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, CdH), 8.41 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, C3H/C3'H), 8.36–8.29 (m, 2H, CgH/CcH), 7.99 (t, 1H,  $J = 6.4$  Hz, CbH), 7.93 (t, 2H,  $J = 7.8$  Hz, C4H/C4'H), 7.79 (d, 2H,  $J = 5.3$  Hz, C6H/C6'H), 7.70 (t, 1H,  $J = 7.9$  Hz, ChH), 7.38–7.29 (m, 3H, CjH/C5H/C5'H), 6.95 (t, 1H,  $J = 6.7$  Hz, CiH).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  158.9 (C2'/C6'), 158.6 (Cf), 157.6 (C2/C2''), 156.1 (Ce), 152.5 (C6H/C6'H), 151.8 (CjH), 151.8 (CaH), 141.8 (C4'), 137.5 (C4H/C4'H), 137.0 (CcH), 135.9 (CbH), 127.7 (C5H/C5'H), 126.9 (CbH), 125.8 (CiH), 124.1 (C3H/C3'H), 123.4 (CdH), 123.1 (CgH), 123.0 (C3'H/C5'H). Selected IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{tpy}}$  3043 (m), 1600 (m), 1463 (m), 1421 (s), 1117 (s), 788 (s), 568 (m);  $\nu_{\text{Ru-Cl}}$  351 (w). UV/visible spectrum [ $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 239 (19670), 281 (19500), 290 (19240), 313 (18090), 488 (5810).

[Ru(tpy)(en)Cl][Cl] (**4<sub>Cl</sub>**). A total of 100.0 mg (0.227 mmol) of **P2**, 18.2  $\mu\text{L}$  (0.272 mmol) of en, 96.0 mg (2.264 mmol) of LiCl, and 94.7  $\mu\text{L}$  (0.679 mmol) of Et<sub>3</sub>N in 22 mL of ethanol/water afforded **4** as a dark-purple solid. Yield: 46.4 mg (44%). Anal. Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>Ru (465.34): C, 43.9; H, 4.12; N, 15.05. Found: C, 44.0; H, 4.18; N, 15.00. The synthesis of this complex has been reported previously, as an intermediate in the preparation of the aqua species [Ru(tpy)(en)(H<sub>2</sub>O)] [ClO<sub>4</sub>]<sub>2</sub>, with insufficient characterization.<sup>26</sup> Here, we described a slightly modified preparation, with unambiguous characterization of the product. Complex **4** is soluble in water, methanol, and ethanol and slightly soluble in acetone and nitromethane, whereas it is insoluble in chloroform and dichloromethane.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.92 (d, 2H,  $J = 5.5$  Hz, C6H/C6'H), 8.40 (d, 2H,  $J = 7.9$  Hz, C3H/C3'H), 8.36 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz, C3'H/C5'H), 8.00 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz, C4H/C4'H), 7.82 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz, C4'H), 7.68 (m, 2H, C5H/C5'H), 5.62 (t br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 3.24 (m

br, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2.62 (t br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 2.34 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ):  $\delta$  8.96 (d, 2H,  $J = 5.8$  Hz, C6H/C6'H), 8.41 (d, 2H,  $J = 7.6$  Hz, C3H/C3'H), 8.36 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, C3'H/C5'H), 8.02 (td, 2H,  $J = 7.8$  and 1.5 Hz, C4H/C4'H), 7.81 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz, C4'H), 7.69 (m, 2H, C5H/C5'H), 5.33 (s br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 3.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2.03 (s br, 2H, NH<sub>2</sub> en).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ):  $\delta$  161.8 (C2'/C6'), 161.6 (C2/C2''), 153.5 (C6H/C6'H), 137.4 (C4H/C4'H), 130.7 (C4'H), 128.2 (C5H/C5'H), 123.8 (C3H/C3'H), 122.4 (C3'H/C5'H), 46.9 (CH<sub>2</sub> en), 46.8 (CH<sub>2</sub> en). Selected IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{NH}}$  3233 (m), 3152 (m);  $\nu_{\text{tpy}}$  3055 (m), 2937 (m), 1616 (m), 1447 (s), 1116 (s), 767 (s), 619 (m);  $\nu_{\text{Ru-Cl}}$  309 (w). UV/visible spectrum [ $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 232 (20830), 274 (20151), 317 (28290), 368 (3800), 481 (4433), 539 (3524).

[Ru(tpy)(dach)Cl][Cl] (**5<sub>Cl</sub>**). A total of 50.0 mg (0.113 mmol) of **P2**, 16.3  $\mu\text{L}$  (0.136 mmol) of dach, 47.9 mg (1.130 mmol) of LiCl, and 47.0  $\mu\text{L}$  (0.339 mmol) of Et<sub>3</sub>N in 10 mL of ethanol/water (3:1) afforded **5** as a dark-purple solid. Yield: 41.2 mg (70%). Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>Ru (519.43): C, 48.6; H, 4.85; N, 13.48. Found: C, 48.8; H, 4.79; N, 13.52. Complex **5** is soluble in water, methanol, and ethanol and partially soluble in nitromethane, whereas it is insoluble in acetone, chloroform, and dichloromethane.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.97 (d, 1H,  $J = 5.3$  Hz, C6H), 8.88 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz, C6'H), 8.40 (t, 2H, C3H/C3'H), 8.36 (t, 2H,  $J = 8.1$  Hz, C3'H/C5'H), 8.00 (m, 2H, C4H/C4'H), 7.81 (t, 1H,  $J = 8.1$  Hz, C4'H), 7.68 (m, 2H, C5H/C5'H), 5.97 (dd, 1H,  $J = 11.9$  and 4.7 Hz, NH dach), 5.11 (t, 1H,  $J = 11.3$  Hz, NH dach), 2.76–2.52 (m, 3H, NH + CH + CH<sub>2</sub> dach), 2.34 (t, 1H,  $J = 10.7$  Hz, NH dach), 2.10–1.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1.83–1.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub> dach), 1.55 (d, 2H,  $J = 11.9$  Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1.24 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1.11 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 0.88 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ):  $\delta$  8.98 (d, 1H,  $J = 5.1$  Hz, C6H), 8.92 (d, 1H,  $J = 5.0$  Hz, C6'H), 8.41 (t, 2H,  $J = 9.3$  Hz, C3H/C3'H), 8.36 (dd, 2H,  $J = 9.5$  and 8.4 Hz, C3'H/C5'H), 8.01 (t, 2H,  $J = 7.8$  Hz, C4H/C4'H), 7.80 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz, C4'H), 7.67 (m br, 2H, C5H/C5'H), 5.64 (d br, 1H, NH dach), 4.81 (t, 1H,  $J = 12.2$  Hz, NH dach), 2.92 (m, 1H, CH dach), 2.68 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 2.31 (m, 1H, CH dach), 2.00 (partially overlapped with the H<sub>2</sub>O resonance, NH dach), 1.87–1.79 (m, 3H, 2  $\times$  CH<sub>2</sub> + NH dach), 1.68 (d br, 1H,  $J = 12.7$  Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1.59 (d br, 1H,  $J = 12.2$  Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1.34 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1.21 (m, 1H, CH<sub>2</sub> dach), 1.01 (ddd, 1H,  $J = 25.4$ , 12.6, and 3.7 Hz, CH<sub>2</sub> dach).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{NO}_2$ ):  $\delta$  161.78 (C2), 161.75 (C2''), 161.66 (C2'), 161.57 (C6'), 153.6 (C6H/6'H), 137.4 (C4H), 137.3 (C4'H), 130.6 (C4'H), 128.3 (C5H), 128.1 (C5'H), 123.8 (C3H), 123.7 (C3'H), 122.44 (C3'H), 122.36 (C5'H), 61.8 (CH dach), 61.7 (CH dach), 36.5 (CH<sub>2</sub> dach), 35.2 (CH<sub>2</sub> dach), 25.7 (CH<sub>2</sub> dach), 25.3 (CH<sub>2</sub> dach). Selected IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{NH}}$  3240 (m), 3141 (m);  $\nu_{\text{tpy}}$  2931 (s), 2856 (m), 1601 (s), 1446 (s), 1112 (m), 768 (s), 618 (m);  $\nu_{\text{Ru-Cl}}$  310 (w). UV/visible spectrum [ $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 233 (23896), 274 (23385), 318 (33757), 370 (4354), 493 (4660), 544 (4194).

**General Synthetic Procedure for [Ru(Cl-tpy)(N-N)(dmso-S)] [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**6<sub>OTf</sub>**–**8<sub>OTf</sub>**) and [Ru(tpy)(N-N)(dmso-S)] [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**9<sub>OTf</sub>** and **10<sub>OTf</sub>**). A weighed amount of [Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl][Cl] [N-N = en (**1<sub>Cl</sub>**), dach (**2<sub>Cl</sub>**), and bpy (**3<sub>Cl</sub>**)] was dissolved in a solution of methanol containing a great excess (ca. 35 equiv) of DMSO. After the addition of 2.1 equiv of AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, the reaction mixture was heated to reflux for 2 h in the dark. During this time, the color of the solution changed from violet (dark red for **8<sub>OTf</sub>**) to red-orange. At the end, AgCl was removed by filtration over Celite, and methanol was evaporated under reduced pressure. The oily residue was dissolved with ethanol, diethyl ether was added dropwise until saturation, and the solution was stored at 4 °C for 24–48 h, which induced formation of the corresponding product as a red-orange crystalline solid. The solid was collected by filtration, washed with cold ethanol/diethyl ether and diethyl ether, and vacuum-dried.**

The corresponding tpy complexes **9<sub>OTf</sub>** and **10<sub>OTf</sub>** were prepared with a similar procedure using **4<sub>Cl</sub>** and **5<sub>Cl</sub>**, respectively, as starting materials.

[Ru(Cl-tpy)(en)(dmso-S)] [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**6<sub>OTf</sub>**). A total of 25.0 mg (0.050 mmol) of **1<sub>Cl</sub>** and 27.0 mg (0.105 mmol) of AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> in a solution of 7 mL of methanol containing 125.0  $\mu\text{L}$  of DMSO afforded **6<sub>OTf</sub>** as red-

orange needles suitable for X-ray analysis. Yield: 33.4 mg (83%). Anal. Calcd for  $C_{21}H_{24}ClF_6N_5O_7RuS_3$  (805.15): C, 31.3; H, 3.00; N, 8.70. Found: C, 31.3; H, 3.03; N, 8.67. Complex **6**<sub>OTf</sub> is soluble in water, methanol, ethanol, acetone, and acetonitrile, whereas it is insoluble in chloroform and dichloromethane. <sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 9.23 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz, C6H/C6''H), 8.86 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8.81 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz, C3H/C3''H), 8.39 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, C4H/C4''H), 7.95 (t, 2H, C5H/C5''H), 5.62 (t br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 4.18 (t br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 3.37 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2.95 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> en), 2.52 (s, 6H, CH<sub>3</sub> dmsO-S). <sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 160.2 (C2'/C6'), 159.5 (C2/C2''), 154.9 (C6H/C6''H), 144.4 (C4'), 140.1 (C4H/C4''H), 129.8 (C5H/C5''H), 126.1 (C3H/C3''H), 124.5 (C3'H/C5'H), 46.6 (CH<sub>2</sub> en), 45.7 (CH<sub>2</sub> en), 43.3 (CH<sub>3</sub> dmsO-S). Selected IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3274 (m), 3191 (m), 3169 (m); ν<sub>tpy</sub> 3070 (m), 1598 (s), 1473 (m), 1425 (s), 1125 (s), 794 (s); ν<sub>S=O</sub> 1087 (s); ν<sub>OTf</sub> 1246 (vs), 1222 (vs), 1163 (vs), 1025 (vs); ν<sub>Ru-S</sub> 423 (s). UV/visible spectrum [H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub> nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 236 (45432), 273 (40473), 289 (45396), 329 (32826), 420 (8220).

[Ru(Cl-tpy)(dach)(dmsO-S)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**7**<sub>OTf</sub>). A total of 25.0 mg (0.045 mmol) of **2**<sub>Cl</sub> and 24.3 mg (0.095 mmol) of AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> in a solution of 6 mL of methanol containing 113.0 μL of DMSO afforded **7**<sub>OTf</sub> as red-orange plates. Yield: 34.5 mg (89%). Anal. Calcd for  $C_{25}H_{30}ClF_6N_5O_7RuS_3$  (859.24): C, 35.0; H, 3.52; N, 8.15. Found: C, 34.9; H, 3.59; N, 8.09. Complex **7**<sub>OTf</sub> is soluble in water, methanol, ethanol, acetone, and acetonitrile, whereas it is insoluble in chloroform and dichloromethane. <sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 9.32 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz, C6H), 9.17 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz, C6''H), 8.84 (s, 1H, C3'H), 8.83 (s, 1H, C5'H), 8.79 (dd, 2H, *J* = 7.9 and 4.6 Hz, C3H/C3''H), 8.37 (dd, 2H, *J* = 13.9 and 6.5 Hz, C4H/C4''H), 7.93 (dd, 2H, *J* = 12.6 and 6.3 Hz, C5H/C5''H), 5.79 (d br, 1H, *J* = 9.5 Hz, NH dach), 5.09 (t br, 1H, *J* = 11.9 Hz, NH dach), 4.27 (d br, 1H, *J* = 10.0 Hz, NH dach), 3.94 (t, 1H, *J* = 11.6 Hz, NH dach), 2.95 (m, 1H, CH dach), 2.65 (m, 1H, CH dach), 2.56 (d br, 1H, *J* = 13.4 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub> dmsO-S), 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub> dmsO-S), 1.83 (m br, 2H, CH<sub>2</sub> dach), 1.78 (d br, 1H, *J* = 15.3 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1.61 (d br, 1H, *J* = 12.2 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1.35–1.15 (m, 3H, CH<sub>2</sub> dach). <sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 160.4 (C2'), 160.1 (C6'), 159.7 (C2), 159.4 (C2''), 155.2 (C6''H), 155.0 (C6H), 144.3 (C4'), 140.1 (C4H), 140.1 (C4''H), 129.9 (C5''H), 129.8 (C5H), 126.10 (C3H), 126.09 (C3''H), 124.5 (C3'H), 124.4 (C5'H), 61.4 (CH dach), 60.3 (CH dach), 43.6 (CH<sub>3</sub> dmsO-S), 43.0 (CH<sub>3</sub> dmsO-S), 35.1 (CH<sub>2</sub> dach), 34.8 (CH<sub>2</sub> dach), 25.2 (CH<sub>2</sub> dach), 24.8 (CH<sub>2</sub> dach). Selected IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3263 (m), 3186 (m), 3169 (m); ν<sub>tpy</sub> 3059 (m), 2932 (m), 1595 (s), 1472 (w), 1426 (m), 1122 (s), 786 (s), 574 (m); ν<sub>S=O</sub> 1085 (s); ν<sub>OTf</sub> 1253 (vs), 1224 (vs), 1160 (vs), 1028 (vs); ν<sub>Ru-S</sub> 419 (s). UV/visible spectrum [H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub> nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 236 (40275), 273 (34830), 294 (39110), 329 (28820), 421 (8027).

[Ru(Cl-tpy)(bpy)(dmsO-S)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**8**<sub>OTf</sub>). A total of 25.0 mg (0.042 mmol) of **3**<sub>Cl</sub> and 22.6 mg (0.088 mmol) of AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> in a solution of 6 mL of methanol containing 105.0 μL of DMSO afforded **8**<sub>OTf</sub> as red-orange plates suitable for X-ray analysis. Yield: 32.9 mg (87%). Anal. Calcd for  $C_{29}H_{24}ClF_6N_5O_7RuS_3$  (901.24): C, 38.7; H, 2.68; N, 7.77. Found: C, 38.7; H, 2.69; N, 7.79. Complex **8**<sub>OTf</sub> is soluble in water, methanol, ethanol, acetone, and acetonitrile, whereas it is insoluble in chloroform and dichloromethane. <sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 10.31 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, CaH), 9.12 (s, 2H, C3'H/C5''H), 8.95 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, CdH), 8.88 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, C3H/C3''H), 8.75 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, CgH), 8.51 (td, 1H, *J* = 7.9 and 1.4 Hz, CcH), 8.30 (td, 2H, *J* = 7.9 and 1.4 Hz, C4H/C4''H), 8.17 (d, 2H, *J* = 5.4 Hz, C6H/C6''H), 8.15 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, CbH), 8.11 (td, 1H, *J* = 8.1 and 1.4 Hz, ChH), 7.66 (ddd, 2H, *J* = 7.5, 5.5, and 1.2 Hz, C5H/C5''H), 7.60 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, CjH), 7.38 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, CiH), 2.67 (s, 6H, CH<sub>3</sub> dmsO-S). <sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 159.3 (C2'/C6'), 157.8 (C2/C2''), 157.5 (Ce), 156.9 (Cf), 156.0 (CaH), 155.2 (C6H/C6''H), 150.2 (CjH), 147.2 (C4'), 140.7 (C4H/C4''H), 140.4 (ChH), 139.9 (CcH), 130.5 (C5H/C5''H), 128.9 (CbH), 128.6 (CiH), 127.1 (C3H/C3''H), 126.6 (C3'H/C5'H), 125.7 (CdH), 124.9 (CgH), 42.9 (CH<sub>3</sub> dmsO-S). Selected IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>tpy</sub> 3073 (m), 3012 (m), 2923 (m), 1598 (s), 1472 (w), 1424 (m), 1123 (s), 791 (m), 570 (m); ν<sub>S=O</sub> 1093 (s); ν<sub>OTf</sub> 1260 (vs), 1222 (s), 1145 (s),

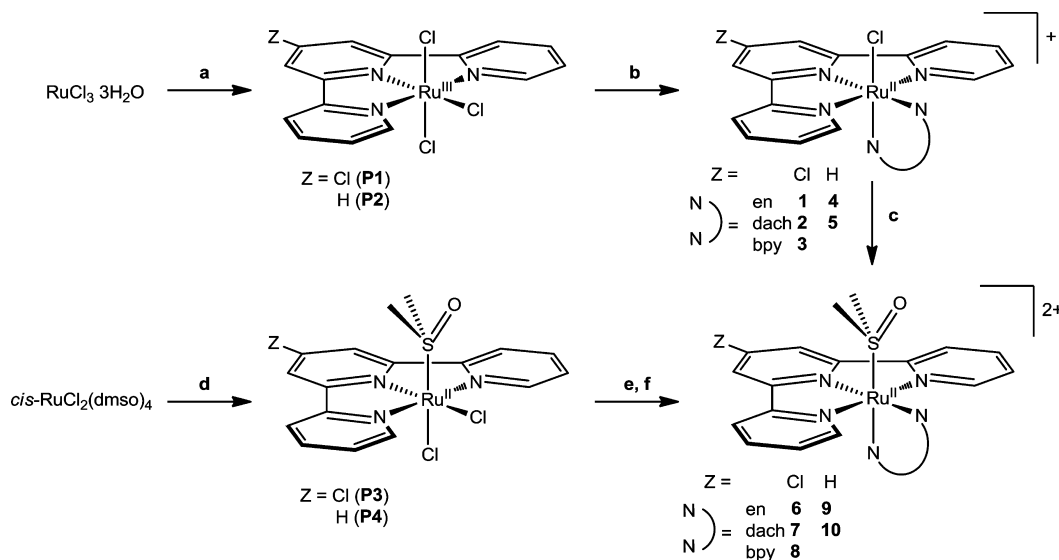
1028 (vs); ν<sub>Ru-S</sub> 430 (s). UV/visible spectrum [H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub> nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 236 (30530), 249 (27538), 274 (41680), 284 (39942), 314 (23230), 329 (26052), 405 (7996), 520 (428).

[Ru(tpy)(en)(dmsO-S)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**9**<sub>OTf</sub>). A total of 25.0 mg (0.054 mmol) of **4**<sub>Cl</sub> and 29.0 mg (0.113 mmol) of AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> in a solution of 6.5 mL of methanol containing 125.0 μL of DMSO afforded **9**<sub>OTf</sub> as red-orange needles. Yield: 36.1 mg (87%). Anal. Calcd for  $C_{21}H_{25}F_6N_5O_7RuS_3$  (770.71): C, 32.7; H, 3.27; N, 9.09. Found: C, 32.6; H, 3.23; N, 9.11. Complex **9**<sub>OTf</sub> is soluble in water, methanol, ethanol, acetone, and acetonitrile, whereas it is insoluble in chloroform and dichloromethane. <sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 9.22 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz, C6H/C6''H), 8.72 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, C3H/C3''H), 8.71 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, C3'H/C5''H), 8.34 (td, 2H, *J* = 8.0 and 1.5 Hz, C4H/C4''H), 8.32 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, C4'H), 7.90 (ddd, 2H, *J* = 7.4, 5.6, and 1.2 Hz, C5H/C5''H), 5.61 (m br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 4.20 (m br, 2H, NH<sub>2</sub> en), 3.36 (dt, 2H, *J* = 11.4 and 5.8 Hz, CH<sub>2</sub> en), 2.94 (dt, 2H, *J* = 11.0 and 5.6 Hz, CH<sub>2</sub> en), 2.52 (s, 6H, CH<sub>3</sub> dmsO-S). <sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 160.4 (C2/C2''), 159.2 (C2'/C6'), 154.9 (C6H/C6''H), 140.0 (C4H/C4''H), 137.4 (C4'H), 129.3 (C5H/C5''H), 125.5 (C3H/C3''H), 124.2 (C3'H/C5'H), 46.6 (CH<sub>2</sub> en), 45.7 (CH<sub>2</sub> en), 43.5 (CH<sub>3</sub> dmsO-S). Selected IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3243 (m), 3165 (m); ν<sub>tpy</sub> 3077 (m), 1603 (m), 1449 (m), 778 (s), 573 (s); ν<sub>S=O</sub> 1071 (m); ν<sub>OTf</sub> 1246 (vs), 1222 (vs), 1155 (vs), 1024 (vs); ν<sub>Ru-S</sub> 426 (s). UV/visible spectrum [H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub> nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 239 (33153), 272 (40851), 287 (46104), 330 (35481), 421 (8139).

[Ru(tpy)(dach)(dmsO-S)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (**10**<sub>OTf</sub>). A total of 25.0 mg (0.048 mmol) of **5**<sub>Cl</sub> and 26.0 mg (0.101 mmol) of AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> in a solution of 6 mL of methanol containing 120.0 μL of DMSO afforded **10**<sub>OTf</sub> as red-orange plates. Yield: 32.4 mg (82%). Anal. Calcd for  $C_{25}H_{31}F_6N_5O_7RuS_3$  (824.80): C, 36.4; H, 3.79; N, 8.49. Found: C, 36.3; H, 3.86; N, 8.52. Complex **10**<sub>OTf</sub> is soluble in water, methanol, ethanol, acetone, and acetonitrile, whereas it is insoluble in chloroform and dichloromethane. <sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 9.34 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, C6H), 9.20 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, C6''H), 8.74–8.61 (m, 4H, C3H/C3''H/C3'H/C5''H), 8.36–8.20 (m, 3H, C4H/C4''H/C4'H), 7.92–7.75 (m, 2H, C5H/C5''H), 5.85 (d, 1H, *J* = 10.8 Hz, NH dach), 5.04 (t, 1H, *J* = 11.2 Hz, NH dach), 4.35 (d, 1H, *J* = 10.7 Hz, NH dach), 3.93 (t, 1H, *J* = 11.6 Hz, NH dach), 2.90–2.82 (m, 1H, CH dach), 2.62–2.47 (m, 8H, CH dach + 2 × CH<sub>3</sub> dmsO-S + CH<sub>2</sub> dach), 1.89–1.70 (m, 3H, 3 × CH<sub>2</sub> dach), 1.60 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, CH<sub>2</sub> dach), 1.38–1.15 (m, 3H, 3 × CH<sub>2</sub> dach). <sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 160.0 (C2'), 159.9 (C2), 159.7 (C6'), 159.6 (C2''), 155.5 (C6''H), 155.1 (C6H), 139.8 (C4H/C4''H), 137.3 (C4'H), 129.3 (C5''H), 129.1 (C5H), 125.41 (C3H), 125.36 (C3''H), 124.1 (C3'H), 124.0 (C5'H), 61.6 (CH dach), 60.1 (CH dach), 44.0 (CH<sub>3</sub> dmsO-S), 43.9 (CH<sub>3</sub> dmsO-S), 35.1 (CH<sub>2</sub> dach), 34.7 (CH<sub>2</sub> dach), 25.3 (CH<sub>2</sub> dach), 24.9 (CH<sub>2</sub> dach). Selected IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>NH</sub> 3282 (m), 3240 (m), 3157 (m); ν<sub>tpy</sub> 2936 (m), 2878 (m), 1603 (m), 1445 (s), 774 (s), 572 (m); ν<sub>S=O</sub> 1100 (s); ν<sub>OTf</sub> 1251 (vs), 1220 (vs), 1161 (vs), 1022 (vs); ν<sub>Ru-S</sub> 429 (s). UV/visible spectrum [H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub> nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 239 (36975), 272 (43410), 296 (51957), 330 (38535), 418 (8337).

**X-ray Crystallography.** X-ray diffraction data for compounds **6**<sub>OTf</sub> and **8**<sub>OTf</sub> were collected at 150(2) K on an Oxford Diffraction SuperNova diffractometer equipped with mirror optics and an Atlas detector by using Mo and Cu microfocus X-ray sources, respectively. Intensity data for **3**<sub>Cl</sub> and **6**<sub>PF<sub>6</sub></sub> were carried out at the X-ray diffraction beamline of synchrotron Elettra (Trieste) at 100 K, with λ = 0.7000 and 0.88560 Å, respectively. Cell refinement, indexing, and scaling of the data sets were carried out using *CrysAlis Pro*, *Mosflm*, and *Scala*.<sup>27</sup> The structures were solved by direct methods implemented in *SIR92*<sup>28</sup> and refined by a full-matrix least-squares procedure based on *F*<sup>2</sup> using *SHELXL-97*.<sup>29</sup> All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. The hydrogen atoms were placed at calculated positions and treated using the appropriate riding models. The programs *Mercury*, *ORTEP*, *Platon*, and *Diamond Crystal* were used for data analysis and figure preparation.<sup>30</sup> Crystal data and details of refinement are given in Table S1 in the SI.

**Interactions with Nucleobases.** (a) 9MeG: NMR samples of complexes **1**–**3** (4 mM) were prepared in D<sub>2</sub>O. When hydrolysis of

Scheme 1. Synthetic Pathways for the Preparation of Complexes 1–10<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) Cl-tpy or tpy (0.9 equiv), EtOH, reflux; (b) N-N (1.2 equiv; N-N = en, dach, or bpy), ethanol/water (3:1), Et<sub>3</sub>N (3.0 equiv), LiCl (10.0 equiv), reflux; (c) DMSO (35 equiv), AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> (2.1 equiv), MeOH, reflux; (d) Cl-tpy or tpy (1.1 equiv), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (e) N-N (1.2 equiv; N-N = en, dach, or bpy), CHCl<sub>3</sub>/EtOH (2:3), reflux; (f) excess NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>.

the complex was completed, 1 equiv of solid 9MeG was added. (b) 5'-GMP: NMR samples of complexes 1–3 (10 mM) were prepared in D<sub>2</sub>O. When hydrolysis of the complex was completed, 1 equiv of solid 5'-GMP was added. (c) 5'-AMP: The pH of a solution of 5'-AMP in D<sub>2</sub>O (0.4 mL, 12.5 mM) was adjusted to ca. 7.00, and then a solution of **1a**q in D<sub>2</sub>O (0.1 mL, 50.0 mM) was added. (d) 5'-AMP/5'-GMP competition: an NMR sample containing a 1:1 mixture of 5'-AMP and 5'-GMP in D<sub>2</sub>O (0.4 mL, 12.5 mM) was prepared and the pH adjusted to ca. 7.00. To this sample was added a solution of **1a**q in D<sub>2</sub>O (0.1 mL, 50.0 mM).

**pH Titrations.** (a) Aqua species **1a**q–**3a**q: NMR samples of complexes 1–3 were prepared in a concentration of 4 mM in 10% D<sub>2</sub>O/90% H<sub>2</sub>O 24 h prior to titrations in order to ensure complete hydrolysis of the complexes. (b) Guanine adducts **11** and **12**: The NMR samples used to monitor formation of these adducts in D<sub>2</sub>O [i.e., **1** + 9MeG (4 mM, 1:1.3) for **11** and **1** + 5'-GMP (10 mM, 1:1) for **12**] were used for the titrations, performed 6 days after the mixing.

The pH values of the NMR samples were measured at 298 K directly in the NMR tube using an AMEL (model 334B) pH meter equipped with an Ingold microcombination electrode calibrated with Ingold buffer solutions at pH = 4.0, 7.0, and 10.0. The pH values were adjusted with diluted DClO<sub>4</sub> and NaOD solutions. No correction was applied for the effect of deuterium on the glass electrode.

**Calculation of pK<sub>a</sub> Values.** The pH titration curves were fitted to the Henderson–Hasselbalch equation using the program *Origin 8* with the assumption that the observed chemical shifts are weighted averages according to the populations of the protonated and deprotonated species.

**Kinetic Analysis.** The hydrolysis kinetics of complexes **1** and **2** were studied by UV/visible spectroscopy at 298 K. The samples (0.10 mM) were prepared in distilled water or in a buffer solution (25 mM Hepes buffer, pH = 7.4). The working wavelength of each reaction corresponded to that of a maximum change in absorption derived from the difference spectra. The absorbance at the selected wavelength was recorded at 30 s intervals, and the absorption/time data for each complex were computer-fitted to the first-order rate equation (eq 1), which gave the *k*<sub>H<sub>2</sub>O</sub> value (*k*) for each aquation process:

$$A = C_0 + C_1 e^{-kt} \quad (1)$$

*C*<sub>0</sub> and *C*<sub>1</sub> are computer-fitted constants, and *A* is the absorbance at time *t*.

The kinetics of the substitution reactions of complexes **1** and **2** with guanine derivatives (9MeG and 5'-GMP) were also studied spectrophotometrically. All kinetic measurements were performed under pseudo-first-order conditions (i.e., the concentration of the nucleophile was at least 10-fold that of the complex). The reactions were initiated by mixing a solution of each complex (0.3 mL, 1.00 mM) with 2.7 mL of a thermally equilibrated nucleophile solution (5.56 mM) in the UV/visible cuvette, and the reactions were followed for at least 8 half-lives. The observed pseudo-first-order rate constants, *k*<sub>obsd</sub>, represent an average value of two to three independent kinetic runs for each experimental condition. Reactions were studied at three different temperatures (298, 310, and 318 K) in 25 mM Hepes buffer containing 30 mM NaCl at pH = 7.40. The second-order rate constants *k*<sub>2</sub> for the substitution reactions with guanine derivatives were obtained directly from the slopes of *k*<sub>obsd</sub> plots versus the concentration of the nucleophile. All kinetic data were computer-fitted to the appropriate equation using the programs *Microsoft Excel 2007* and *Origin 8*.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Synthesis and Characterization of the Complexes.

Treatment of the neutral ruthenium(III) precursors *mer*-[Ru(L<sub>3</sub>)Cl<sub>3</sub>] [L<sub>3</sub> = Cl-tpy (**P1**) or tpy (**P2**)] with a neutral N-N chelating ligand, such as en, dach, or bpy, in the presence of Et<sub>3</sub>N as the reductant and an excess of LiCl, needed to prevent Cl<sup>−</sup> dissociation from the final products and necessary for their precipitation, afforded the cationic ruthenium(II) complexes [Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl][Cl] [N-N = en (**1**), dach (**2**), and bpy (**3**)] and [Ru(tpy)(N-N)Cl][Cl] [N-N = en (**4**) and dach (**5**)] in fair to very good yields (Scheme 1). The corresponding PF<sub>6</sub><sup>−</sup> salts were obtained by the addition of excess NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> to ethanol solutions of the chloride salts. The preparation of the corresponding dicationic derivatives *mer*-[Ru(L<sub>3</sub>)(N-N)(dmso-S)]<sub>2</sub>[Y]<sub>2</sub> (**6**–**10**; Y = PF<sub>6</sub> or CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), in which the Cl ligand is replaced by a dmso molecule, was performed by two alternative methods (Scheme 1): either by Cl/dmso replacement on the parent chlorido derivatives (assisted by the addition of AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) or by treatment of the ruthenium(II) precursors **P3** or **P4** with N-N in the presence of NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>. We found that with the second method



isolation of the product in pure form often requires purification steps that reduce the yield.

All new complexes were characterized by 1D ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) and 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC) NMR, IR, and UV spectroscopy and elemental analysis.

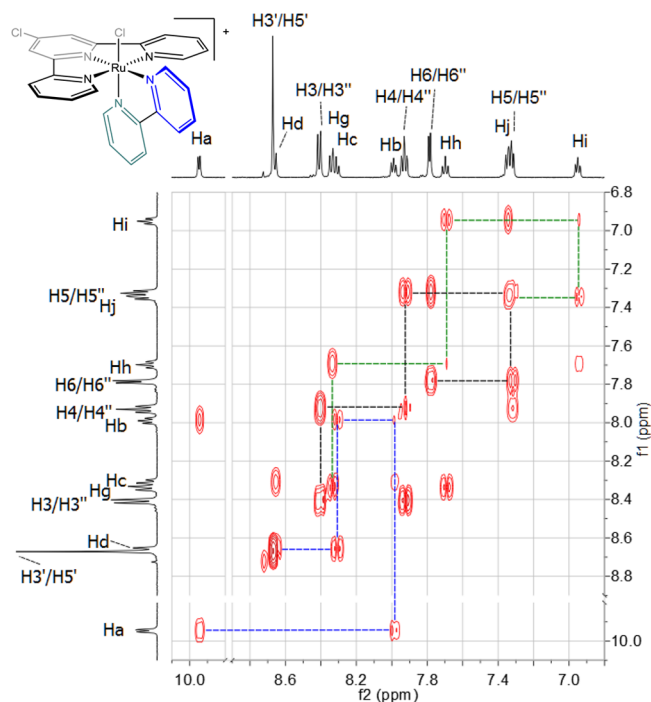
The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of **1** in  $\text{CD}_3\text{NO}_2$  are consistent with a  $C_s$  symmetry in solution due to the conformational mobility of the en backbone that averages it to a planar ligand. In the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, there are five aromatic resonances assigned to the equal halves of Cl-tpy and three resolved upfield multiplets attributed to the en ligand. The fourth, and most upfield, en resonance, which overlaps with the broad HOD peak and is evident in the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spectrum (Figure S1 in the SI) was assigned to the  $\text{NH}_2$  protons that fall into the shielding cone of the adjacent Cl-tpy ligand. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum displays eight resolved resonances in the downfield region for the aromatic carbon atoms and two, partially overlapped, upfield resonances assigned to the en carbon atoms. The assignment of the quaternary carbon atoms ( $\text{C}2'/\text{C}6'$ ,  $\text{C}2/\text{C}2''$ , and  $\text{C}4'$ ) was achieved by the long-range 2D heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR experiment (Figure S1 in the SI).

Conversely, the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of **2** in  $\text{CD}_3\text{NO}_2$  are more complicated due to the conformational rigidity of coordinated dach<sup>19c,31</sup> that removes the mirror plane bisecting the Cl-tpy ligand in **1**. Thus, in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, the resonances of the corresponding protons in the halves of Cl-tpy are partially overlapped except for H6/H6'' (two doublets at  $\delta$  8.98 and 8.93) and H3'/H5' (two doublets at  $\delta$  8.39 and 8.36), which are well-resolved (Figure S2 in the SI). Similarly, in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, each carbon atom of Cl-tpy and dach has a resolved resonance (Figure S2 in the SI).

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **3** in  $\text{D}_2\text{O}$  (where, unlike **1** and **2**, it is sufficiently stable) is consistent with the symmetry of the complex: five resonances attributed to the symmetric Cl-tpy ligand and eight multiplets assigned to the inequivalent halves of bpy (Figure 2). It is worth noting that each peak of the axial bpy ring is remarkably shifted upfield compared to that of the corresponding proton on the other ring [e.g.,  $\delta(\text{Hi})$  6.95 vs  $\delta(\text{Hb})$  7.99] due to the shielding effect of Cl-tpy. Correspondingly, the protons of the terminal aromatic rings of Cl-tpy are affected by the shielding cone of bpy, and their resonances are also remarkably upfield-shifted; in particular, the H6/H6'' protons resonate at  $\delta$  7.79, that is, ca.  $\delta$  1.00 more upfield compared to **1** and **2**.

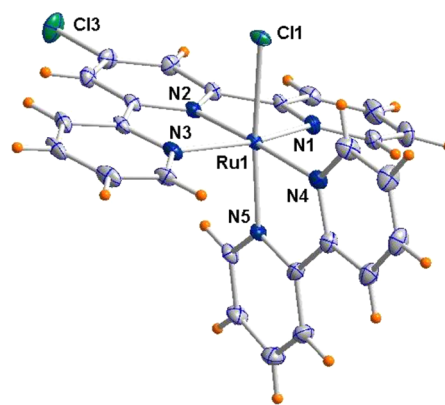
The  $^1\text{H}$  (Figure S3 in the SI) and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of **4** and **5** in  $\text{CD}_3\text{NO}_2$  are similar to those of **1** and **2**, respectively, with the expected differences due to the presence of a proton in position H4' instead of the chloride.

The  $^1\text{H}$  (and  $^{13}\text{C}$ ) NMR spectra of complexes **6**–**10**, in either  $\text{D}_2\text{O}$  or deuterated acetone, are very similar to those of the corresponding chlorido derivatives, with the obvious presence of the dms $\text{-}S$  resonance: a singlet in **6**, **8**, and **9** and two equally intense singlets for the diastereotopic methyl groups in the less symmetrical dach complexes **7** and **10** (Figure S4 in the SI). In all compounds, the dms $\text{-}S$  resonance is remarkably upfield-shifted ( $\delta$  2.50–2.55) compared to its typical chemical shift range (i.e., from  $\delta$  3.00 to 4.00) because the methyl groups fall into the shielding cone of the tpy aromatic rings. Interestingly, replacement of Cl by dms $\text{-}S$  induces a remarkable downfield shift ( $\Delta\delta \approx 1.30$ ) of the resonances of the axial  $\text{NH}_2$  protons of en and dach.



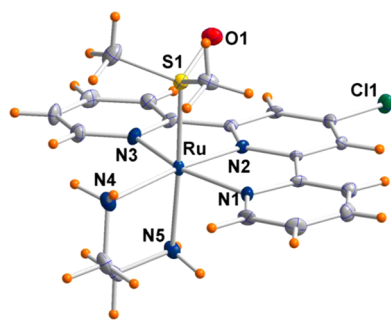
**Figure 2.** Downfield region of the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spectrum of  $3_{\text{Cl}}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  at 298 K (for the numbering scheme, see Figure 1).

The molecular structures of the cationic compound  $3_{\text{Cl}}$  (Figure 3) and of the dicationic complexes  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})-$

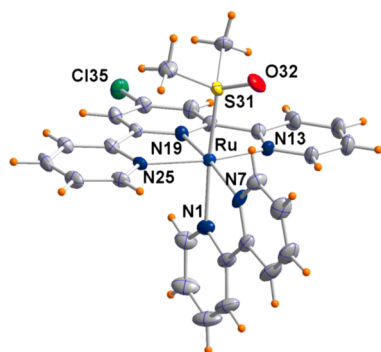


**Figure 3.** Molecular structure (ORTEP view; thermal ellipsoids at the 50% probability level) of one of the two independent cations of  $3_{\text{Cl}}$  with a heteroatom labeling scheme. Selected bond lengths (Å) and angles (deg) for the molecule shown: Ru1–N1 2.067(3), Ru1–N2 1.953(3), Ru1–N3 2.064(3), Ru1–N4 2.079(3), Ru1–N5 2.032(3), Ru1–Cl1 2.4205(9); N3–Ru1–N1 158.84(12), N2–Ru1–N4 177.28(12), N5–Ru1–Cl1 172.05(9). Selected bond lengths (Å) and angles (deg) for the molecule not shown: Ru2–N6 2.072(3), Ru2–N7 1.961(3), Ru2–N8 2.065(3), Ru2–N9 2.084(3), Ru2–N10 2.031(3), Ru2–Cl2 2.4162(9); N8–Ru2–N6 158.89(12), N7–Ru2–N9 176.53(12), N10–Ru2–Cl2 172.09(9).

(dms $\text{-}S$ )] $[\text{Y}]_2$  [ $\text{Y} = \text{PF}_6$  (**6** $_{\text{PF}_6}$ ), Figure 4;  $\text{Y} = \text{CF}_3\text{SO}_3$  (**6** $_{\text{OTf}}$ ), Figure S5 in the SI)] and **8** $_{\text{OTf}}$  (Figure 5) were determined in the solid state by X-ray crystallography. The structure of  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dach})(\text{dms}\text{-}S)][\text{PF}_6]_2$  (**10** $_{\text{PF}_6}$ ) was also confirmed by X-ray crystallography (Figure S6 in the SI); however, because of the low quality of the crystals, no crystal data are reported for this analysis. In all structures, the ruthenium ion displays the



**Figure 4.** Molecular structure (ORTEP view; thermal ellipsoids at the 50% probability level) of the cation of complex  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{dmsO-S})][\text{PF}_6]_2$  ( $6_{\text{PF}_6}$ ) with a heteroatom labeling scheme. Selected bond lengths ( $\text{\AA}$ ) and angles (deg): Ru–N1 2.087(3), Ru–N2 1.967(3), Ru–N3 2.092(3), Ru–N4 2.162(4), Ru–N5 2.146(3), Ru–S1 2.2453(11); N1–Ru–N3 159.17(15), N2–Ru–N4 171.94(13), N5–Ru–S1 177.30(9).



**Figure 5.** Molecular structure (ORTEP view; thermal ellipsoids at the 50% probability level) of the cation of complex  $8_{\text{OTf}}$  with a heteroatom labeling scheme. Selected bond lengths ( $\text{\AA}$ ) and angles (deg): Ru–N13 2.083(7), Ru–N19 1.971(7), Ru–N25 2.078(7), Ru–N1 2.097(7), Ru–N7 2.126(6), Ru–S31 2.268(2); N13–Ru1–N25 158.9(3), N7–Ru1–N19 170.1(3), N1–Ru1–S31 175.2(2).

typical distorted octahedral geometry with the tridentate Cl-tpy or tpy ligand coordinated with the expected meridional geometry, the N-N donor as the chelating ligand, and the sixth coordination site occupied either by a chloride ion (in  $3_{\text{Cl}}$ ) or by a dmsO molecule bonded through sulfur (in  $6$ ,  $8$ , and  $10$ ). The asymmetric unit of  $3_{\text{Cl}}$  comprises two crystallographically independent complex molecules having closely comparable geometry. Two crystallographically independent complex molecules that slightly differ in the orientation of the dmsO

molecule with respect to the equatorial plane of Cl-tpy were also found in the asymmetric unit of  $6_{\text{OTf}}$  (Figure S5 in the SI).

The complex cations of  $3_{\text{Cl}}$  and  $8_{\text{OTf}}$  show comparable structural features, with the central nitrogen atom of Cl-tpy having the shortest Ru–N distance (mean value 1.96  $\text{\AA}$ ), as expected because of the geometrical constraints of the tridentate ligand. In contrast, the Ru–N(Cl-tpy) bond distances in the trans position average to 2.071  $\text{\AA}$ . The coordination bond lengths of the pyridyl rings of bpy are influenced by the nature of the monodentate ligand (and thus by the total charge of the complex): the Ru–N(bpy) bond length trans to  $\text{Cl}^-$  is significantly shorter than that trans to dmsO-S [2.097(7) vs 2.031(3)  $\text{\AA}$ , mean value for the latter], and the same tendency is manifested also by the equatorial Ru–N(bpy) bond [2.126(6)  $\text{\AA}$  in  $8_{\text{OTf}}$  vs 2.082(3)  $\text{\AA}$  mean value in  $3_{\text{Cl}}$ ]. The planes of chelating Cl-tpy/bipy ligands are almost orthogonal, forming dihedral angles of 81.12(5) and 84.15(5) $^\circ$  in the two complexes of  $3_{\text{Cl}}$  and of 86.40(1) $^\circ$  in  $8_{\text{OTf}}$ . Overall, the geometrical features of  $3_{\text{Cl}}$  and  $8_{\text{OTf}}$  are comparable to those found in the corresponding tpy derivatives  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  and  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{dmsO-S})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ .<sup>32,33</sup>

In the en derivatives  $6_{\text{PF}_6}$  and  $6_{\text{OTf}}$  the cation presents a similar coordination environment with Ru–N(Cl-tpy) bond lengths comparable to those of the bpy compound  $8_{\text{OTf}}$ . Slightly longer Ru–N distances, typical for Ru–N<sub>sp<sup>3</sup></sub> bonds, are observed in the en ligand: 2.162(4) and 2.146(3)  $\text{\AA}$  in  $6_{\text{PF}_6}$  and in the range of 2.125(4)–2.148(4)  $\text{\AA}$  for the two independent cations of  $6_{\text{OTf}}$  with the shortest values being those located trans to dmsO-S. The Ru–S distances are sensibly longer in the case of  $8_{\text{OTf}}$  compared to  $6$  [e.g., 2.268(2)  $\text{\AA}$  in  $8_{\text{OTf}}$  vs 2.241(1)/2.238(1)  $\text{\AA}$  in  $6_{\text{OTf}}$ ]. This trend is consistent with dmsO-S being a moderate  $\pi$  acceptor and with en being a better  $\sigma$  donor than bpy (which, in addition, is also a  $\pi$  acceptor).

The solid-state IR spectra of all new complexes show the typical bands of the terpyridine ligands, with the most characteristic being a strong band in the region 1594–1616  $\text{cm}^{-1}$  assigned to  $\nu(\text{C}=\text{N})$  stretching.<sup>32</sup> All of the dicationic complexes ( $6$  –  $10$ ) display bands in the region 1106–1071  $\text{cm}^{-1}$ , typical for the S=O stretching of dmsO-S, and in the region 430–419  $\text{cm}^{-1}$ , assigned to the Ru–S<sub>dmsO</sub> stretching.<sup>24,33</sup> The presence of  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$  as a counterion is confirmed by two strong peaks at ca. 1250 and 1025  $\text{cm}^{-1}$  and two at ca. 1223 and 1163–1145  $\text{cm}^{-1}$  for the  $\text{SO}_3$  and  $\text{CF}_3$  stretching modes, respectively,<sup>19d,34</sup> and that of  $\text{PF}_6^-$  by the very strong peaks at 844–833  $\text{cm}^{-1}$  and at ca. 558  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>19c,35</sup>

The electronic absorption spectra of the new complexes exhibited several intense bands in the UV region ( $200 < \lambda <$

## Scheme 2. Chemical Behavior of Complexes 1–5 in Aqueous Solution

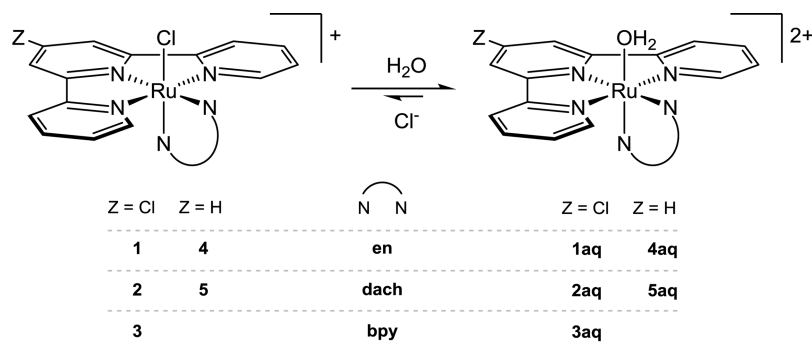


Table 1. Rate Constants for the Aquation and Half-lives at 298 K in Water and Buffer Solution for Compounds 1 and 2

compound	isosbestic points [nm]	water		buffer <sup>a</sup>	
		$k_{\text{H}_2\text{O}}$ [ $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ]	$(t_{1/2})_{\text{H}_2\text{O}}$ [min]	$k_{\text{H}_2\text{O}}$ [ $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ]	$(t_{1/2})_{\text{H}_2\text{O}}$ [min]
1	347, 416, 491	$2.52 \pm 0.01$	$4.58 \pm 0.03$	$2.82 \pm 0.01$	$4.10 \pm 0.03$
2	424, 500, 532, 557	$3.94 \pm 0.02$	$2.93 \pm 0.02$	$4.00 \pm 0.02$	$2.90 \pm 0.02$

<sup>a</sup>In 25 mM Hepes buffer, pH = 7.4.

330 nm), attributed to intraligand ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) charge-transfer transitions, and a broad intense band (with an unresolved shoulder in cases of 1–5) in the visible region attributed to metal-to-ligand  $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{polypyridyl})$  charge-transfer transitions.<sup>26,32a,b,36</sup> The absorption maximum of the latter band is strongly influenced by the charge: replacement of  $\text{Cl}^-$  by dmsu induces a blue shift from ca. 500 nm in 1–5 to ca. 420 nm in 6–10.<sup>24,33b,c</sup>

**Chemical Behavior in Aqueous Solution.** Contrary to what was previously observed for most polypyridylruthenium terpyridine compounds, our new complexes are well soluble in water (in particular, the chloride salts, >25 mg/mL), with the exception of the dicationic bpy compound 8 (both as  $\text{OTf}^-$  and as  $\text{PF}_6^-$  salt), which has limited solubility (ca. 5 mg/mL).

**NMR Investigation.** The behavior of the new complexes in aqueous solution, which is of great importance for compounds with potential antitumor activity, was first investigated qualitatively by NMR spectroscopy. The chloride ligand in the cationic compounds 1 and 2 turned out to be very labile in aqueous solution. Immediately after dissolution in  $\text{D}_2\text{O}$ , a new set of resonances was observed to grow both in the aromatic ( $\text{Cl-tpy}$  resonances) and in the upfield (en or dach resonances) regions of the  $^1\text{H}$  NMR spectra. These new resonances, which grew at the expense of those of the parent compound, were attributed to the aqua species  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(\text{OH}_2)]^{2+}$  (**1aq**) and  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(\text{OH}_2)]^{2+}$  (**2aq**), respectively (Scheme 2). In particular, according to integration, 40% of 1 is already aquated 2 min after dissolution, and the system reached equilibrium within ca. 1 h with a 1:9 ratio between 1 and **1aq** (Figure S7 in the SI). The addition of a large excess of NaCl (ca. 1.00 M) to this solution induced rapid reversion of the equilibrium toward the parent compound 1 and eventually to its partial precipitation (as a Cl salt). The chemical behavior in aqueous solution of the dach derivative 2, and of the corresponding tpy compounds 4 and 5, is similar to that described for 1.

Conversely, the bpy compound 3 releases the  $\text{Cl}^-$  ligand, yielding the aqua species  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  (**3aq**) at a much slower rate (even though eventually to a comparable extent). The equilibrium was, in fact, reached ca. 8 h after dissolution. The addition of a large excess of NaCl to the equilibrated solution induced rapid precipitation of the chlorido derivative 3.

The greater lability of the  $\text{Cl}^-$  ligand in compounds 1 and 2 is attributed to the stronger trans influence of the pure  $\sigma$ -donor ligands en and dach, respectively, compared to the (also)  $\pi$ -acceptor bpy in compound 3.

Contrary to that observed for the chlorido derivatives, the dicationic dmsu derivatives 6–10 are very stable in aqueous solution; their NMR spectra in  $\text{D}_2\text{O}$  remained unchanged for several hours after dissolution, and no release of dmsu was observed. This finding is consistent with a strong Ru–S bond (notwithstanding the 2+ charge) due to the presence of a good  $\sigma$ -donor ligand (en and dach) trans to dmsu.

**Kinetics of Aquation.** The kinetics of aquation of compounds 1 and 2 were quantitatively studied by UV/visible spectroscopy at 298 K on 0.1 mM solutions. From the NMR data, complexes 4 and 5 are expected to have similar kinetics, whereas compound 3 hydrolyzes the Cl ligand at a much slower rate. The rapid reversion of the equilibrium and the partial precipitation of the complexes upon the addition of NaCl prohibited anation kinetic studies and, therefore, calculation of the equilibrium constants  $K_{\text{aq}}$ .

The UV/visible spectra of both compounds show significant time-dependent changes in the region 200–800 nm (Figure S8 in the SI) with clean isosbestic points that, consistent with the NMR observation, suggest the occurrence of a single hydrolytic process (i.e., conversion of the initial chlorido complex into the corresponding aqua species **1aq** and **2aq**, respectively). The wavelength corresponding to the maximum change in absorption (Figure S8 in the SI, difference spectra) was selected for the kinetic studies (464 nm for 1 and 476 nm for 2). In each case, the time course of the absorbance followed first-order kinetics (Figure S9 in the SI), which afforded the rate constants  $k_{\text{H}_2\text{O}}$  listed in Table 1. The en complex 1 hydrolyzes about 1.5 times slower than the dach complex 2. Similar results were obtained when aquation of the complexes occurred in a buffer solution (25 mM Hepes buffer; pH = 7.4; Table 1 and Figure S9 in the SI). It is worth noting that the aquation rates of 1 and 2 are slightly faster than those of the anticancer active half-sandwich organometallic compounds  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{en})\text{-Cl}][\text{PF}_6]$  [ $(1.23\text{--}2.26) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ]<sup>37</sup> and ca. 2 orders of magnitude higher than those of the established anticancer drug cisplatin ( $6.32 \times 10^{-5}$  and  $2.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  for the first and second aquation processes, respectively).<sup>38</sup>

**$pK_a$  Determinations.** With the aim of assessing whether the complexes 1–3 are present as the aqua adducts or as the less reactive hydroxo species in physiological conditions (i.e., pH = 7.2–7.4), pH titrations were performed on the aqua species **1aq–3aq**. Their NMR spectra showed significant changes upon variation of the pH from 2 to 13. For each species, the resonance that showed the largest pH-dependent variation of the chemical shift was selected for analysis: the most upfield NH resonance for **1aq** and **2aq** and the singlet assigned to C3'H/C5'H for **3aq**. As the pH was increased, those peaks shifted upfield, as shown in Figure S10 in the SI. Analysis of the NMR titration curves gave  $pK_a$  values of  $10.50 \pm 0.03$ ,  $10.26 \pm 0.02$ , and  $9.56 \pm 0.01$  for species **1aq–3aq**, respectively (Figure S11 in the SI). The latter value is closely comparable to that reported for the corresponding tpy complex, i.e.,  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{OH}_2)]^{2+}$  ( $pK_a \approx 9.7$ ).<sup>36a</sup> It can be seen that deprotonation of the aqua ligand is influenced by the nature of the N–N chelating ligand: the presence of the aromatic bpy ligand makes the aqua ligand slightly more acidic, whereas replacement of en by dach has little influence. However, the obtained  $pK_a$  values clearly indicate that all complexes 1–3 are largely in the reactive aqua form once dissolved in a medium with physiological pH; only ca. 0.15% of **1aq** and **2aq** and ca.



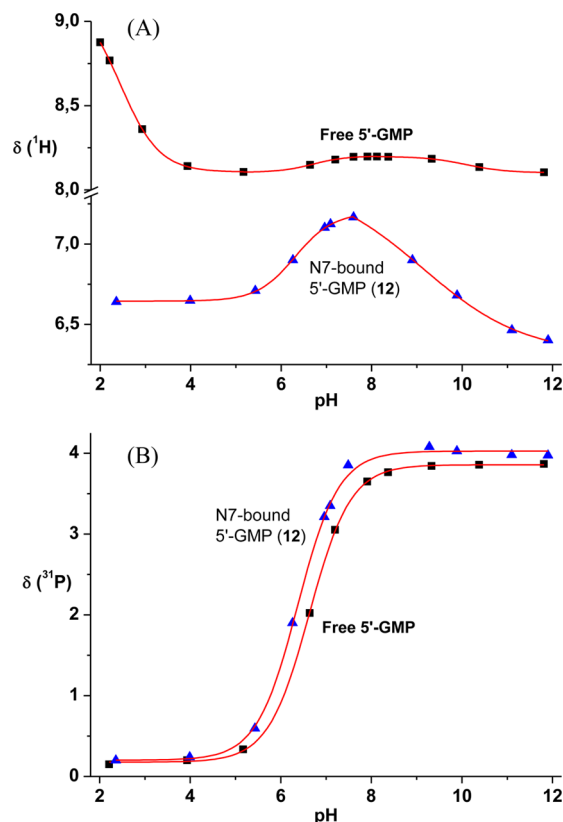
0.75% of **3aq** are calculated to be in the hydroxo form at pH = 7.4.

**Interaction with Guanine Derivatives.** The reactivity of compounds **1–3** toward two guanine derivatives, i.e., 9MeG and 5'-GMP, as model DNA bases, was investigated primarily by  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy in  $\text{D}_2\text{O}$  at ambient temperature (for the numbering scheme of 9MeG and 5'-GMP, see the corresponding figures in the SI). The assignment of selected resonances of the products is reported in Table S2 in the SI.

The addition of a slight excess of 9MeG (1.3 equiv) to an equilibrated solution of **1** (4 mM, pH = 7.78) in  $\text{D}_2\text{O}$  induced relatively fast changes in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Figure S12 in the SI). A new set of resonances attributed to the product  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(9\text{MeG-N7})]^{2+}$  (**11**) started to grow within minutes. Although binding of a ruthenium(II) center to N7 of purine moieties typically induces a downfield shift of the H8 resonance compared to the free ligand,<sup>16,20,39</sup> in our case, binding of **1** to N7 of 9MeG led to a remarkable upfield shift of the H8 singlet ( $\delta$  6.20 vs 7.77;  $\Delta\delta = -1.57$ ) because of the shielding effect of the adjacent Cl-tpy. A similar shift, even though less pronounced, was observed for the  $\text{CH}_3$  singlet ( $\delta$  3.18 vs 3.68). The same behavior was detected for all studied systems, either with 9MeG or 5'-GMP, and will not be commented on further. Quantitative formation of **11** occurred within ca. 3 h, and no spectral changes were observed afterward.

Similarly, the reaction of **1** with 5'-GMP (1:1, 10 mM,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH = 7.03) yielded quantitatively one final product that was identified by  $^1\text{H}$  (Figure S13 in the SI) and  $^{31}\text{P}$  (Figure S14 in the SI) NMR spectroscopy as the N7-bonded neutral species  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})(5'\text{-GMP-N7})]$  (**12**). The reaction is relatively fast, as indicated by the rapid appearance of the signals of **12** immediately after mixing; 100% conversion occurred within ca. 2 h, and no spectral changes were observed afterward. Interestingly, each Cl-tpy peak is split into two equally intense resonances (partially overlapped except for H6/H6''): the stereogenic center of coordinated 5'-GMP causes a loss of the symmetry plane that makes the halves of Cl-tpy equivalent in **1** (and in **1aq**). In the  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum, consistent with the  $^1\text{H}$  NMR findings, only a new singlet grew during the reaction time and was assigned to **12** (Figure S14 in the SI). Indeed, the new resonance is slightly shifted to higher frequency ( $\delta$  3.31) compared to that of free 5'-GMP ( $\delta$  2.99), which is typical for N7 binding.<sup>16,20</sup> It is worth noting that no transient intermediates, such as those reported for the half-sandwich active compounds (e.g., oxygen binding to the phosphate group of 5'-GMP),<sup>16,20</sup> were detected.

To verify the identity of products **11** and **12**, i.e., that binding of guanine derivatives on the  $\{\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\}^{2+}$  fragment occurs through N7, pH titrations were carried out on the solutions after the accomplishment of each reaction and, for comparison, on equimolar solutions of the free nucleobases. The pH dependence was monitored by the shift of the H8 singlet in the  $^1\text{H}$  NMR spectra and by the  $\text{PO}_3\text{H}$  resonance in  $^{31}\text{P}$  NMR spectra, which are particularly sensitive to protonation of N7 and deprotonation of the phosphate group, respectively. The  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR titration curves are shown in Figure 6 and Figure S15 in the SI; the  $\text{pK}_a$  values, determined by computer fits of the Henderson–Hasselbalch equation, are reported in Table 2. Two  $\text{pK}_a$  values were determined for free 9MeG, 9.90 and 2.88, attributable to deprotonation of N1H and protonation of N7, respectively, whereas three values were obtained in the case of free 5'-GMP,



**Figure 6.** Plots of the pH dependence of the H8 (A) and phosphate (B) NMR resonances for free 5'-GMP (■) and **12** (▲) at ambient temperature. The curves are computer-fitted (red lines), yielding the  $\text{pK}_a$  values listed in Table 2.

**Table 2.**  $\text{pK}_a$  Values for 9MeG and 5'-GMP and Their  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})]^{2+}$  Adducts at Ambient Temperature

species	group	$\text{pK}_a$ ( $^1\text{H}$ )	$\text{pK}_a$ ( $^{31}\text{P}$ )
9MeG	N7	2.88 ± 0.10	
	N1H	9.90 ± 0.26	
<b>11</b>	N1H	9.47 ± 0.10	
	N7	2.44 ± 0.04	
5'-GMP	-OP <sub>3</sub> H	6.71 ± 0.04	6.63 ± 0.01
	N1H	10.09 ± 0.02	
	N7	6.31 ± 0.02	6.37 ± 0.03
<b>12</b>	-OP <sub>3</sub> H	6.31 ± 0.02	6.37 ± 0.03
	N1H	9.12 ± 0.15	

10.09, 6.71, and 2.44, attributable to deprotonation of N1H and  $\text{PO}_3\text{H}$  and protonation of N7, respectively. Our experimental values are closely comparable with those determined by others.<sup>40</sup> From the titration curves, it can be seen that compound **11** undergoes deprotonation of N1H ( $\text{pK}_a$  of 9.47) but no protonation of N7 (Figure S15 in the SI). Similarly, complex **12** undergoes deprotonation only of  $\text{PO}_3\text{H}$  ( $\text{pK}_a$  of 6.31) and N1H ( $\text{pK}_a$  of 9.12) (Figure 6). These observations provide clear evidence that the guanine derivatives bind to the ruthenium center through N7.

Similar results were obtained with  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}]^+$  (**2**), with quantitative formation of  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(9\text{MeG-N7})]^{2+}$  (**13**) in ca. 2 h (Figure S16 in the SI) and of  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})(5'\text{-GMP-N7})]^{2+}$  (**14**) in ca. 1 h (Figure S17 in the SI). Compound **14**, due to the conformational rigidity of coordinated dach and to the stereogenic center on 5'-GMP, is obtained as a pair of two equally abundant diastereomers

(Figure S18 in the SI). Many proton resonances are partially overlapped, but two resolved singlets for H8 ( $\delta$  6.57 and 6.54) and four doublets for H6/H6'' ( $\delta$  9.08, 9.03, 8.93, and 8.88) were clearly observed. When the reaction leading to **14** was monitored by  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy, only one new peak ( $\delta$  3.37) was detected, even though, in principle, two singlets would be expected for the two diastereomers (Figure S19 in the SI). We speculate that their chemical shifts are too close to be resolved, consistent with the  $\text{PO}_3\text{H}$  group being far from the stereogenic centers.

Contrary to **1** and **2**, the reaction of  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  (**3**) (1:1, 4 mM, pH = 6.87) with 9MeG is very slow: a new set of resonances, attributable to  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(9\text{MeG-N7})]^{2+}$  (**15**), became apparent in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum within the first hours. The system reached equilibrium after ca. 5 days, with ca. 45% of 9MeG bound to ruthenium (i.e., **15**), 50% of **3aq**, and 5% of **3** (Figure S20 in the SI).

The reaction of **3** with 5'-GMP (1:1, 10 mM, pH = 7.23) is also very slow compared to those of **1** and **2**. More specifically, 20 min after the addition of 5'-GMP to an equilibrated solution of **3** the growth of a new set of resonances, assignable to  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(5'\text{-GMP-N7})]^{2+}$  (**16**), was observed in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Figure S21 in the SI). The system reached equilibrium after ca. 24 h, and the distribution of the species was ca. 40% of **16**, 47% of **3aq**, and 13% as **3**. Consistent with the  $^1\text{H}$  NMR data, only one new peak ( $\delta$  3.45) was detected in the  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum during the time course of the reaction.

The above NMR evidence clearly shows that complexes **1** and **2**, with an aliphatic diamine as the chelating ligand, react with 9MeG and 5'-GMP much faster compared to the bpy complex **3**. In addition, the reactions of **1** and **2** with the model bases are quantitative, whereas those of **3** are not. The fact that  $\text{Ru}^{\text{II}}$ -tpy complexes with pyridyl ligands are rather sluggish in their reactions toward model DNA bases has also been observed previously. For example, the partial reaction of  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{Me}_2\text{bpy})\text{Cl}]^+$  with 5'-GMP required ca. 4 h at 310 K, and only 20% of  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{apy})(9\text{EtG-N7})]^{2+}$  (9EtG = 9-ethylguanine) is formed after 5 h at 310 K when  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{apy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  is treated with 9EtG.<sup>11,13a</sup>

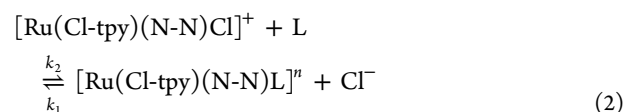
**Interaction of  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}]^+$  (**1**) with 5'-AMP and Competitive Reaction with a Mixture of 5'-AMP and 5'-GMP.** To investigate the binding preference of the new complexes toward nucleobases, we studied the interaction of **1** with an adenosine derivative, i.e., 5'-AMP, as well as the reaction of **1** with 5'-GMP in competition with 5'-AMP. These reactions were investigated by  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy in  $\text{D}_2\text{O}$  at ambient temperature (for the numbering scheme of 5'-AMP, see Figure S22 in the SI).

The addition of an equilibrated solution of **1** to a solution of 5'-AMP ( $C_{\text{final}} = 10$  mM, 1:1,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH = 7.00) gave rise to rapid, but relatively minor, changes in the NMR spectrum (Figure S22 in the SI). Many new resonances appeared immediately after mixing, and an equilibrium was reached within 1 h. Overall, according to integration, less than 10% of the reactants were transformed into the new species. No assignment of the new resonances was attempted. The  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum, consistent with the  $^1\text{H}$  NMR data, showed the formation of new minor species, as indicated by the broadening, due to the partial overlap of the new resonances, of the peak of free 5'-AMP ( $\delta$  3.04). These results clearly indicate that **1** has a minor affinity for 5'-AMP. Indeed, in a competition reaction with a 1:1 mixture of 5'-AMP and 5'-GMP, complex **1** showed a large preference toward 5'-GMP. More specifically, the

exclusive formation of **12** was observed within the first hours after the addition of **1aq** to a solution containing equimolar amounts of both 5'-AMP and 5'-GMP ( $C_{\text{final}} = 10$  mM, 1:1,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH = 7.07), as evidenced by  $^1\text{H}$  (Figure S23 in the SI) and  $^{31}\text{P}$  (Figure S24 in the SI) NMR spectroscopy.

**UV/Visible Studies of the Reaction of Compounds **1** and **2** with Guanine Derivatives.** The kinetics of the reactions of complexes **1** and **2** with 9MeG and 5'-GMP were determined spectrophotometrically (Figure S25 in the SI) by following the change in absorbance at selected wavelengths, corresponding to the maximum change (Figure S26 in the SI, difference spectra), as a function of time. All kinetic experiments were performed under pseudo-first-order conditions with respect to the nucleophile. To suppress spontaneous hydrolysis of the chloride from ruthenium, experiments were performed in the presence of 30 mM NaCl. This value was determined prior to kinetic measurements as the minimum chloride concentration for which no spectral changes were observed (Figure S27 in the SI).

The substitution reactions of complexes **1** and **2** with guanine derivatives can be represented by eq 2



where N-N = en or dach, L = 9MeG or 5'-GMP, and  $n = +2$  or 0 depending the charge of the entering ligand.

Here,  $k_2$  is the second-order rate constant for the forward reaction, involving the direct attack of the nucleophile L, and  $k_1$  is the rate constant for the reverse reaction. The second-order rate constants  $k_2$  are obtained directly from the slopes of the plots of  $k_{\text{obsd}}$  versus the concentration of entering nucleophile, whereas the  $k_1$  values are derived from the intercepts divided by

**Table 3.** Rate Constants and Activation Parameters for the Substitution Reactions between Complexes **1** and **2** with 5'-GMP and 9MeG (25 mM Hepes Buffer, 30 mM NaCl, pH = 7.4)

	<i>T</i> [K]	$k_2$ [ $\times 10^{-1}$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$k_1$ [ $\times 10^{-3}$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$\Delta H_2^\ddagger$ [kJ $\text{mol}^{-1}$ ]	$\Delta S_2^\ddagger$ [J $\text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ]
<b>1</b>					
5'-GMP	298	$1.5 \pm 0.1$	$4.9 \pm 0.9$	$69 \pm 3$	$-45 \pm 10$
	310	$4.7 \pm 0.3$	$16.0 \pm 3.0$		
	318	$8.8 \pm 0.2$	$30.0 \pm 2.0$		
9MeG	310	$1.3 \pm 0.1$	$4.1 \pm 0.8$		
<b>2</b>					
5'-GMP	298	$3.3 \pm 0.2$	$1.8 \pm 0.2$	$51 \pm 3$	$-101 \pm 9$
	310	$7.1 \pm 0.2$	$3.0 \pm 0.2$		
	318	$12.6 \pm 0.6$	$4.7 \pm 0.7$		
9MeG	310	$3.1 \pm 0.2$	$10.0 \pm 2.0$		

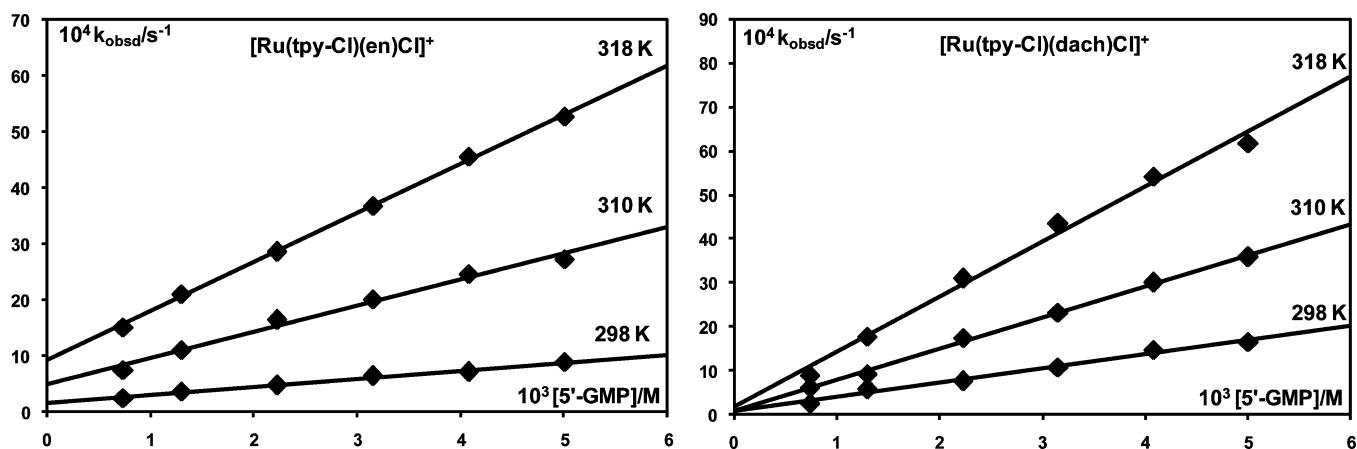
$[\text{Cl}^-]$  (i.e., 30 mM). Their values are listed in Table 3. The rate of the reaction is described by eqs 3 and 4.

$$-\frac{d[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}]^+}{dt} = k_{\text{obsd}}[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}]^+ \quad (3)$$

$$k_{\text{obsd}} = k_1[\text{Cl}^-] + k_2[\text{L}] \quad (4)$$

All kinetic runs could be fitted by a single-exponential function, and no subsequent reaction was observed. Each pseudo-first-





**Figure 7.** Pseudo-first-order rate constants,  $k_{\text{obsd}}$ , as a function of the ligand concentration and temperature for the substitution reactions of **1** (left) and **2** (right) with  $5'\text{-GMP}$  in 25 mM Hepes buffer (30 mM NaCl, pH = 7.4).

order rate constant,  $k_{\text{obsd}}$ , was calculated as the average value of two or three independent runs (Tables S3–S6 in the SI).

The experimental results for the substitution reactions of the two complexes with  $9\text{MeG}$  and  $5'\text{-GMP}$  (at three different temperatures) are shown in Figure S28 in the SI and Figure 7, respectively. A linear dependence on the nucleophile concentration was observed for all reactions. The activation parameters ( $\Delta H^\ddagger$  and  $\Delta S^\ddagger$ ), obtained from the Eyring plots, are summarized in Table 3. The small values of  $\Delta H^\ddagger$  and negative values of  $\Delta S^\ddagger$  clearly support the associative mechanism for the substitution process. Similar mechanisms have been proposed for the substitution reactions of organometallic ruthenium arene complexes and of half-sandwich Ru-[9]aneS3 coordination compounds studied in our previous work with biologically relevant ligands, e.g.,  $9\text{MeG}$ , guanosine (Guo),  $5'\text{-GMP}$ , *L*-histidine (*L*-His).<sup>20,41</sup>

It can be seen that the rate constants depend on the nature of the chelating ligand and on the charge of the entering ligand: complex **2** reacts from 1.5 to 2.5 times faster than complex **1**, and the reactions with  $5'\text{-GMP}$  occur 2.3–3.7 times faster than with  $9\text{MeG}$  (Table 3), most likely because it has more favorable electrostatic interactions with the cationic complexes. For comparison, the half-sandwich ruthenium(II) coordination compounds with the general formula  $[\text{Ru}([9]\text{aneS3})(\text{N-N})\text{Cl}][\text{PF}_6]$  have  $k_2$  values that are ca. from 1.2 to 4 times smaller than those of **1** and **2** for the reaction with  $5'\text{-GMP}$  under the same conditions.<sup>20</sup>

## CONCLUSIONS

Whereas monofunctional ruthenium(II) complexes of the type  $[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{N-N})\text{X}]^n$  with facial geometry have been widely investigated for their antitumor activity and some structure–activity relationship rules are already established, those with a meridional geometry are almost neglected. The typical tridentate ligand selected for imposing the meridional geometry to the complex is tpy. In most of the  $\text{Ru}^{\text{II}}$ -tpy compounds reported so far in the literature, also N-N is a polypyridyl ligand (e.g., bpy): as a consequence, the complexes typically suffer from low solubility in aqueous media, limiting biologically relevant investigations. With the aim of contrasting this tendency, we described here the synthesis and structural characterization of a series of new water-soluble, monofunctional ruthenium(II) complexes with meridional geometry of the general formula *mer*- $[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{N-N})\text{X}][\text{Y}]_n$  (where  $\text{L}_3 = \text{Cl}$ -

tpy or tpy; N-N = en, dach, or bpy; X = Cl or dmsO-S; Y = Cl,  $\text{PF}_6$ , or  $\text{CF}_3\text{SO}_3$ ;  $n = 1$  or 2, depending on the nature of X). The chelating ligands en and dach were selected for improving the solubility in water of their complexes and for their capability of forming hydrogen bonds with coordinated nucleobases. This latter property appears as a prerequisite for observing antitumor activity in monofunctional half-sandwich ruthenium(II) compounds. For comparative purposes, the aromatic N-N-donor bpy ligand was also used. With the exception of  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})(\text{dmsO-S})][\text{Y}]_2$  (**8**, Y =  $\text{CF}_3\text{SO}_3$  or  $\text{PF}_6$ ), all new complexes are well-soluble in water (>25 mg/mL). Studies on the chemical behavior of the new complexes in aqueous solution, monitored by NMR spectroscopy, showed that the chlorido derivatives **1–5** release the  $\text{Cl}^-$  ligand to form the corresponding aqua species. Whereas the rate of hydrolysis was found to depend markedly on the nature of the chelating ligand (minutes for en and dach and hours for bpy), its extent was similar in all cases, with a ca. 1:9 ratio between intact and aquated species at equilibrium. On the other hand, the dicationic dmsO derivatives **6–10** were found to be very stable in water; no release of dmsO was detected even after several hours of observation. No significant difference was observed between the corresponding tpy and Cl-tpy compounds.

Because DNA is considered to be a potential biological target for metal-based antitumor agents, we investigated the reactivity of **1–3** toward the guanine model compounds  $9\text{MeG}$  and  $5'\text{-GMP}$ . All three complexes bind selectively to N7 of  $9\text{MeG}$  and  $5'\text{-GMP}$  but with rates and extents that depend strongly on the nature of the chelating ligand: compounds **1** and **2**, which have an aliphatic diamine as the chelating ligand, react much faster (minutes to hours) compared to the bpy complex **3** (days). In addition, the reactions of **1** and **2** are quantitative, whereas those of **3** are not. In no case were intermediates observed. In addition, we established that complex **1** has selectivity for  $5'\text{-GMP}$  when competing with  $5'\text{-AMP}$ . Not surprisingly, the nature of the bidentate ligand N-N is very relevant in affecting the reactivity of the meridional complexes, since it is trans to the unique reactive coordination position. According to our results, the complexes with the bidentate aliphatic diamines en and dach proved to be clearly superior to those with bpy in terms of solubility and reactivity (i.e., release of Cl and capability to bind guanine derivatives).

Therefore, complexes **1** and **2**, and the similar **4** and **5**, are promising antitumor candidates. In vitro biological evaluation

of their activity is currently underway, and the results will be reported elsewhere.

Given the premise that the relatively rapid availability of one coordination position on the ruthenium center of monofunctional compounds is apparently an essential, even though not unique, requirement for observing anticancer activity, the dmsO derivatives **6–10** could be considered as inactive. However, a number of inert and coordinatively saturated metal complexes, i.e., compounds that are unable to bind coordinatively to biological targets (*structural compounds*),<sup>6</sup> were shown to display biological activity.<sup>42</sup> Therefore, investigation toward this direction might be of interest.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ■ Supporting Information

Crystallographic data for **3<sub>Cl</sub>**, **6<sub>PF<sub>6</sub></sub>**, **6<sub>OTf</sub>** and **8<sub>OTf</sub>** in CIF format, ORTEP drawing of **6<sub>OTf</sub>** molecular structure from low-quality crystal of **10<sub>PF<sub>6</sub></sub>**, synthetic procedures for complexes **P1**, **P3**, **1<sub>PF<sub>6</sub></sub>**, **2<sub>PF<sub>6</sub></sub>**, **4<sub>PF<sub>6</sub></sub>**, and **6<sub>PF<sub>6</sub></sub>**–**10<sub>PF<sub>6</sub></sub>**, NMR spectra of **1**, **2**, **4**, and **5** in CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, <sup>1</sup>H NMR spectra of **6–10** in D<sub>2</sub>O, time evolution of the <sup>1</sup>H NMR spectrum of **1** in D<sub>2</sub>O, time evolution of the UV/visible and UV/visible difference spectra of **1** and **2** in water, time dependence of the absorbance for the aquation of **1** and **2** in water or in buffer, NMR pH titrations for **1aq–3aq**, <sup>1</sup>H NMR spectra monitoring the interactions of **1–3** with 9MeG and 5'-GMP, <sup>31</sup>P NMR spectra monitoring the interaction of **1** with 5'-GMP, <sup>31</sup>P NMR spectra of **14** after 1 h, <sup>1</sup>H NMR spectra monitoring the interaction of **1** with 5'-AMP, <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR spectra monitoring the competition reaction of **1** with 5'-AMP and 5'-GMP, pH dependence of the H8 <sup>1</sup>H NMR resonance for free 9MeG and for **11**, scheme of conformational isomers of **14**, time evolution of the UV/visible and UV/visible difference spectra of the interaction of **1** and **2** with 9MeG and 5'-GMP, Change of the absorbance at 401 nm of **1** versus [Cl<sup>-</sup>], pseudo-first-order rate constants, *k*<sub>obsd</sub>, versus [9MeG] for the substitution reactions of **1** and **2** with 9MeG; observed pseudo-first-order rate constants versus [L] and *T* for the substitution reactions of **1** and **2** with 9MeG and 5'-GMP, assignments of selected <sup>1</sup>H resonances ( $\delta$ ) for the aqua species **1aq–3aq** and for complexes **11–16**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. CCDC 985412 (**8<sub>OTf</sub>**), 985413 (**6<sub>OTf</sub>**), 988761 (**6<sub>PF<sub>6</sub></sub>**), and 988762 (**3<sub>Cl</sub>**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge at [www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html](http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html) [or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, U.K.; fax (international) +44-1223/336-033; e-mail [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk)].

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*E-mail: [bratsos@chem.demokritos.gr](mailto:bratsos@chem.demokritos.gr).

\*E-mail: [alessi@units.it](mailto:alessi@units.it).

### Present Address

<sup>§</sup>I.N.N.: Department of Physical Chemistry, NCSR “Demokritos”, 15310 Ag. Paraskevi, Athens, Greece.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was performed within the frame of COST Action CM1105. Fondazione Beneficentia Stiftung, the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project 172011), and the Slovenian Research Agency (Project J1-4131) are gratefully acknowledged for financial support. A.R. is grateful to the bilateral Italian–Serbian project “C.S.I.U.T.” for a research fellowship at the University of Trieste, and J.K. thanks the Slovenian Research Agency for a junior researcher grant. The EN→FIST Centre of Excellence, Ljubljana, Slovenia, is acknowledged for use of the SuperNova diffractometer.

## ■ REFERENCES

- (1) Alessio, E. *Bioinorganic Medicinal Chemistry*; Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2011.
- (2) Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. *Chem. Biodiversity* **2008**, *5*, 2140–2155.
- (3) Rademaker-Lakhai, J. M.; van den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3717–3727.
- (4) Gill, M. R.; Thomas, J. A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3179–3192.
- (5) Brabec, V.; Nováková, O. *Drug Resist. Updates* **2006**, *9*, 111–122.
- (6) Gianferrara, T.; Bratsos, I.; Alessio, E. *Dalton Trans.* **2009**, 7588–7598.
- (7) Novakova, O.; Kasparkova, J.; Vrana, O.; van Vliet, P. M.; Reedijk, J.; Brabec, V. *Biochemistry* **1995**, *34*, 12369–12378.
- (8) Velders, A. H.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Haasnoot, J. G.; De Vos, D.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 2966–2967.
- (9) van Vliet, P. M.; Toekimin, S. M. S.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J.; Nováková, O.; Vrána, O.; Brabec, V. *Inorg. Chim. Acta* **1995**, *231*, 57–64.
- (10) (a) Grover, N.; Gupta, N.; Thorp, H. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3390–3393. (b) Neyhart, G. A.; Grover, N.; Smith, S. R.; Kalsbeck, W. A.; Fairley, T. A.; Cory, M.; Thorp, H. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4423–4428.
- (11) Mulyana, Y.; Collins, G.; Keene, R. J. *Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2011**, *71*, 371–379.
- (12) Cheng, C. C.; Lee, W. L.; Su, J. G.; Liu, C. L. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei, Taiwan)* **2000**, *47*, 213–220.
- (13) (a) Corral, E.; Hotze, A. C. G.; Magistrato, A.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6715–6722. (b) Corral, E.; Hotze, A. C. G.; Den Dulk, H.; Leczkowska, A.; Rodger, A.; Hannon, M. J.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 439–448.
- (14) (a) Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3–25. (b) Süß-Fink, G. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 1673–1688.
- (15) (a) Aird, R. E.; Cummings, J.; Ritchie, A. A.; Muir, M.; Morris, R. E.; Chen, H.; Sadler, P. J.; Jodrell, D. I. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 1652–1657. (b) Peacock, A. F. A.; Sadler, P. J. *Chem.—Asian J.* **2008**, *3*, 1890–1899. (c) Yan, Y. K.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. *Chem. Commun.* **2005**, 4764–4776.
- (16) Chen, H.; Parkinson, J. A.; Morris, R. E.; Sadler, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 173–186.
- (17) Chen, H.; Parkinson, J. A.; Parsons, S.; Coxall, R. A.; Gould, R. O.; Sadler, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3064–3082.
- (18) Chen, H.; Parkinson, J. A.; Nováková, O.; Bella, J.; Wang, F.; Dawson, A.; Gould, R.; Parsons, S.; Brabec, V.; Sadler, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 14623–14628.
- (19) (a) Serli, B.; Zangrando, E.; Gianferrara, T.; Scolaro, C.; Dyson, P. J.; Bergamo, A.; Alessio, E. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 3423–3434. (b) Bratsos, I.; Jedner, S.; Bergamo, A.; Sava, G.; Gianferrara, T.; Zangrando, E.; Alessio, E. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1120–1133. (c) Bratsos, I.; Mitri, E.; Ravalico, F.; Zangrando, E.; Gianferrara, T.; Bergamo, A.; Alessio, E. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 7358–7371. (d) Bratsos, I.; Urankar, D.; Zangrando, E.; Genova-Kalou, P.; Košmrlj, J.; Alessio, E.; Turel, I. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 5188–5199.

- (e) Kljun, J.; Bratsos, I.; Alessio, E.; Psomas, G.; Repnik, U.; Butinar, M.; Turk, B.; Turel, I. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 9039–9052. (f) Bratsos, I.; Birarda, G.; Jedner, S.; Zangrando, E.; Alessio, E. *Dalton Trans.* **2007**, 4048–4058.
- (20) Rilak, A.; Bratsos, I.; Zangrando, E.; Kljun, J.; Turel, I.; Bugarčić, Ž. D.; Alessio, E. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 11608–11618.
- (21) Huang, W.; Qian, H. *J. Mol. Struct.* **2008**, *874*, 64–76.
- (22) Bratsos, I.; Alessio, E. *Inorg. Synth.* **2010**, *35*, 148–152.
- (23) Sullivan, B. P.; Calvert, J. M.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 1404–1407.
- (24) Ziessel, R.; Grosshenny, V.; Hissler, M.; Stroh, C. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 4262–4271.
- (25) Wasylenko, D. J.; Ganesamoorthy, C.; Kolvisto, B. D.; Henderson, M. A.; Berllinguetta, C. P. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 2202–2209.
- (26) Gupta, N.; Grover, N.; Neyhart, G. A.; Singh, P.; Thorp, H. H. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 310–316.
- (27) Otwinowski, Z.; Minor, W. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.
- (28) Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G.; Spagna, R. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 115–119.
- (29) Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 112–122.
- (30) (a) Macrae, C. F.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Shields, G. P.; Taylor, R.; Towler, M.; Van De Streek, J. *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 453–457. (b) Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565. (c) Spek, A. L. *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 7–13. (d) Spek, A. L. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 148–155. (e) Brandenburg, K.; Putz, H. *Diamond—Visual Crystal Structure Information System*, version 3.1; Crystal Impact GbR: Bonn, Germany, 2006.
- (31) Bratsos, I.; Simonin, C.; Zangrando, E.; Gianferrara, T.; Bergamo, A.; Alessio, E. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 9533–9543.
- (32) (a) Chatterjee, D.; Sengupta, A.; Mitra, A. *Polyhedron* **2007**, *26*, 178–183. (b) Patel, M. N.; Gandhi, D. S.; Parmar, P. A.; Joshi, H. N. *J. Coord. Chem.* **2012**, *65*, 1926–1936. (c) Papaefstathiou, G. S.; Sofetis, A.; Raptopoulou, C. P.; Terzis, A.; Spyroulias, G. A.; Zafropoulos, T. F. *J. Mol. Struct.* **2007**, *837*, 5–14.
- (33) (a) Nakamoto, K. *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*, 6th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2009; Part B. (b) Rachford, A. A.; Petersen, J. L.; Rack, J. J. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8065–8075. (c) Rack, J. J.; Rachford, A. A.; Shelker, A. M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 7357–7359.
- (34) (a) Gejji, S. P.; Hermansson, K.; Lindgren, J. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 3712–3715. (b) Miles, M. G.; Doyle, G.; Cooney, R. P.; Tobias, R. S. *Spectrochim. Acta, Part A* **1969**, *25*, 1515–1526.
- (35) Heyns, A. M. *Spectrochim. Acta, Part A* **1977**, *33*, 315–322.
- (36) (a) Takeuchi, K. J.; Thompson, M. S.; Pipes, D. W.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 1845–1851. (b) Dovletoglou, A.; Adeyemi, S. A.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 4120–4127. (c) Root, M. J.; Deutsch, E. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 1464–1471.
- (37) Wang, F.; Chen, H.; Parsons, S.; Oswald, I. D. H.; Davidson, J. E.; Sadler, P. J. *Chem.—Eur. J.* **2003**, *9*, 5810–5820.
- (38) Miller, S. E.; House, D. A. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *187*, 125–132.
- (39) Alessio, E.; Xu, Y.; Cauci, S.; Mestroni, G.; Quadrioglio, F.; Viglino, P.; Marzilli, L. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7068–7071.
- (40) (a) Sigel, H. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1869–1886. (b) Massoud, S. S.; Corfù, N. A.; Griesser, R.; Sigel, H. *Chem.—Eur. J.* **2004**, *10*, 5129–5137.
- (41) Rilak, A.; Petrović, B.; Grgurić-Šipka, S.; Tešić, Ž.; Bugarčić, Ž. *Polyhedron* **2011**, *30*, 2339–2344.
- (42) (a) Kunick, C.; Ott, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5226–5227. (b) Meggers, E.; Atilla-Gokcumen, G. E.; Gründler, K.; Frias, C.; Prokop, A. *Dalton Trans.* **2009**, 10882–10888.

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Рилак Симовић  
број уписа 04/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом  
СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИСПИТИВАЊЕ МЕХАНИЗМА  
СУПСТАТУЦИОННЕ РЕАКЦИЈА РУТЕНИЈУМ (II) КОМПЛЕКСА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

у Крагујевцу, 19.01.2015.

Потпис аутора

Ана Рилак Симовић



ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Ринак Симовић  
Број уписа 04/2009  
Студијски програм Докторске академске студије - Хемија  
Наслов рада СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИСТИКА И ИСПИТИВАЊЕ МОДЕЛНИХ СУПЕРМИКРОМЕТАЛНИХ РЕАКЦИЈА  
РУТЕНИЈУМ (II) КОМПЛЕКСА  
Ментор Проф. др Мирослав Д. Бутрачич

Потписани Ана Ринак Симовић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Крагујевцу.

Потпис аутора

у Крагујевцу, 19.01.2015.

Ана Ринак Симовић

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИМПЛИКАЦИЈЕ МЕРОСАНИЗМА  
СУПСТИТУЦИОНОС РЕАКЦИЈА РЈТЕНЦИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

у Крагујевцу,

19.01.2015.

Ана Рилак Симоновић