



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

Дарко П. Ашанин

**СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ И
ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ИСПИТИВАЊЕ
ЊИХОВИХ РЕАКЦИЈА СА ПЕПТИДИМА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2015.

Аутор

Име и презиме:

Датум и место рођења:

Садашње запослење:

Наслов:

Дарко П. Ашанин

09.12.1976., Крагујевац

Хемијски аналитичар

Синтеза и карактеризација мононуклеарних и динуклеарних комплекса платине(II) и испитивање њихових реакција са пептидима

117 (+28)

46

195

Број старница:

Број слика:

Број библиографских података:

Установа и место где је рад израђен:

Природно-математички факултет, Крагујевац

Научна област (УДК):

Хемија(54) - Неорганска хемија(546)

Ментор:

Проф. др Снежана Рајковић

Оцена и одбрана

Датум и пријава теме:

13.03.2013. године

Број одлуке и датум прихватања

докторске дисертације:

180/XII-1 од 20. 03. 2013.

Комисија за оцену подобности

теме и кандидата:

1. Др Снежана Рајковић, ванредни професор
Природно-математички факултет, Крагујевац

Научна област: Неорганска хемија

2. Др Милош И. Ђуран, редовни професор
Природно-математички факултет, Крагујевац

Научна област: Неорганска хемија

3. Др Живадин Д. Бугарчић, редовни професор
Природно-математички факултет, Крагујевац

Научна област: Неорганска хемија

4. Др Душанка Радановић, научни саветник
Институт за хемију, технологију и металургију,
Београд

Научна област: Неорганска хемија

Комисија за оцену и одбрану
докторске дисертације:

1. Др Снежана Рајковић, ванредни професор
Природно-математички факултет, Крагујевац

Научна област: Неорганска хемија

2. Др Милош И. Ђуран, редовни професор
Природно-математички факултет, Крагујевац

Научна област: Неорганска хемија

3. Др Живадин Д. Бугарчић, редовни професор
Природно-математички факултет, Крагујевац

Научна област: Неорганска хемија

4. Др Душанка Радановић, научни саветник
Институт за хемију, технологију и металургију,
Београд

Научна област: Неорганска хемија

Датум одбране дисертације:

2015.

Већ дужи низ година постоји интерес за изучавања у области координационе хемије платине(II). Ова истраживања добијају у својој актуелности, нарочито након открића антитуморске активности комплекса платине(II) и платине(IV). Откриће да комплекси платине(II) катализују селективну хидролизу пептидне везе у пептидима и протеинима, при врло благим експерименталним условима, отвара могућност да се ови комплекси у будућности користе као синтетичке металопептидазе. Због тога су реакције комплекса платине(II) са пептидима предмет интензивних изучавања у истраживачкој групи проф. Милоша Ђурана. Предмет ове докторске дисертације представља наставак ових истраживања и односи се на синтезе мононуклеарних и динуклеарних комплекса платине(II) и испитивање реакција ових комплекса са пептидима који садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин. Ова истраживања су рађена у Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу у истраживачкој лабораторији професора др Милоша И. Ђурана.

Тему ове докторске дисертације предложила је др Снежана Рајковић, ванредни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, којој се захваљујем на разумевању, стрпљењу и подршци приликом израде и писања ове докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем професору др Милошу И. Ђурану са Природно-математичког факултета у Крагујевцу, на несебичној помоћи у току израде и писања ове дисертације.

Захваљујем се професору др Живадину Д. Бугарчићу са Природно-математичког факултета у Крагујевцу као и др Душанки Радановић, научном саветнику Института за хемију, технологију и металургију, Београд за корисне савете и сугестије у току писања дисертације, као и за учешће у комисији за оцену и одбрану докторске дисертације.

Посебну захвалност изражавам проф. др Уршули Рихлевској (Urszula Rzhlewska) и Беати Варзајтис (Beata Warżajtis) са Универзитета Адам Мицкијевич у Познању (Пољска) које су урадиле рендгеноструктурне анализе комплекса платине(II) и значајно допринеле интерпретацији резултата.

Највећу захвалност дугујем мојим родитељима и породици, као и пријатељима.

Крагујевац, 2015.

Дарко П. Ашанин

Списак научних радова и саопштења Дарка П. Ашанина

1. Научни радови објављени у међународним научним часописима

*Радови под редним бројем 1.5, 1.6, 1.7. и 1.8. су објављени у оквиру ове докторске дисертације

- 1.1. D. P. Ašanin**, S. Rajković, D. Molnar-Gabor, M. I. Djuran
Hydrolysis of the Peptide Bond in N-Acetylated L-Methionylglycine Catalyzed by Various Palladium(II) Complexes: Dependence of the Hydrolytic Reactions on the Nature of the Chelate Ligand in cis-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ Complexes
Chemical Monthly, **135** (2004) 1445-1453
ISSN: 0026-9247, DOI: 10.1007/s00706-004-0232-4, IF: 0,904 M22
- 1.2. M. D. Živković, D. P. Ašanin**, S. Rajković, M. I. Djuran
Hydrolysis of the amide bond in N-acetylated L-methionylglycine catalyzed by various platinum(II) complexes under physiologically relevant conditions
Polyhedron, **30(6)** (2011) 947-952
ISSN: 0277-5387, DOI: 10.1016/j.poly.2010.12.039, IF: 2,057 M21
- 1.3. Z. P. Tomić, D. Ašanin**, S. Antić-Mladenović, V. Poharc-Logar, P. Makreski
NIR and MIR spectroscopic characteristics of hydrophilic and hydrophobic bentonite treated with sulphuric acid
Vibrational Spectroscopy, **58** (2012) 95-103
ISSN: 0924-2031, DOI: 10.1016/j.vibspec.2011.11.002, IF: 1,747 M22
- 1.4. Z. P. Tomić, D. Ašanin**, R. Đurović, A. Đorđević, P. Makreski
Near-infrared spectroscopy study for determination of adsorbed acetochlor in the organic and inorganic bentonites
Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **98** (2012) 47-52
ISSN: 1386-1425, DOI: 10.1016/j.saa.2012.08.035, IF: 1,977 M22

- 1.5.** S. Rajković, **D. P. Ašanin**, M. D. Živković, M. I. Djuran
¹H NMR study of the reactions between carboplatin analogues [Pt(en)(Me-mal-*O,O'*)] and [Pt(en)(Me₂-mal-*O,O'*)] and various methionine- and histidine-containing peptides under physiologically relevant conditions
Inorganica Chimica Acta, **395** (2013) 245-251
 ISSN: 0020-1693, DOI: 10.1016/j.ica.2012.11.004, IF: 2,041 M22
- 1.6.** **D. P. Ašanin**, M. D. Živković, S. Rajković, B. Warzajtis, U. Rychlewska, M. I. Djuran
 Crystallographic evidence of anion... π interactions in the pyrazine bridged {[Pt(en)Cl]₂(μ -pz)}Cl₂ complex and a comparative study of the catalytic ability of mononuclear and binuclear platinum(II) complexes in the hydrolysis of *N*-acetylated L-methionylglycine
Polyhedron, **51** (2013) 255-262
 ISSN: 0277-5387, DOI: 10.1016/j.poly.2012.12.037, IF: 2,047 M22
- 1.7.** S. Rajković, **D. P. Ašanin**, M. D. Živković, M. I. Djuran
 Synthesis of different pyrazine-bridged platinum(II) complexes and ¹H NMR study of their catalytic abilities in the hydrolysis of the *N*-acetylated L-methionylglycine
Polyhedron, **65** (2013) 42-47
 ISSN: 0277-5387, DOI: 10.1016/j.poly.2013.08.016, IF: 2,047 M22
- 1.8.** S. Rajković, U. Rychlewska, B. Warzajtis, **D. P. Ašanin**, M. D. Živković, M. I. Djuran
 Disparate behavior of pyrazine and pyridazine platinum(II) dimers in the hydrolysis of histidine- and methionine-containing peptides and unique crystal structure of {[Pt(en)Cl]₂(μ -pydz)}Cl₂ with a pair of NH...Cl⁻...HN hydrogen bonds supporting the pyridazine bridge
Polyhedron, **67** (2014) 279-285
 ISSN: 0277-5387, DOI: 10.1016/j.poly.2013.09.008, IF: 2,047 M22

2. Радови саопштени на научним скуповима

- 2.1.** D. M. Gurešić, **D. P. Ašanin**, N. S. Drašković, D. D. Radanović, U. Rychlewska, M. I. Djuran,
Highly Selective Crystallization of Metal(II) Ions with 1,3-pdta Ligand. Crystal Structures of Two Isomorphous Hexadentate $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Cd}(1,3\text{-pdta})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Zn}(1,3\text{-pdta})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Complexes and the $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Cd}(1,3\text{-pdta})(\text{H}_2\text{O})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ Complex
4th International Conference on Chemical Societies of the South-East European Countries, Belgrade, 2004, Book of Abstracts Vol. I GT-P 22
- 2.2.** M. D. Živković, **D. P. Ašanin**, S. Rajković, M. I. Djuran
Selective hydrolysis of the amide bond in *N*-acetylated L-methionylglycine catalyzed by various platinum(II) complexes under physiological conditions
10th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Thessaloniki, Greece, June 22-26, 2010, P.O. 282
- 2.3.** N. Drašković, **D. Ašanin**, M. Živković, S. Rajković
¹H NMR study of the reactions of a methionine- and histidine-containing peptides with different antitumor active platinum(II) complexes
Scientific conference with international participation. Preclinical testing of active substances and cancer research, Kragujevac, Serbia, March 16-19, 2011, P6
- 2.4.** **D. P. Ašanin**, M. D. Živković, S. Rajković, M. I. Djuran
Hydrolysis of the amide bond in *N*-acetylated L-methionylglycine in the presence of different platinum(II) complexes
L savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, 14-15. jun 2012. godine, NH 02
- 2.5.** M. D. Živković, **D. P. Ašanin**, S. Rajković, M. I. Djuran
Hydrolysis of the amide bond in *N*-acetylated L-methionylglycine in the presence of different binuclear $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ -type complexes
8st International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Belgrade, June 27-29, 2013, BS-CB P07
- 2.6.** **D. P. Ašanin**, M. D. Živković, S. Rajković, M. I. Djuran, U. Rychlewska, B.

Waržajtis

Crystal structure of $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pd})\}\text{Cl}_2$ and ^1H NMR investigation of the hydrolytic reactions between L-methionine- and L-histidine-containing peptides and this binuclear platinum(II) complex

8st International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Belgrade, June 27-29, 2013, O 10 BS-CB

СКРАЋЕНИЦЕ

1,2-pn	1,2-пропилендиамин
^{13}C NMR	угљеник-13 нуклеарно магнетна резонанца
^{195}Pt NMR	платина-195 нуклеарно магнетна резонанца
^1H NMR	протонска нуклеарно магнетна резонанца
Ac-Gly	<i>N</i> -ацетилглицин
Ac-Gly-Gly-His	<i>N</i> -ацетилглицил-глицил-хистидин
Ac-Gly-His	<i>N</i> -ацетилглицил-хистидин
Ac-Gly-His-Gly	<i>N</i> -ацетилглицил-хистидил-глицин
Ac-Gly-Met-Gly	<i>N</i> -ацетилглицил-метионил-глицин
Ac-Gly-Met-Pro-Gly-Gly	<i>N</i> -ацетилглицил-метионил-пролил-глицил-глицин
Ac-L-His-Gly	<i>N</i> -ацетил-L-хистидил-глицин
Ac-L-His-Ser	<i>N</i> -ацетил-L-хистидил-серин
Ac-L-His-Thr	<i>N</i> -ацетил-L-хистидил-треонин
Ac-L-MeCys-His-Ala	<i>N</i> -ацетил-L-метилцистеил-хистидил-аланин
Ac-L-Met	<i>N</i> -ацетил-L-метионин
Ac-L-Met-Ala-Ser	<i>N</i> -ацетил-L-метионил-аланил-серин
Ac-L-Met-Gly	<i>N</i> -ацетил-L-метионил-глицин
Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly	<i>N</i> -ацетил-L-метионил-глицил-глицил-L-хистидил-глицин
Ac-L-Met-Gly-L-His-Gly-NH ₂	<i>N</i> -ацетил-L-метионил-глицил-L-хистидил-глицинамид
Ac-L-Met-L-His	<i>N</i> -ацетил-L-метионил-L-хистидин
Ac-L-Met-Pro	<i>N</i> -ацетил-L-метионил-пролин
Ac-L-Met-Pro-Gly-Gly	<i>N</i> -ацетил-L-метионил-пролил-глицил-глицин
Ac-L-Ser-Met	<i>N</i> -ацетил-L-серил-метионин
Ac-L-Trp	<i>N</i> -ацетил-L-триптофан
Ala	аланин
Ala-Ser	аланил-серин
Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	ангиотенсин II
ATP	аденозинтрифосфат

BNPS-скатол	3-бром-3-метил-2-(2'-нитрофенилсулфенил)-индолеин
bpy	2,2'-бипиридин
Ctrlp	транспортер бакра
dach	1,2-диаминоциклохексан
dien	диэтилен triамин
dmf	диметилформамид
dtco	1,5-дитиоциклооктанска киселина
dth	2,5-дитиохексан
en	этилендиамин
Gly	глицин
Gly-Gly-Gly	глицил-глицил-глицин
Gly-Gly-Met	глицил-глицил-метионин
Gly-Met	глицил-метионин
Gly-Met-Gly	глицил-метионил-глицин
GSH	глутатион
GSTs	глутатион <i>S</i> -трансфераза
His-Gly	хистидил-глицин
His-Pro	хистидил-пролин
HPLC	хроматографија под високим притисцима (high-pressure liquid chromatography)
ibn	изобутилендиамин
IC ₅₀	концентрација половине максималног инхибиторског дејства (half maximal inhibitory concentration)
LD ₅₀	50% латентне дозе (median lethal dose)
Leu	леуцин
Leu-Gly	леуцил-глицин
L-Met	L-метионин
Me ₄ en	<i>N,N,N',N'</i> -тертраметилетилендиамин
Me ₂ -mal	диметил-малонат
Meen	<i>N</i> -метилетилендиамин
Me-mal	метил-малонат

MeS-L-Cys	<i>S</i> -метил-L-цистеин
Met-Gly	метионил-глицин
Met-Gly-Gly	метионил-глицил-глицин
MS	масена спектрометрија
Phe	фенилаланин
Ser	серин
Thr	треонин
terpy	2,2',6,6'-терпиридин
Tyr	тирозин
Tyr-Ile	тирозил-изолеуцин
Val	валин
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
РНК	рибонуклеинска киселина
ФДА	администрација за храну и лекове (Food and Drug Administration)

САДРЖАЈ

ИЗВОД.....	I
SUMMARY.....	V
1. ОПШТИ ДЕО	1
1.1. АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ МОНОНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II)	2
1.1.1. Механизам деловања цисплатине	5
1.2. ПОЛИНУКЛЕАРНИ КОМПЛЕКСИ ПЛАТИНЕ(II)	8
1.3. ХИДРОЛИЗА ПЕПТИДА ПОМОЋУ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ПАЛАДИЈУМА(II)	19
1.3.1. Хидролиза пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L-цистеин помоћу мононуклеарних комплекса платине(II) и паладијума(II)	24
1.3.2. Механизам хидролизе пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L-цистеин помоћу мононуклеарних комплекса платине(II) и паладијума(II)	27
1.3.3. Хидролиза пептида који садрже аминокиселину L-хистидин помоћу мононуклеарних комплекса паладијума(II) и платине(II)	30
1.3.4. Хидролиза пептида који садрже аминокиселину L-метионин помоћу динуклеарних комплекса паладијума(II)	37
1.3.5. Хидролиза пептида који садрже аминокиселину L-триптофан помоћу комплекса паладијума(II) и платине(II)	38
1.4. ХИДРОЛИЗА ПРОТЕИНА ПОМОЋУ КОМПЛЕКСА ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА	39
2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА	44
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	46
3.1. Хемикалије и реагенси	46
3.2. Ацетиловање терминалне амино групе у пептидима	47
3.3. Добијање $[Pt(L)Cl_2]$ комплекса	47
3.4. Добијање $[Pt(en)(L-O,O')]$ комплекса	48

3.5. Добијање $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\text{X})\}\text{Cl}_2$ комплекса	49
3.6. Добијање $[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-X})\}^{4+}$ комплекса	51
3.7. Мерење рН вредности	51
3.8. Микроанализа	51
3.9. NMR (^1H и ^{13}C) мерења	51
3.10. Рендгенска структурна анализа	53
4. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА	56
4.1. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ И ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ИСПИТИВАЊЕ ЊИХОВИХ РЕАКЦИЈА СА ПЕПТИДИМА	56
4.1.1. Испитивање реакција мононуклеарних комплекса платине(II) са пептидима који садрже L-метионин и L-хистидин	57
<i>Реакције Pt(II) комплекса са Ac-L-Met-Gly</i>	59
<i>Реакција Pt(II) комплекса са пептидима који садрже L-метионин и L-хистидин у бочном низу</i>	66
4.1.2. Синтеза и карактеризација динуклеарних комплекса платине(II) и испитивање њихових реакције са пептидима	70
Опис кристалних структура $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса	72
Испитивање реакција хидролизе N-ацетилованог дипептида Ac-L-Met-Gly у присуству $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса	80
<i>Реакције платина(II) комплекса са еквимоларном количином Ac-L-Met-Gly дипептида</i>	80
<i>Реакције платина(II) комплекса са вишком Ac-L-Met-Gly дипептида</i>	85
Испитивање реакција хидролизе Ac-L-His-Gly и Ac-L-Met-Gly-L-His- GlyNH ₂ пептида у присуству $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекса	87
<i>Реакције динуклеарних платина(II) комплекса са Ac-L-His-Gly дипептидом</i>	88
<i>Реакције динуклеарних платина(II) комплекса са Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептидом</i>	91

Испитивање реакција хидролизе пептидне везе у Ас-Л-Мет-Глу помоћу различитих $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)\}Cl_2$ комплекса	95
<i>Реакције $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ комплекса са еквимоларном количином Ас-Л-Мет-Глу дипептида</i>	96
<i>Реакције $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ комплекса у присуству вишка Ас-Л-Мет-Глу дипептида</i>	102
5. ЗАКЉУЧАК	105
ЛИТЕРАТУРА	107
БИОГРАФИЈА	116
ПРИЛОГ	117

ИЗВОД

Испитивања реакција комплекса платине(II) са пептидима и протеинима су показала да ови комплекси представљају добре каталитичке реагенси за хидролитичко раскидање пептидних веза у овим молекулима. Ови комплекси се координују за хетероатом у бочном низу аминокиселине L-метионина или L-хистидина и катализују раскидање пептидне везе у чију структуру улази карбоксилна група неке од наведених аминокиселина. Иако је ова област интензивно изучавана у току претходних неколико деценија, селективност и механизам раскидања пептидне везе у пептидима који садрже L-метионин и L-хистидин помоћу Pt(II) комплекса још увек нису потпуно објашњени. У циљу њиховог дефинисања неопходно је детаљније изучавати каталитички утицај комплекса Pt(II) на реакције хидролизе пептида који садрже L-метионин и L-хистидин. У овој дисертацији приказани су резултати спектроскопских испитивања хидролитичких реакција пептида који садрже L-метионин и L-хистидин у присуству различитих комплекса Pt(II).

Применом ^1H NMR спектроскопије изучаване су реакција $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса (en је етилендиамин, Me-mal и Me₂-mal су бидентатно координовани анјони 2-метилмалонске односно 2,2-диметилмалонске киселине) са пептидима Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly. Све реакције су испитиване у 1:1 молском односу одговарајућег платина(II) комплекса и пептида, у 50 mM фосфатном пуферу при pH вредности од 7,4 у D₂O као растварачу и температури од 37 °C. Нађено је да при овим

експерименталним условима у првој фази долази до формирања Pt(II)-пептид комплекса који садржи монодентатно координовани малонато лиганд и пептид монодентатно координован преко атома сумпора из метионинског остатка. У току времена у овом интермедијерном, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]^-$ односно $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]^-$, комплексу долази до интермолекулске супституције монодентатно координованог малонато лиганда са молекулом воде из растварача. Међутим, у реакцијама са пептидима који садрже L-метионин и L-хистидин у бочном низу, интермедијерни комплекс подлеже интрамолекулској супституцији при чему се монодентатно координовани малонато лиганд замењује са N3 атомом азота из L-хистидина. Супституција монодентатно координованог Me-mal и Me₂-mal са молекулом воде доводи до формирања хидролитички активног Pt(II)-пептид комплекса, који катализује хидролизу Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду. Међутим, интрамолекулска супституција монодентатно координованих малонато анјона са N3 атомом пептида који садрже L-метионин и L-хистидин у бочном низу доводи до формирања веома стабилног хидролитички неактивног S,N3-макрохелатног Pt(II)-пептид комплекса.

У другом делу овог рада синтетизовано је пет нових динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-X})\}\text{Cl}_2$ комплекса (L је бидентатно координован етилендиамин, en; (±)-1,2-пропилендиамин, 1,2-pn; изобутилендиамин, ibn; *trans*-(±)-1,2-диаминоциклохексан, dach; а X је пиразин, pz или пиридазин, pydz). Структуре ових комплекса су претпостављене на основу резултата ¹H и ¹³C NMR спектроскопије и елементарне микроанализе. Кристалне структуре $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса су одређене применом рендгенске структурне анализе. Синтетизовани комплекси су преведени у одговарајуће аква комплексе, $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$. Применом ¹H NMR спектроскопије испитиване су реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду у присуству мононуклеарног $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса. Одговарајући пептид и Pt(II) комплекси су реаговали у 1:1 и 2:1 молским односима. Реакције су изучаване у pH области од 2,0 до 2,5 у D₂O као растварачу на 37 °C. Каталитичка својства динуклеарног комплекса су поређена са одговарајућим својствима за аналогни мононуклеарни $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс. Нађено је да је, у односу на мононуклеарни $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс, одговарајући динуклеарни $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекс знатно ефикаснији катализатор селективне хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly

дипептиду. Разлике у каталитичким својствима мононуклеарног и динуклеарног платина(II) комплекса су објашњене чињеницом да ови комплекси у реакцији са Ac-L-Met-Gly дипептидом формирају различите интермедијарне платина(II)-пептид комплексе.

Такође, применом ^1H NMR спектроскопије изучаване су реакције динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекса са Ac-L-His-Gly и Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ пептидима. Све реакције су изучаване у pH области од 2,0 до 2,5 на 37 °C у D₂O као растварачу. Нађено је да динуклеарни пиразински комплекс, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ показује знатно већу каталитичку способност хидролизе пептидне везе у односу на аналогни пиридазински $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекс. Динуклеарни $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекс, селективно хидролизује His-Gly пептидну везу у Ac-L-His-Gly дипептиду. Међутим, на основу ^1H NMR спектроскопије закључено је да у реакцији $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ са Ac-L-His-Gly не долази до координовања дипептида за Pt(II) јон. Као последица одсуства координације атома азота имидазоловог прстена Ac-L-His-Gly дипептида за Pt(II) јон не долази до хидролизе пептидних веза у овом пептиду. Такође, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекс се координује само за атом сумпора метионинског остатка у Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептиду и хидролизује само пептидну везу која укључује карбоксилну групу метионина. Међутим, аналогни $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекс се, поред атома сумпора из метионина координује и за атом азота хистидина у Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептиду, при чему хидролизују пептидне везе које садрже карбоксилну групу L-метионина и L-хистидина. Закључено је да се у полипептидима који садрже L-метионин и L-хистидин може постићи региоселективно раскидање пептидне везе која укључује карбоксилну групу L-метионина уколико се као катализатор користи динуклеарни $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекс.

На крају, применом ^1H NMR спектроскопије изучаване су реакције $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса (L је бидентатно координован en, 1,2-pn, ibn, dach, pz је мостни пиразински лиганд) са N-ацетилованим L-метионилглицином (Ac-L-Met-Gly), у pH области од 2,0 до 2,5 и на 37 °C. У свим испитиваним реакцијама нађено је да долази до селективне хидролизе Met-Gly пептидне везе. Брзина хидролизе ове пептидне везе опада са повећањем стерног ефекта лиганда координованог за Pt(II) јон (en > 1,2-pn > ibn > dach). Међутим, у реакцији ових

комплекса са вишком дипептида (1:2 молски однос) није могуће пратити утицај бидентатно координованог лиганда L услед разлагања динуклеарног Pt(II) комплекса.

Кључне речи: мононуклеарни Pt(II) комплекси, динуклеарни Pt(II) комплекси, L-метионил-глицин, L-хистидил-глицин, пептиди који садрже L-метионин и L-хистидин, хидролиза, ањон-π интеракције, ^1H NMR спектроскопија, рендгенска структурна анализа.

SUMMARY

Studies of the platinum(II) complexes have shown that they can be promising reagents for hydrolytic cleavage of peptides and proteins. These complexes bind to the heteroatom in the side chain of methionine or histidine and promote cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of this anchoring amino acid. The consistent regioselectivity in the cleavage of histidine- and methionine-containing peptides promoted by platinum(II) complexes and the mechanism of these hydrolytic reactions are not completely understood yet. A better knowledge of the coordination chemistry of histidine- and methionine-containing peptides with platinum(II) complexes is necessary for understanding the regioselectivity of peptide and protein cleavage promoted by such complexes.

^1H NMR spectroscopy was applied to the study the reactions of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ complexes (en is ethylenediamine, Me-mal and $\text{Me}_2\text{-mal}$ are bidentate coordinated anions of 2-methylmalonic and 2,2-dimethylmalonic acids, respectively) with *N*-acetylated Ac-L-Met-Gly and Ac-L-Met-L-His-type peptides (Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ and Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly). All reactions were realized at 37 °C with equimolar amounts of the Pt(II) complex and the dipeptide at pH 7.40 in 50 mM phosphate buffer in D₂O. In all these reactions the ring-opened Me-mal and $\text{Me}_2\text{-mal}$ Pt(II) adducts as an intermediate products were detected in solution for more than 48 h. We found that during this time in the reaction with Ac-L-Met-Gly these monodentate bound malonate ligands have been replaced by water molecule leading to the formation of the corresponding aqua Pt(II)-peptide complex which further

promotes the regioselective cleavage of the peptide. However, in the reaction with Ac-L-Met-L-His-type peptides a selective intramolecular replacement of these malonate anions by the *N*3 imidazole nitrogen atom from histidine residue was occurred. This replacement reaction leads to the formation of the *S,N*3-macrochelate Pt(II)-peptide complex which was shown as very stable and hydrolytically inactive for more than two weeks.

In the second part of this work, five dinuclear $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-X})\}\text{Cl}_2$ -type complexes (L is ethylenediamine, en; (\pm)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn; isobutylenediamine, ibn; *trans*-(\pm)-1,2-diaminocyclohexane, dach and X is bridging pyrazine (pz) or pyridazine (pydz) ligand) have been synthesized and characterized by elemental microanalyses, NMR (^1H and ^{13}C) spectroscopy and single-crystal $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ complexes X-ray diffraction. The chlorido complexes were converted into the corresponding aqua species, $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$. ^1H NMR spectroscopy was applied to study the reactions of dinuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ and mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex with the *N*-acetylated L-methionylglycine (Ac-L-Met-Gly). The peptide and the corresponding platinum(II) complex were reacted in different molar ratios and all reactions were performed at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ in D_2O as a solvent at 37°C . The better catalytic ability of the dinuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex than the corresponding mononuclear Pt(II) complex can be attributed to the presence of different hydrolytically active Pt(II)-peptide complexes formed during the reaction with the Ac-L-Met-Gly dipeptide.

Also, the ^1H NMR spectroscopy was applied to study the reactions of dinuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ complexes in the hydrolysis of the *N*-acetylated L-histidylglycine (Ac-L-His-Gly) and L-methionyl-glycyl-L-histidyl-glycineamide (Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂). All reactions were performed in the pH range 2.0 – 2.5 and at 37°C in D_2O . It was found that the pyridazine Pt(II) dimer is significantly less active than its pyrazine Pt(II) analog, which is probably due to an increased steric effect exerted in the former complex by the ortho-position of the two nitrogen atoms. Consequently, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ only binds to the methionine sulfur atom of the Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ peptide and promotes cleavage of amide bond that involves the carboxylic group of methionine. In contrast, the analogous pyrazine Pt(II) dimer reacts with both methionine and histidine residues of this tetrapeptide, promoting cleavage of amide bonds involving carboxylic groups of both of these anchoring amino acids. Considering these results it can be assumed that in the polypeptide containing

both methionine and histidine residues the regioselective cleavage of the amide bond involving only the carboxylic group of methionine can be achieved successfully by using the presently investigated pyridazine-bridged Pt(II) complex.

Finally, the hydrolytic reactions between $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ -type complexes (L is ethylenediamine, en; (\pm)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn; isobutylenediamine, ibn; (\pm)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane, dach and pz is bridging pyrazine ligand) and the *N*-acetylated L-methionylglycine dipeptide (Ac-L-Met-Gly) were studied by ^1H NMR spectroscopy. All reactions were performed in the pH range 2.0 - 2.5 and at 37 °C. In all investigated reactions Pt(II) aqua complexes bind to the methionine side chain of Ac-L-Met-Gly dipeptide and promote the cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine. It was found that the amount of hydrolyzed dipeptide strongly depends from the steric bulk of bidentate coordinated diamine ligand L in $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex (en > 1,2-pn > ibn > dach). However, in the reaction with an excess of dipeptide the influence of the nature of diamine ligand L on this hydrolytic process could not be observed due to the fact that slow decomposition of $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex was occurred.

Keywords: mononuclear platinum(II) complex, dinuclear platinum(II) complex, L-methionyl-glycine, L-histidyl-glycine, L-methionine- and L-histidine-containing peptides, hydrolysis, anion $\cdots\pi$ interactions, ^1H NMR spectroscopy, X-ray crystallography.

1. ОПШТИ ДЕО

Комплексна једињења прелазних метала имају велику примену у техници, медицини и биологији. Неки комплекси јона прелазних метала, сами или у комбинацији са другим једињењима, већ дужи низ година се користе у медицини за лечење различитих обољења. Комплекси метала се у медицини користе као антитуморски, антимикробиолошки, антиреуматски, радиофармацеутски, контраст и хелатни агенси. Новија истраживања у овој области усмерена су на синтезу нових комплексних једињења која се могу применити у медицини као терапеутски агенси или као средства за дијагностику. Изучавања интеракција комплекса платине(II) са биомолекулима, као што су пептиди и протеини, имају велики значај због тога што се ова једињења последњих неколико деценија користе у медицини као антитуморски агенси [1]. Поред тога, комплекси платине(II) у реакцији са пептидима и протеинима, који у бочном низу садрже аминокиселине L-метионин, L-цистеин и L-хистидин, катализују селективну хидролизу пептидне везе [2-4].

1.1. АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ МОНОНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II)

Изучавања у области антитуморске активности комплекса платине(II) и њихове примене у медицини започела су са открићем антитуморске активности *cis*-диамминдихлоридоплатина(II) комплекса или цисплатина, $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ (В. Rosenberg, 1964. године). Комплекс $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ је први пут клинички тестиран 1971. године, а од 1978. године је одобрена његова употреба у лечењу тумора јајника и тестиса. Од тада антитуморски комплекси платине(II) се користе у хемиотерапији као агенси за различита туморска обољења, као што су колоректални, генитоуринарни и немикроћелијски тумори плућа [5-9]. Цисплатина се користи више од три деценије у хемиотерапији, било као самостални антитуморски агенс или у комбинацији са другим антитуморским агенсима [10]. Проблем примене цисплатине код третмана тумора је токсично дејство овог комплекса (нефротоксичност, неуротоксичност, кардиотоксичност, мучнина, опадање косе и др.) [11-13], ограничена растворљивост и појава резистенције након дуже примене [14]. Многи тумори показују природну резистентност на цисплатину, други постају резистентни током третмана [15], док у фази метастазе цисплатина је неефикасан антитуморски агенс [16]. У циљу проналажења комплекса, који ће имати мању токсичност од цисплатине, последњих неколико деценија синтетизован је велики број комплекса платине(II) који су структурно слични цисплатини (*класични комплекси платине*), као и комплекси који се структурно не могу повезати са цисплатином (*некласични комплекси платине*) [17].

Од комплекса који су приказани у табели 1, пет комплекса платине: карбоплатина, оксалиплатина, недаплатина, лобаплатина и хептаплатина ушли су у клинички употребу, док је неколико комплекса у фази клиничких испитивања [18,19]. Карбоплатина [20] и оксалиплатина [21] су регистровани као цитостатици и нашли су примену у клиничкој пракси. Недаплатина [22] се користи у Јапану код третмана тумора главе, врата, тестиса, плућа, јајника, грлића материце, и немикроћелијских тумора плућа. Хептаплатина [21,22] се користи код третмана тумора желуца у Јужној Кореји. Лобаплатина [23] је одобрен као цитостатик у Кини за лечење хроничне мијелоидне леукемије, метастазе тумора дојке и микроћелијског канцерогеног обољења плућа. Сваки од ових комплекса поседује неке

особине које нема цисплатина. На пример, недаплатина има хелатни лиганд који подлеже реакцијама супституције и механизам дејства сличан као цисплатина [24], али је овај комплекс показао мању нефротоксичност и неуротоксичност у односу на цисплатину и карбоплатину [25].

Међутим, многа једињења која су показала завидне резултате у предклиничким испитивањима нису нашла примену у клиничкој пракси. Разлог томе је токсичност новосинтетизованих једињења, безначајна антитуморска активност и веома слаба растворљивост. Неки од комплекса који нису нашли практичну примену су JM-11, PAD, енлоплатина [26], зениплатина [27-30], циклоплатам [31], спироплатина [32,33], као и неки полинуклеарни комплекси платине(II) BBR-3464 [27], ароплатина [28] итд (види табелу 1). Пикоплатина [34] је у трећој фази клиничких испитивања, као цитостатик са могућом применом за третман микроћелијског тумора плућа.

Октаедарски комплекси платине(IV) су мање реактивни у односу на квадратно-планарне комплексе платине(II). Претпоставка је да се комплекси платине(IV), у присуству редукционих супстанци у организму, редукују до комплекса платине(II), који затим испољавају антитуморску активност [35]. С обзиром на ову чињеницу, комплекси платине(IV) се потенцијално могу примењивати орално у хемиотерапији. Међутим, сатраплатина [29] није прошла трећу фазу клиничких испитивања, као орални цитостатик за третман карцинома простате. Ормаплатина (тетраплатина) [36] као цитостатик није прошао прву фазу клиничких испитивања, док је ипроплатина [37] у другој фази клиничких испитивања. Нежељени споредни ефекти и веома ниске антитуморске активности у првој и другој фази клиничких испитивања су главни разлози за одустајање од примене претходно поменутих комплекса платине у хемиотерапији.

Пошто је резистенција главно ограничење клиничке примене антитуморских комплекса платине(II) и платине(IV), најважнија карактеристика нових антитуморских комплекса платине треба да буде способност превазилажења ћелијске резистенције. У ствари, многи новосинтетизовани комплекси платине(II) показују ужи спектар деловања и мању резистентност у односу на комплексе платине(II) који се налазе у клиничкој употреби [38]. Комплекси платине који се структурно разликују од цисплатине и њених аналога, пружају бројне могућности за проналажење антитуморских агенаса чији се механизам деловања разликује од механизма деловања цисплатине [39,40].

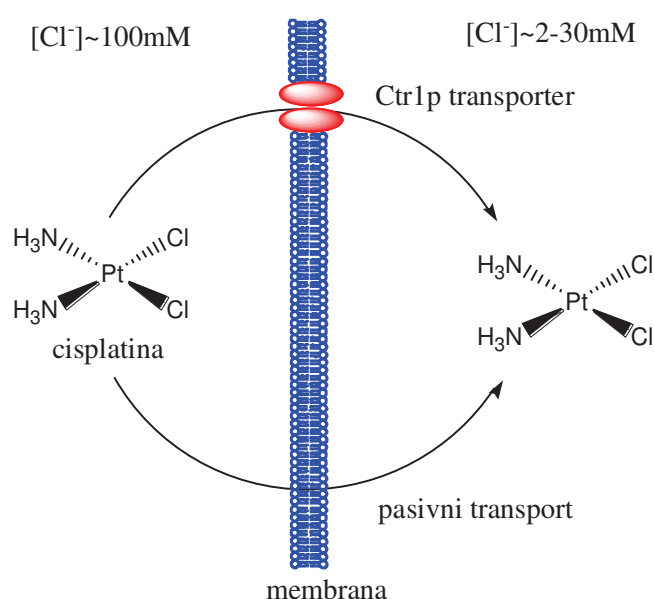
Табела 1. Антитуморски комплекси платине(II) и платине(IV) и њихов клинички статус

Назив	Структурна формула	Назив	Структурна формула
Цисплатина ¹		Недаплатина ⁷	
Карбоплатина ¹		Зениплатина ⁴	
Хептаплатина ²		Енлоплатина ⁴	
Оксалиплатина ¹		Лобаплатина ³ USA ⁷	
Пикоплатина ⁸		Спироплатина (TNO-6) ⁵	
Ормаплатина (Тетраплатина) ⁴		Ипроплатина (JM-9) ^{7,8}	
JM-11 ⁹		PAD ⁴	
Сатраплатина (JM-216) ⁶		Циклоплатам ⁴	
Ароплатина (1-NDDP) ⁷			
Триплатина тетранитрат (BBR-3464) ⁵			

¹ Одобрено од ФДА, ² Одобрено у Јужној Кореји, ³ Одобрено у Кини, ⁴ Није прошао фазу I, ⁵ Није прошао фазу II, ⁶ Није прошао фазу III, ⁷ У II фази испитивања, ⁸ У III фази испитивања, ⁹ Напуштена испитивања

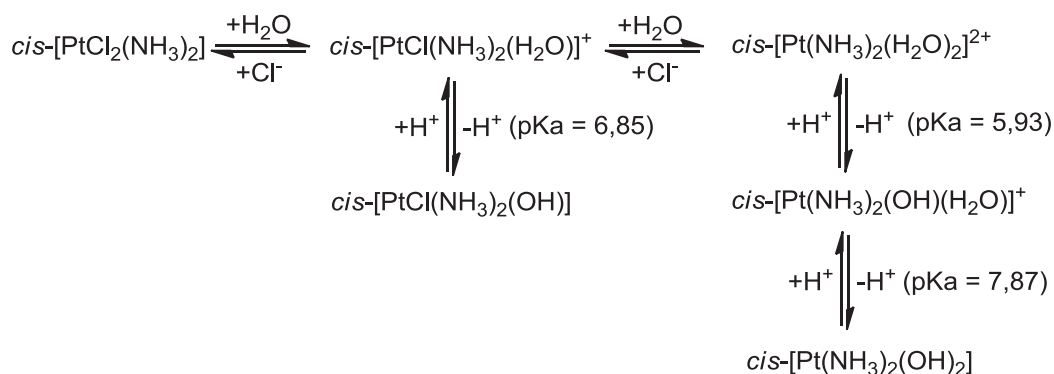
1.1.1. Механизам деловања цисплатине

Механизам којим цисплатина дифундује у ћелије још увек није у потпуности разјашњен. Раније се сматрало да цисплатина дифундује у ћелију углавном пасивном дифузијом, као неутрални молекул. Међутим, касније је нађено да цисплатина може дифундовати у ћелију и путем активног транспорта, посредством плазма-мембранског бакар Ctr1p транспортера (Слика 1). Механизам овог активног транспорта још увек није потпуно објашњен [41].



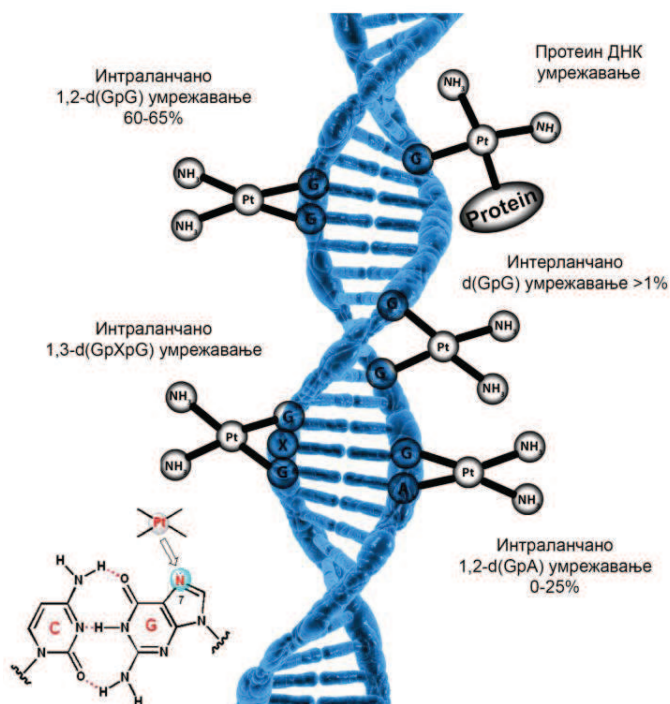
Слика 1. Шематски приказ дифундовања цисплатине у ћелију пасивном дифузијом и активним транспортом [42]

Релативно ниска концентрација Cl^- јона у ћелији (око 4 mM) је погодна за хидролитичке реакције цисплатине, тако да се у првој фази један хлоридо лиганд супституише са молекулом воде (Слика 2). Након формирања $\text{cis-}[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ комплекса, долази до даље супституције хлоридо лиганда са молекулима воде, а затим даље хидролизе аква-деривата при чему настају неутрални комплекси платине(II), који не могу да реагују са ДНК. Због хидролитичких реакција у ћелији смањује се антитуморска активност цисплатине. Позитивно наелектрисани производи хидролитичких реакција цисплатине у ћелији реагују са ДНК што доводи до антитуморске активности цисплатине.



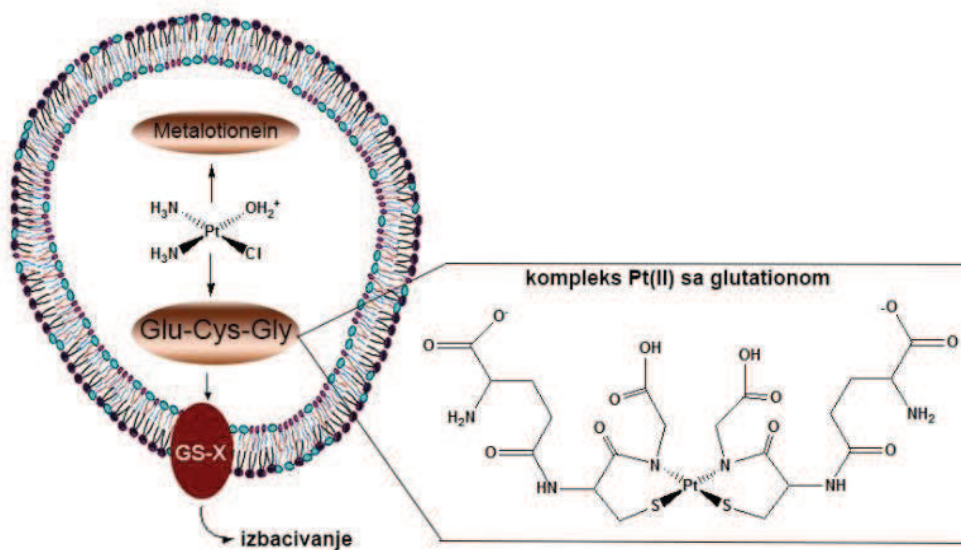
Слика 2. Шематски приказ реакција хидролизе цисплатине

Антитуморска активност цисплатине базира се на реакцији са ДНК у ћелији, при чему настају ковалентне везе са нуклеобазама [43,44]. При физиолошкој рН вредности N7 атом азота из гуанина представља најчешћи акцепторски центар хидролизованог комплекса цисплатине. Антитуморска активност цисплатине највероватније потиче од такозваног 1,2-интраланчаног d(GpG) начина координовања Pt(II) за ДНК (Слика 3). Координовање цисплатине за ДНК узрокује дисторзију њене спиралне структуре, што доводи до инхибиције репликације и транскрипције ДНК.



Слика 3. Различити начини везивања цисплатине за ДНК [42]

Као што је напред описано интеракција цисплатине са ДНК условљава антитуморску активност комплекса платине(II). Међутим, у организму постоје и многи други биомолекули који могу реаговати са цисплатином. Најчешће такви молекули имају у структури тиолне (-SH) или тиоетарске (-SCH₃) групе. Након дифундовања цисплатине у ћелију, тиолна група цистеина из глутатиона и металотионеина (протеин богат цистеином) се координује за Pt(II) јон [45] и спречава интеракцију Pt(II) са ДНК а самим тим и њено антитуморско деловање [46]. Интеракција цисплатине са сумпор-везивним лигандима има негативан ефекат на њену антитуморску активност. Ове интеракције инхибирају антитуморску активност цисплатине, стварају резистентност и изазивају токсично деловање. Након дужег дозирања цисплатине у организму пацијената долази до повећања нивоа глутатиона и металотионеина у крви [47], а координовање глутатиона за цисплатину је катализовано глутатион *S*-трансферазом (GSTs). Настали GS-Pt(II) комплекс се избацује из ћелија помоћу АТФ-зависне пумпе (GS-X пумпа) (Слика 4) [48]. Терапијски ефекат цисплатине зависи од формирања адуката са ДНК у ћелији, који инхибира репликацију и транскрипцију ДНК.



Слика 4. Везивање цисплатине за глутатион и металотионенин [42]

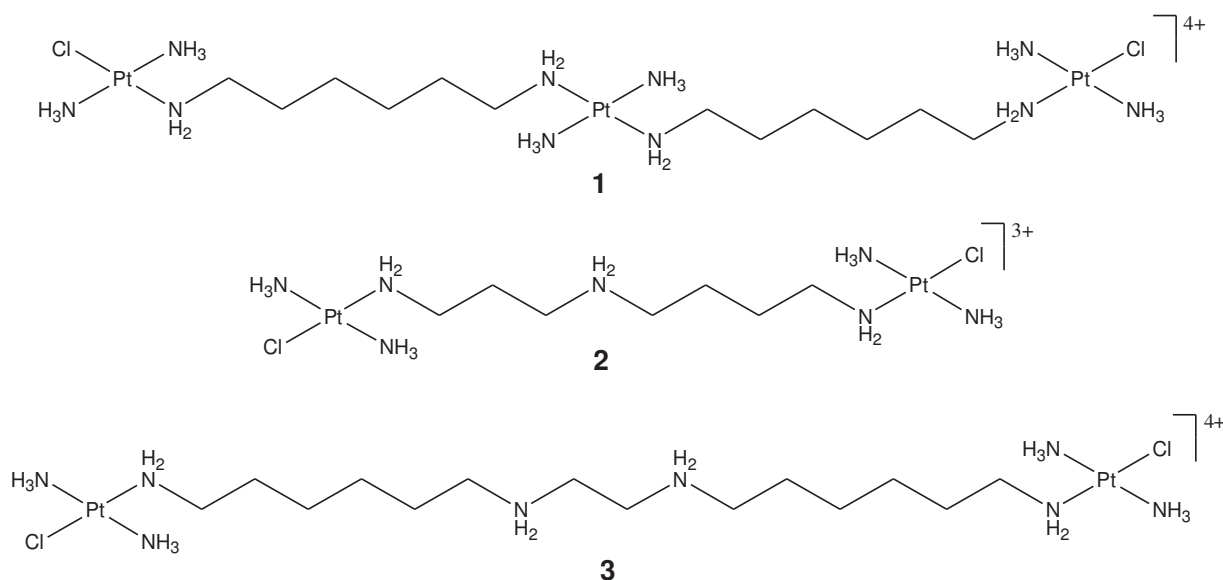
1.2. ПОЛИНУКЛЕАРНИ КОМПЛЕКСИ ПЛАТИНЕ(II)

Трећој генерацији антитуморски активних комплекса платине, који се већином налазе у предклиничким испитивањима, поред комплекса платине(IV), припадају и полинуклеарни комплекси платине(II) [49]. Ови комплекси у својој структури садрже два или више јона метала који су међусобно повезани мостним лигандима [6,50-56]. Као мостни лиганди највише су коришћени флексибилни алифатични диамини или крути мостни лиганди, као што су молекули азола и азина [50,51,56-59]. Разлог великог интересовања за изучавање полинуклеарних комплекса платине(II) је њихова способност да са молекулом ДНК формирају производе који се структурно разликују од оних које формирају цисплатина и слични комплекси.

Проблем примене мононуклеарних комплекса платине(II) у лечењу туморских обољења је, поред токсичног деловања и ограничене растворљивости појава резистенције након дуже примене. Истраживања су показала да туморске ћелије показују мању резистентност према динуклеарним комплексима у односу на мононуклеарне комплексе платине(II) [60]. Динуклеарни комплекси платине(II) који у својој структури имају исте монофункционалне лиганде могу постојати као *cis*- и *trans*-геометријски изомери. Нађено је да су *cis*- изомери кинетички инертнији у реакцијама са ДНК. С обзиром да полинуклеарни комплекси платине(II) у раствору постоје у катјонском облику њихова растворљивост у води је већа у односу на неутралне мононуклеарне комплексе [61].

Нађено је да серија BBR полинуклеарних комплекса платине(II) (полинуклеарни комплекси који садрже алифатичне диамине као мостне лиганде) реагује са ДНК брже у односу на цисплатину [62,63]. Истраживања су показала да ови комплекси остварују другачији начин везивања са ДНК у односу на цисплатину [55]. Један од првих испитиваних полинуклеарних платина(II) комплекса, $\{[trans-PtCl(NH_3)_2]_2(\mu-trans-Pt(NH_3)_2(NH_2(CH_2)_6NH_2)_2)\}^{4+}$ (Слика 5, комплекс **1**, BBR3464,) није прошао II фазу клиничких испитивања. Нађено је да тринуклеарни комплекс **1**, у *in vitro* условима, показује већу цитотоксичну активност према ћелијама које су резистентне у односу на цисплатину. Међутим, даља клиничка испитивања су показала да комплекс BBR3464 не показује цитотоксичну активност према хуманим канцерогеним ћелијама и зато су даља испитивања обустављена [64].

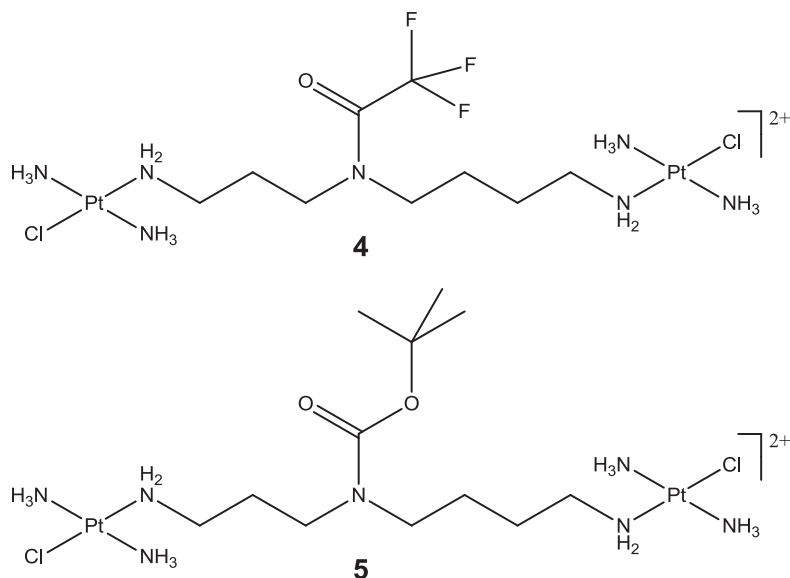
Друга генерација полинуклеарних комплекса платине, комплекси **2** (BBR3571) и **3** (BBR3610) (Слика 5), садрже две платине(II) јединице које су повезане полиамином као мостним лигандом.



Слика 5. Структурне формуле полинуклеарних комплекса платине(II) са полиаминским мостним лигандима, **1**-BBR3464, **2**-BBR3571 и **3**-BBR3610

Динуклеарни комплекси **2** и **3** су показали сличну антитуморску активност као и комплекс **1**. Међутим ови комплекси, индукују G2/M застој ћелијског циклуса у ћелијама глиома, док цисплатина индукује апоптозу. Ово је један од директних доказа да се механизам антитуморског деловања полинуклеарних комплекса платине разликује у односу на цисплатину [65]. Истраживања су показала да је комплекс **3** ефикаснији на ћелије HCT-116, DLD1, SW480 и HT29 карцинома дебелог црева у односу на комплекс **1**, цисплатину и оксалиплатину. Поред тога, истраживања на различитим фосфолипидима су показала да су ковалентне и нековалентне интеракције укључене у начину везивања позитивно наелектрисаних полинуклеарних комплекса платине са негативно наелектрисаним фосфолипидима [62]. С друге стране, висока цитотоксичност горе наведених комплекса у микро- до нано-моларном опсегу може да доведе до релативно уског терапеутског индекса и стога може ограничити њихову клиничку примену. У циљу превазилажења овог проблема, синтетизовани су комплекси са стерно супституисаним

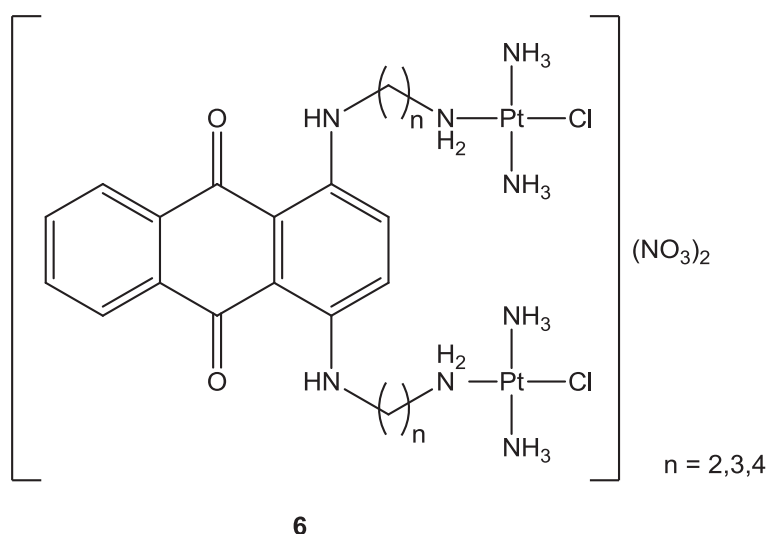
полиаминским лигандима, који су мање реактивни у *in vitro* условима, али су у стању да ослобађају стерно супституисане групе у *in vivo* условима.



Слика 6. Структурне формуле динуклеарних комплекса платине са супституисаном амино групом у полиаминском мостном лиганду

Комплекси **4** и **5** (BBR3537) (Слика 6) су деривати комплекса **2** (Слика 5). Комплекси, код којих је амино група у мостном лиганду супституисана, су показали знатно мању цитотоксичност у односу на комплексе који немају заштићену амино групу (комплекс **2**, слика 5). Међутим, цитотоксичност комплекса **4** и **5** није последица њихове хидролизе при физиолошком рН. Комплекси **3** и **4** се везују за ДНК у много већем проценту (90% односно 74%), док само 33% комплекса **2** и 6% цисплатине остварују исти начин везивања [66]. Оба комплекса такође показују мањи афинитет према хуманом серум албумину у односу на комплексе **1** и **2**, што указује да модификовањем мостних лиганда у полинуклеарним комплексима њихова реакција са протеинима у крви може бити знатно смањена [67].

Динуклеарни Pt(II) комплекс **6** (Слика 7) у структури садржи антрахинон, који има особину флуоресценције што омогућава да се комплекс прати помоћу флуоресцентне микроскопије. Комплекс **6** показује високу цитотоксичну активност у односу на A2780 ћелије, при чему је комплекс са најкраћим аминокрил ланцем најактивнији.



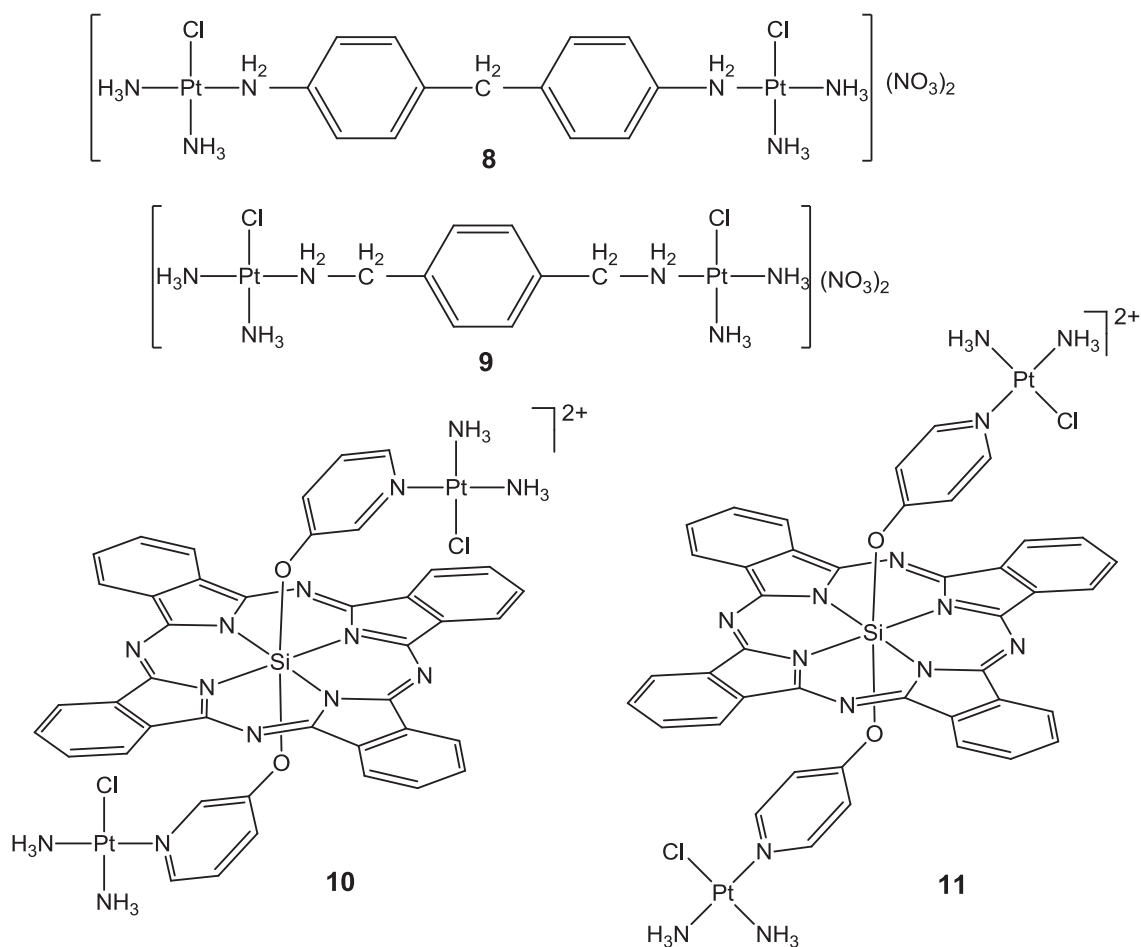
Слика 7. Шематски приказ динуклеарног Pt(II) комплекса који садржи дериват антхрахинона

Међутим, нађено је да су полинуклеарни комплекси платине(II) са 1,1/*t,t* структурним мотивом подложни разлагању у присуству нуклеофила који садрже сумпор (1,1/*t,t* и 1,1/*c,c* означава: 1,1 се односи на број одлазећих група са Pt(II) јона; *t,t* или *c,c* је геометрија у односу на мостни лиганд). Другим речима, супституција хлоридо лиганда са сумпор донорским лигандима, може да доведе до елиминације мостног полиаминског лиганда због *trans*-ефекта атома сумпора [68]. Ове реакције доводе до разлагања полинуклеарних комплекса и повећања њиховог токсичног ефекта у организму. Насупрот томе, у комплексима који имају 1,1/*c,c* геометрију, након супституције хлоридо лиганда са сумпор донорским молекулима, не долази до раскидања Pt(II)-мостни лиганд везе. Изучавања реакција 1,1/*c,c* динуклеарних комплекса платине(II) са нуклеофилима који садрже сумпор су показала да са тиолном групом из GSH настаје стабилни GS-мостни макрохелат [69], док у реакцији са тиоетрским атомом сумпора из *N*-ацетилованог L-метионина, настају различити динуклеарни комплекси платине(II), а примећена је и спора елиминација NH₃ лиганда [70].

Динуклеарни платина(II) комплекс **7** (Слика 8), који садржи бидентатно координован 1,2-диаминоциклохексан представља аналог оксалиплатине. У односу на комплекс **3** (Слика 5), овај комплекс садржи бидентатно координовани диамински лиганд, тако да је спречен *trans*-ефекат и бидентатни координовани диамин остаје координован за платину(II). Биолошка активност ових комплекса још увек није испитана [71].

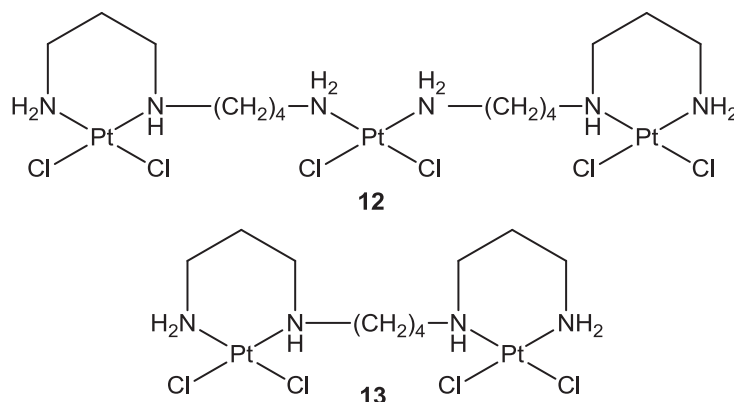
Волуминозни лиганди који су у *cis* положају у односу на лиганд који се лако супституише утичу на брзину реакције полинуклеарних комплекса платине(II) са GSH. Комплекс **8** има много већу способност везивања за ДНК у односу на комплекс **9**. Такође, комплекс **8** веома лако формира 1,3- и 1,4-интраланчана везивања са ДНК, док комплекс **9** првенствено формира 1,4-интраланчано везивање. Ови резултати показују да мостни лиганд има кључну улогу у начину везивања комплекса платине(II) за ДНК, као и на цитостатичну активност динуклеарних комплекса платине(II).

12



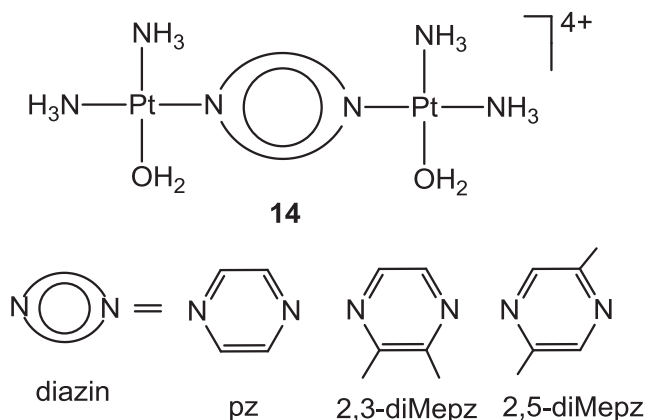
Слика 9. Структурне формуле 1,1/*c,c* монофункционалних динуклеарних Pt(II) комплекса (**8** и **9**), и 1,1/*c,c* монофункционалних комплекса коњугованих са фотодинамичким терапеутским агенсом силицијум-фталочијанином (**10** и **11**)

Полинуклеарни комплекси платине(II) **1-5** (Слика 5 и 6), **7** (Слика 8), **12** и **13** (Слика 10) као мостне лиганде садрже биогене полиамине спермидин, $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, и спермин, $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ [73]. Комплекси **12** и **13** показују прилично високу антипролиферативну и цитотоксичну активност према HeLa ћелијама и HSC-3 типу ћелија, а њихов утицај на здраве ћелије је реверзибилан након прекида уношења лека [74].



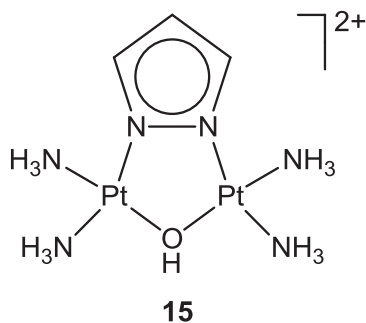
Слика 10. Структурне формуле полинуклеарних комплекса платине(II) који као мостни лиганд садрже алифатичне полиамине спермидин **12** и спермин **13**

Као што је раније поменуто, у синтези динуклеарних комплекса Pt(II) као нефлексибилни мостни лиганди коришћени су молекули азина [75]. Структурне формуле неких динуклеарних комплекса платине(II) са пиразином и његовим супституисаним дериватима приказане су на слици 11. На пример, динуклеарни Pt(II) комплекси, који као мостне лиганде садрже диазине (Слика 11), показали су знатно већу цитотоксичност према канцерогеним ћелијским линијама WIDR (дебелог црева) и IGROV (јајника) у односу на цисплатину. Такође ови комплекси су показали изузетну цитотоксичност према L1210 ћелијској линији леукемије код мишева која је резистентна на цисплатину [76,77].



Слика 11. Динуклеарни комплекси $\{[trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-(diazin)})\}^{4+}$ типа

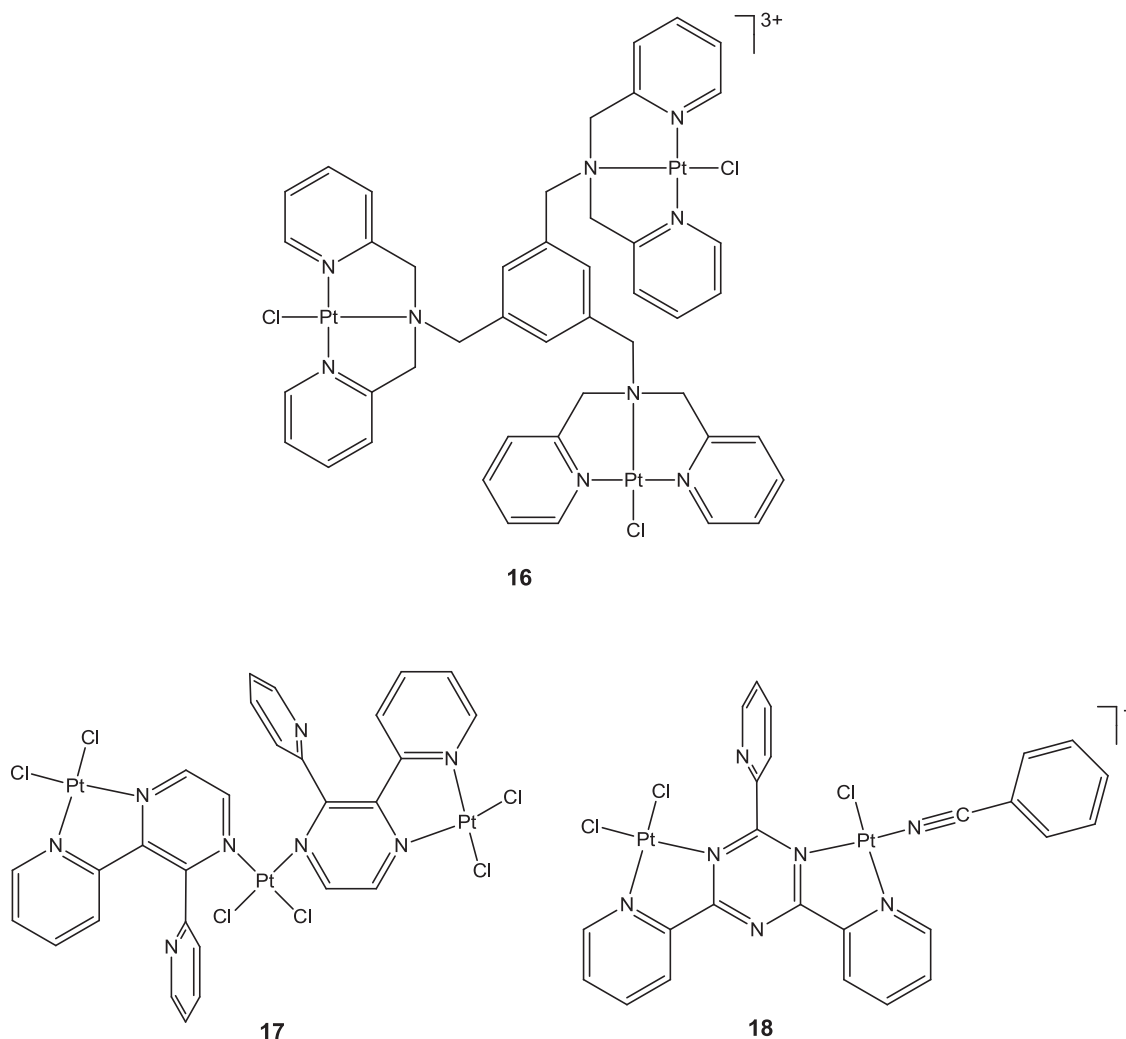
Динуклеарни Pt(II) комплекс **15** (Слика 12), који као мостни лиганд садржи пиразол и OH⁻ јон као одлазећи лиганд, показао је око 40 пута већу цитотоксичност у поређењу са цисплатином према MCF-7 ћелијама. Овај комплекс реагује знатно спорије са ДНК и главни производ реакције је интраланчани 1,2-d(GpG) адукт. У поређењу са дисторзијом 1,2-d(GpG) умрежавања изазваном цисплатином од 55-78°, комплекс **15** индукује релативно мале структурне промене на двоструком хеликсу ДНК од само 15° [78,79].



Слика 12. Динуклеарни платина(II) комплекс са пиразолом као мостним лигандом

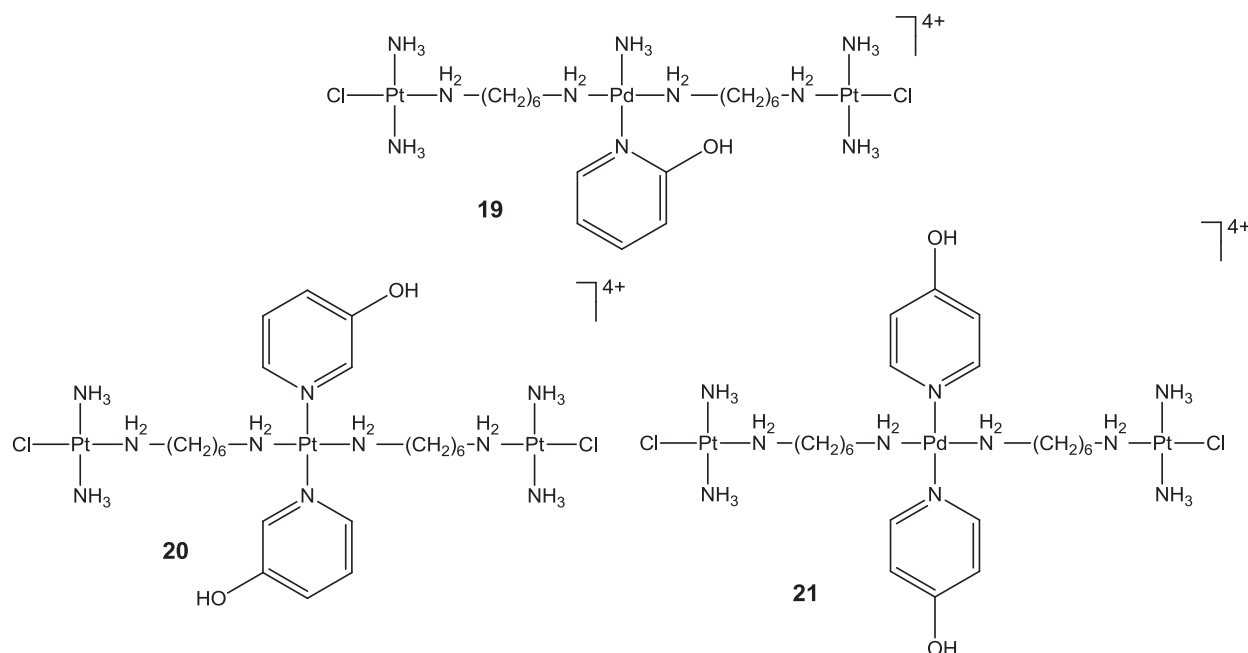
Мостни лиганд у тринуклеарном 3*N*-хелатном монофункционалном Pt(II) комплексу **16** (Слика 13) мање је флексибилан у односу на алифатичне полиамине, али је флексибилнији у поређењу са диазинима и диазолима. Због структуре мостног лиганда комплекс **16** гради веома повољне везе са ДНК. У поређењу са цисплатином комплекс **16** показује бољу цитотоксичност у односу на P-388 и A549 ћелијске линије. Нађено је да овај комплекс у реакцијама са GSH формира моно- и дисупституисане производе као што су [Pt₃Cl(OH)₂L(GS)]²⁺ и [Pt₃(OH)₂L(GS)₂]²⁺ [80]. Захваљујући комбинацији флексибилног мостног лиганда и његове величине, која одређује растојање између Pt(II) јона, комплекс **16** може у реакцији са ДНК да формира интра- и интер-ланчана ДНК умрежавања.

За разлику од полинуклеарних Pt(II) комплекса који садрже, мостне флексибилне алифатичне полиаминске лиганде, полинуклеарни комплекси **17** и **18** (Слика 13) имају ограничену флексибилност. Оба комплекса показују цитотоксичну активност према ћелијским линијама хуманог хепатома (HepG2) и хуманог колоректалног карцинома (HT29) при чему је комплекс **17** мање активан у односу на комплекс **18**.



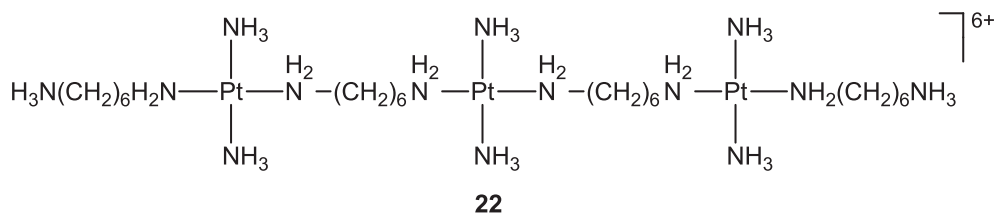
Слика 13. Структурне формуле полинуклеарних комплекса платине(II) са флексибилним и крутим мостним лигандима

Тринуклеарни комплекси **19-21** (Слика 14) су структурни аналози BBR3464 комплекса (**1**). Присуство једног или два аминска лиганда на централном јону метала, омогућавају додатне нековалентне интеракције са ДНК. Комплекси **19** и **20** показују већу цитотоксичност у односу на цисплатину према ћелијским линијама хуманог карцинома јајника (A2780, A2780dsR и A2780ZD0473R). За разлику од цисплатине, комплекси **19-21** формирају интерланчане GrG адукте. Међутим, нађено је да су ови комплекси нестабилни и у ћелији долази до њиховог разлагања [81-83].



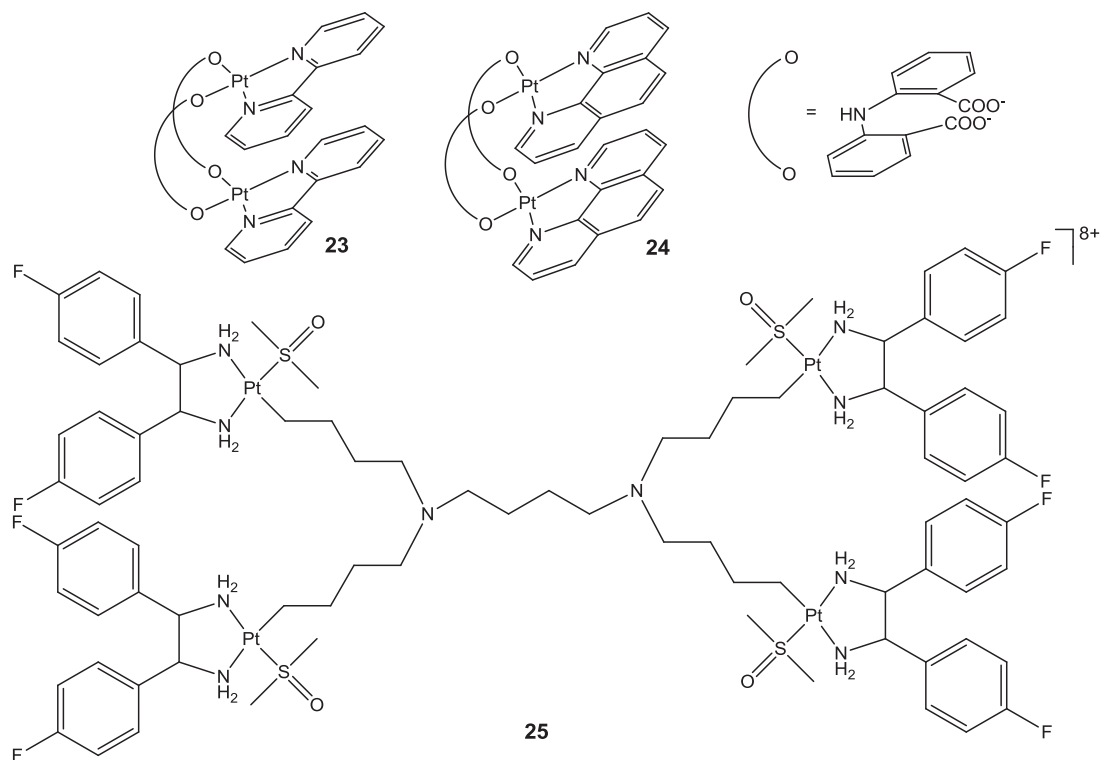
Слика 14. Тринуклеарни комплекси платине(II) са једним или два аминска лиганда на централном платина(II) јону

Нађено је да су нековалентне интеракције комплекса платине(II) са ДНК од великог значаја у погледу цитотоксичности комплекса [84]. Нови трендови у дизајнирању цитостатика друге генерације полинуклеарних комплекса платине(II) фокусирани су на комплексе који могу остварити нековалентне интеракције са ДНК [85]. Тринуклеарни Pt(II) комплекс **22** (TriplatinaNC) (Слика 15) је структурни аналог BBR3464, у којем су хлоридо лиганди супституисани са $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$. Комплекс **22** показује микромоларну активност према ћелијским линијама хуманог карцинома јајника [86]. Пошто комплекс не може остварити ковалентну везу са ДНК, он остварује искључиво нековалентне интеракције.



Слика 15. Структурна формула тринуклеарног Pt(II) комплекса (TriplatinaNC)

Последњих неколико година синтетизовани су и тестирани неконвенционални полинуклеарни комплекси платине(II) са различитим мостним лигандима (Слика 16). Неки од њих показали су завидну антитуморску активност [87,88].

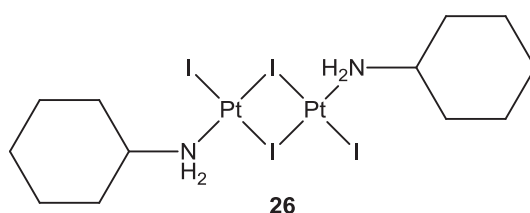


Слика 16. Структурне формуле неконвенционалних полунуклеарних комплекса платине(II)

Тестови на ћелијским линијама хуманог карцинома HeLa, HepG2, KB и AGZY-83 су показали да комплекси **23** и **24** (Слика 16) показују већу цитотоксичну активност и специфичност у односу на конвенционалне хемиотерапеутске агенсе. Комплекс **23** везује се за ДНК ковалентном везом, али постоје и нековалентне интеракције [87]. Тетрануклеарни Pt(II) комплекс **25** (Слика 16) везује се за хумани серум албумин хидрофобним и електростатичким интеракцијама. Због тих интеракција ћелијска апсорпција овог комплекса је за око 20 пута већа у односу на цисплатину.

Комплекс **26** (Слика 17) је цитотоксичан према HL-60 (незрели гранулоцити леукемије), HCT-8 (карцином дебелог црева), MCF-7 (карцином дојке), BGC-823

(карцином желуца) и EJ (карцином бешике) ћелијским линијама са IC_{50} вредностима од 0,02; 1,70; 4,00; 0,98 и 1,02 μM . LD_{50} је 815.3 mg/kg, што је знатно више у односу на цисплатину и карбоплатину. Поред тога, овај комплекс показује значајну активност према A2780 и HCT-116 код мишева у дози од 12 mg/kg, активност је слична цисплатини у дози од 4 mg/kg. Ови резултати показују да нови динуклеарни комплекси платине могли бити обећавајући агенси за лечење туморских обољења [88].



Слика 17. Структурна формула $\{[Pt(Cx-NH_2)I]_2(\mu-I)_2\}$ комплекса

1.3. ХИДРОЛИЗА ПЕПТИДА ПОМОЋУ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ПАЛАДИЈУМА(II)

Протеини су кључни градивни елементи живе ћелије сваког организма. Протеини као биолошки полимери настају повезивањем великог броја аминокиселина пептидном везом. Сваки протеин има јединствену аминокиселинску секвенцу која је одређена секвенцом нуклеотида у гену. Међусобним повезивањем више од 100 аминокиселина настају протеини, а мање од 100 пептиди. Пептиди као и протеини имају веома важну биолошку улогу и могу бити хормони (хормони хипоталамуса и хипофизе окситоцин и вазопресин, адренокортикотропин, хормони гуштераче, инсулин, глукагон итд.), антибиотици (пеницилин је измењени дипептид валина и цистеина), преносиоци нервних импулса (пентапептиди енкефалини), коензими (глутатион као оксидо-редукциони коензим), а могу бити и врло јаки отрови (неки змијски отрови су пептиди) или улазити у састав цитостатика. У многим биолошким процесима долази до хидролизе пептидне везе у пептидима и протеинима. Полувреме хидролизе неактивираних пептидних веза у неутралној средини је око 500 година [89]. Са хемијске тачке гледишта екстремна инертност чини ову везу веома интересантном. За раскидање пептидне везе коришћени су различити

протеолитички ензими, али је њихова примена ограничена с обзиром на стриктне услове температуре и рН вредности средине [90].

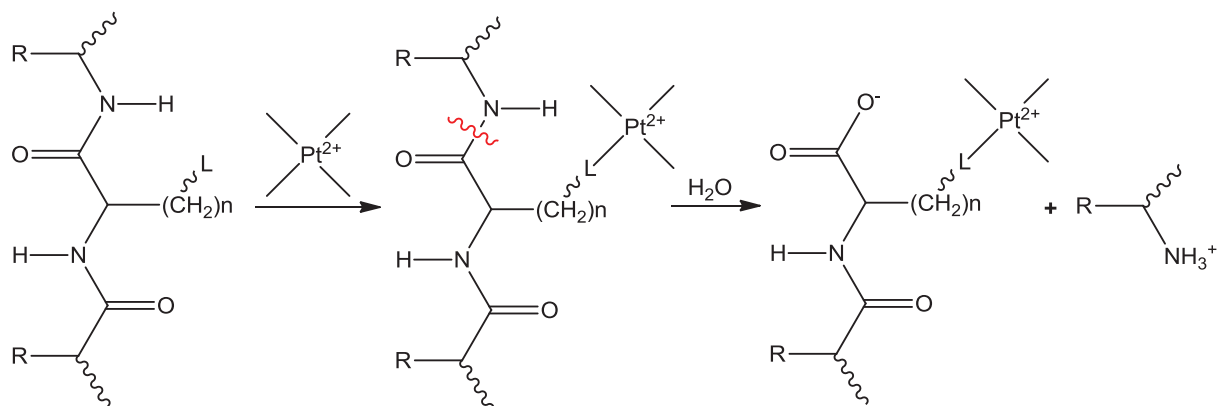
Селективна хидролиза пептида и протеина је врло значајан поступак за одређивање секвенце протеина, као и за друге биолошке трансформације ових сложених једињења [90]. Најједноставнији реагенси који су коришћени за хидролизу пептидне везе су цијаноген-бромид (CNBr), 3-бром-3-метил-2-(2'-нитрофенилсулфенил)-индолеин (BNPS-скатол), *N*-бромсукцинимид и многи други [91]. Ендопептидазе показују добро каталитичко дејство и селективност, али места на којима се пептиди и протеини цепају су многобројна, а добијени фрагменти су често веома сложени. Овако добијени фрагменти протеина могу бити различите дужине и често су непогодни за даље секвенционисање. Употребом CNBr може се заобићи тај проблем, али овај реагенс је веома непостојан и токсичан. Због напред наведених чињеница неопходно је било наћи нове реагенсе који ће имати већу селективност и јаче изражена каталитичка дејства.

У току последње три деценије, као нови реагенси за хидролизу пептидних веза често се користе комплекси јона прелазних метала [3,4,92]. Ови комплекси могу селективно хидролизovati пептидне везе у пептидима и протеинима. Осим тога што се користе за одређивање секвенце протеина, комплекси метала су нашли примену код синтеза различитих протеина. Поред тога, ови реагенси се могу користити и за изучавање конформација и других особина протеина. Такође, изучавањем механизма по којем јони прелазних метала катализују селективну хидролизу пептидне везе може се разјаснити улога јона метала у активним центрима природних протеаза.

Истраживања у овој области су показала да координовање комплекса паладијума(II) и платине(II) за бочни низ неких аминокиселина (L-хистидина, L-метионина и L-триптофана) доводи до хидролизе пептидне везе која је настала из карбоксилне групу координоване аминокиселине [93-95]. Шема реакције хидролизе пептидне везе која је настала из карбоксилне групу координоване аминокиселине приказана је на слици 18.

Примена комплекса платине(II) и паладијума(II) у наведеним хидролитичким реакцијама представља нову методу за селективну хидролизу пептидне везе у пептидима и протеинима. Детаљно је изучаван механизам ових хидролитичких реакција тестирајући различите комплексе паладијума(II) и платине(II) који у будућности могу наћи практичну

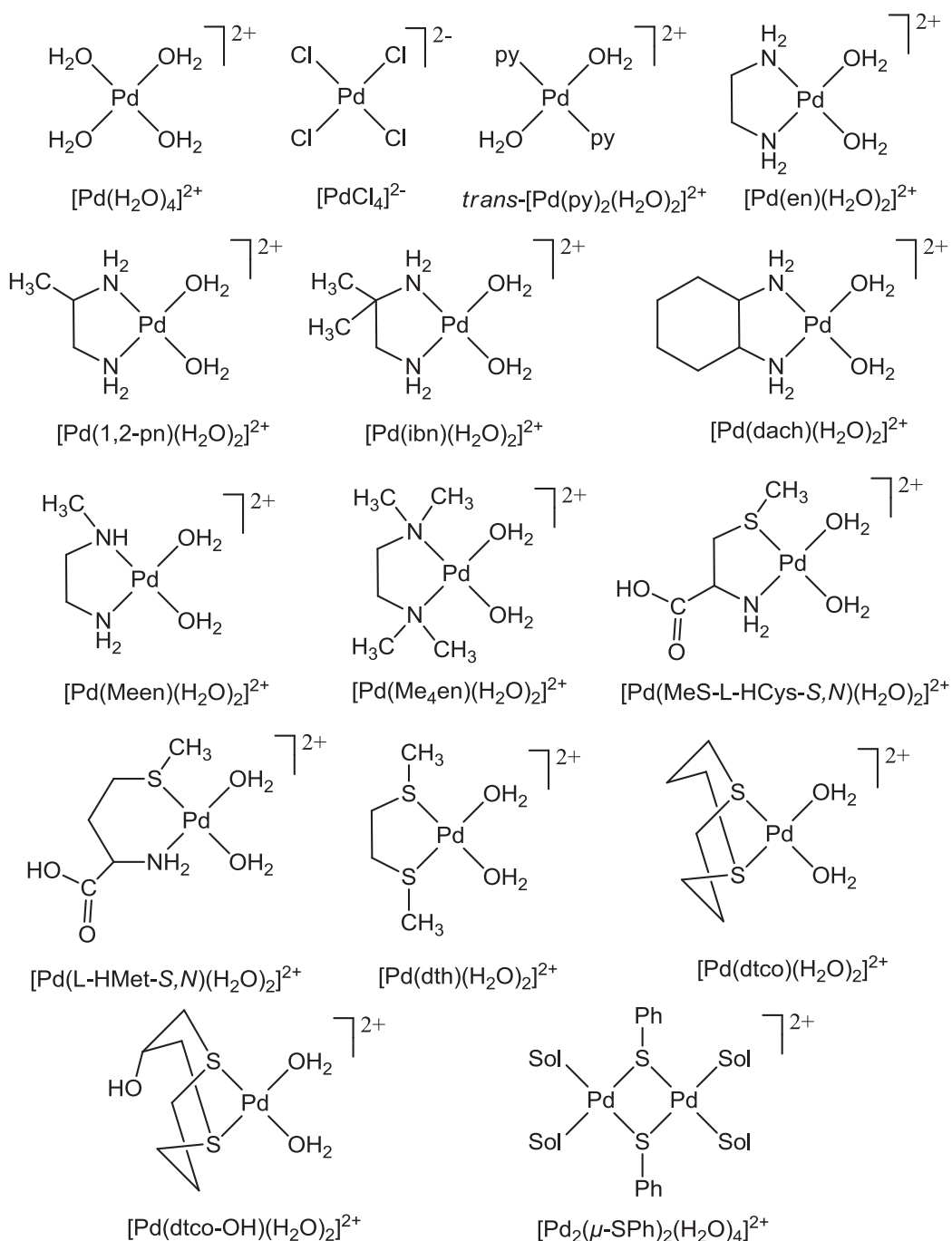
примену.



Слика 18. Општа шема хидролизе пептидне везе у пептидима и протеинима помоћу комплекса платине(II)

Прва изучавања хидролитичких реакција пептида и протеина испитивана су са комплексима платине(II), али се убрзо прешло на мање стабилне комплексе паладијума(II). Утврђено је да хидролитички активни комплекси паладијума(II) и платине(II) морају имати, од укупно четири, најмање два координациона места слободна (једно за координовање за бочни низ аминокиселине, а друго за интеракцију са најближом пептидном везом која се раскида). Према томе, потребно је да комплекс садржи најмање два лабилна лиганда, као што је молекул воде, тако да се брзо могу супституисати у реакцији са пептидима. Преостала два координациона места у структури квадратно-планарног комплекса платине(II) или паладијума(II) заузима неки бидентатни лиганд, који остаје координован за јон метала у току хидролитичких реакција. Испитивани су комплекси са различитим бидентатним лигандима, који имају различите стерне и кинетичке ефекте.

На слици 19 приказани су комплекси паладијума(II) који су показали каталитичку активност у реакцијама са пептидима. Приказани Pd(II) -аква комплекси добијени су од одговарајућих хлоридо комплекса таложењем Cl^- јона са Ag^+ јонима [96]. Када се као катализатор употреби $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ комплекс хидролиза пептидне везе је веома брза, али на $\text{pH} > 2,0$ долази до полимеризације паладијум(II) комплекса преко хидроксилих група.



Слика 19. Структурне формуле неких комплекса паладијума(II) који су коришћени као катализатори за хидролизу пептида и протеина

Остали комплекси Pd(II) приказани на слици 19 су значајно стабилнији при овако ниским рН вредностима. Ако се аква лиганд у Pd(II) комплексима приказаним на слици 19

супституише са неким ањонским лигандом каталитичка способност овог комплекса се знатно смањује. Тако на пример, $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ комплекс има знатно мању каталитичку активност у односу на $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ комплекс. С обзиром да су комплекси паладијума(II) и платине(II) дијамагнетични њихове реакције са пептидима се могу пратити помоћу ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије. Пошто ^{195}Pt језгро има нуклеарни спин $\frac{1}{2}$ потребне информације о структури Pt(II) комплекса могу се такође, добити из ^{195}Pt NMR спектра. NMR спектри различитих комплекса платине(II) и паладијума(II) са аминокиселинама и пептидима су детаљно описани у литератури [97]. Код пептида који не садрже хетероатом у бочном низу, да би дошло до координације Pd(II) и Pt(II) за неки од атома из пептидне везе неопходно је да се ови јони метала претходно монодентатно координују за атом азота из *N*-терминалне амино групе. У следећој фази ови јони метала се координују за атом азота из пептидне везе, што захтева његову депротонацију. На овај начин може доћи до потпуног координовања јона метала за пептид при чему настају квадратно-планарни комплекси који садрже три хелатна петочлана прстена [98].

За разлику од Pt(II), Pd(II) јон депротонује пептидни азот при веома ниским рН вредностима [99]. Тако на пример, нађено је да су рКа вредности депротовања азота пептидне везе у трипептиду Gly-Gly-Gly у реакцији са Pd(II) јоном приближно 2 за прву и 4 за другу пептидну везу [99].

Бочни низ пептида који чине аминокиселине L-цистеин, L-метионин и L-хистидин се много лакше координује за Pd(II) и Pt(II) јоне у односу на азотов атом из *N*-терминалне амино групе. Ови јони метала се координују за бочни низ преко тиолног атома сумпора из цистеина, тioenарског атома сумпора из метионина и два имидазолова атома азота из хистидина. Након координације за неки од наведених атома из бочног низа, монодентатно координовани Pd(II) јон веома лако, при $\text{pH} < 2,0$ депротонује пептидни азот суседне пептидне везе и гради стабилан хелатни комплекс. Овако настали хелат стерно успорава хидролизу одговарајуће пептидне везе. Насупрот овоме, координација Pd(II) јона за карбонилни кисеоников атом пептидне везе повећава парцијално позитивно наелектрисање на атому угљеника што доприноси бржој хидролизи пептидне везе [99]. Хелатни паладијум-пептидни комплекс, настао координовањем одговарајућег комплекса Pd(II) преко неког од донорских атома из бочног низа и депротонованог атома азота најближе пептидне везе која се налази на *N*-терминалној страни пептида, представља

веома крут систем који онемогућава интеракцију Pd(II) јона са суседном пептидном везом на карбоксилној страни пептида, а самим тим и њену хидролизу.

1.3.1. Хидролиза пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L-цистеин помоћу мононуклеарних комплекса платине(II) и паладијума(II)

Јони Pt(II) и Pd(II) су ”меке” Луисове (Lewis) киселине и лако се координују за тиолну групу из L-цистеина и тиоетарску групу из L-метионина и S-метил-L-цистеина. Монодентатно координовани јони ових метала се могу хелатно координовати за депротоновани пептидни азот суседне пептидне везе. Брзина настајања бидентатног метал-пептид комплекса директно зависи од pH вредности раствора. Поред тога, бидентатна координација јона метала (тзв. S,N-координација) фаворизована је формирањем петочланог (код цистеина) или шесточланог (код метионина) хелатног прстена (тзв. *хелатни ефекат*) [98,100,101].

Прва испитивања су показала да координовањем Pt(II) за бочни низ аминокиселина метионина, цистеина и S-метил-цистеина у пептидима доводи до хидролизе пептидне везе која настаје из карбоксилне групе координоване аминокиселине [102]. Ова хидролиза пептидне везе у присуству Pt(II) комплекса се одиграва у киселој средини. Резултати испитивања су показали да се хидролиза одговарајуће пептидне везе не дешава због киселе средине раствора већ под утицајем одговарајућег комплекса платине(II).

Хидролиза пептида, као што су Ac-L-Met-Gly, Leu-Gly, Ac-L-Met, редуковани глутатион и S-метил-глутатион, је испитивана у pH области од 0,8 до 7,0. Комплекси платине(II) који су коришћени за реакције хидролизе ових пептида представљају структурне аналоге комплекса паладијума(II) (види Слику 19). Поред комплекса чије су структурне формуле приказане на слици 19, испитивани су и други комплекси платине(II) који садрже хелатно координоване 2,2'-бипиридин (bpy), диетилентриамин (dien) и 2,2',6,6'-терпиридин (terpy) лиганде. За карактерисање комплекса који настају у реакцији Pt(II) са S-донорским лигандима, као и за одређивање вредности константе брзине хидролизе, коришћена је ^{195}Pt , ^{13}C и ^1H NMR спектроскопија.

Резултати испитивања показују да у случају када аминокиселина у бочном низу пептида не садржи донорски атом погодан за координовање Pt(II) јона, као на пример Leu-Gly, не долази до хидролизе пептидне везе. Према томе, хидролиза пептида катализована

јонима метала могућа је само у случају координовања Pt(II) за неки од хетероатома у бочном низу. Кинетичка испитивања су показала да су реакције хидролизе пептидне везе првог реда у односу на комплекс платина-пептид, а вредност константе брзине хидролизе се смањују са повећањем pH вредности раствора. Такође, хлоридни јони координовани за Pt(II) инхибирају реакцију хидролизе пептида. Нађено је да код хлоридо комплекса прво мора доћи до хидролизе одговарајућег хлоридо лиганда, тј. његове супституције са аква лигандом, да би у наредној фази настали аква комплекс катализовао хидролизу пептидне везе. На овај начин потврђен је велики значај координованог аква лиганда у механизму хидролизе пептидне везе у присуству комплекса Pt(II).

Каталитичка способност Pt(II) комплекса зависи од врсте полидентатног лиганда координованог за овај јон метала. Тако, Pt(II) комплекси са тридентатним лигандима, као што су *terpy* или *dien*, координују се за бочни низ у пептиду, али не могу хидролизovati пептидну везу. Из овога се може закључити да су најмање два слободна координациона места у квадратно-планарном комплексу Pt(II) неопходна да би овај комплекс показао каталитичку способност. Под слободним координационим местом се подразумева да је за Pt(II) јон координован неки монодентатни лиганд који је слабом везом повезан са јоном метала (на пример аква лиганд). Од два слободна координациона места у комплексу Pt(II), једно је неопходно за координацију за хетероатом у бочном низу пептида (прва фаза), док се преко другог координационог места одвија интеракција јона метала са одговарајућом пептидном везом која хидролизује (друга фаза). Нађено је да стерни ефекат бидентатно координованог лиганда има утицај на хидролизу пептидне везе. Тако на пример, волуминозни бидентатни лиганд, као што је бипиридин, у потпуности инхибира хидролитичке реакције. Са мање волуминозним лигандима, као што је етилендиамин, полувреме хидролизе се мери данима. Међутим, када се као катализатор користи $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ полувреме хидролизе је свега неколико часова. На основу ових испитивања утврђено је да до хидролизе пептидне везе долази само онда када је Pt(II) јон довољно близу пептидне везе.

Први резултати испитивања реакција хидролизе пептида у присуству комплекса паладијума(II), као што су $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ и $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ (Слика 19) су показали да су ови комплекси много ефикаснији у односу на аналогне комплексе платине(II). Тако на пример, у реакцији комплекса Pd(II) са Ac-L-Met-Gly полувреме реакције хидролизе овог пептида

је мање од 30 минута [103]. Резултати који су добијени на основу детаљних кинетичких испитивања серије дипептида Ас-L-Met-X, где X представља Gly, Ala, Ser, Val, Leu и Ala-Ser, дали су велики допринос изучавању механизма хидролитичких реакција пептида које су катализоване комплексима паладијума(II) [104]. Као катализатори коришћени су $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{dtco})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекси (где је dtco 1,5-дителиоциклооктан), док су реакције хидролизе изучаване на температури од 40 °C до 50 °C и при интервалу $1,0 \leq \text{pH} \leq 2,0$. У свим случајевима реакција хидролизе пептида била је региоселективна, при чему хидролизује само пептидна веза која је настала из карбоксилне групе метионина. У случају Ас-L-Met-Ala-Ser пептида нађено је да у присуству комплекса паладијума(II) хидролизује само Met-Ala пептидна веза. Наведени пептиди се разликују у C-терминалној аминокиселини (стерно су различите). Испитивања показују да стерни ефекат ових аминокиселина значајно утиче на вредности константе брзине хидролизе, тако да волуминозније C-терминалне аминокиселине смањују њену вредност. Нађено је да супституенти на α -C и β -C угљениковим атомима смањују вредности константе брзине реакција, односно успоравају реакцију хидролизе. Резултати испитивања показују да је утицај супституента на γ -C угљениковом атому приближно 100 пута мањи, док супституент на δ -C атому нема ефекат на брзину хидролизе пептидне везе [104].

Утицај стерног ефекта на брзину хидролизе може се употребити за постизање селективности у секвенционисању пептида и протеина. Резултати показују да је вредност константе брзине хидролизе код пептида код којих је одлазећа група Ala-Ser за половину мања у односу на ову константу када је одлазећа група само Ala. На основу тога је закључено да реакције са другим супституентима морају бити спорије у односу на реакције са краћим ланцима, иако долази до раскидања исте пептидне везе у оба случаја.

Нађено је да брзина и механизам хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ас-L-Met-Gly пептиду искључиво зависи од природе бидентатно координованог лиганда L у паладијум(II) комплексима типа $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, где је L етилендиамин (en), 1,2-пропилендиамин (1,2-pn), изобутилендиамин (ibn), 1,2-диаминоциклохексан (dach), N-метилетилендиамин (Meen), N,N,N',N'-тертраметилетилендиамин (Me₄en), S-метил-L-цистеин (MeS-L-Cys), L-метионин (L-Met) и 2,5-дителиохексан (dth) [105]. Резултати испитивања показују да су комплекси са бидентатно координованим диаминским лигандима ефикаснији катализатори хидролизе пептидне везе у односу на комплексе са

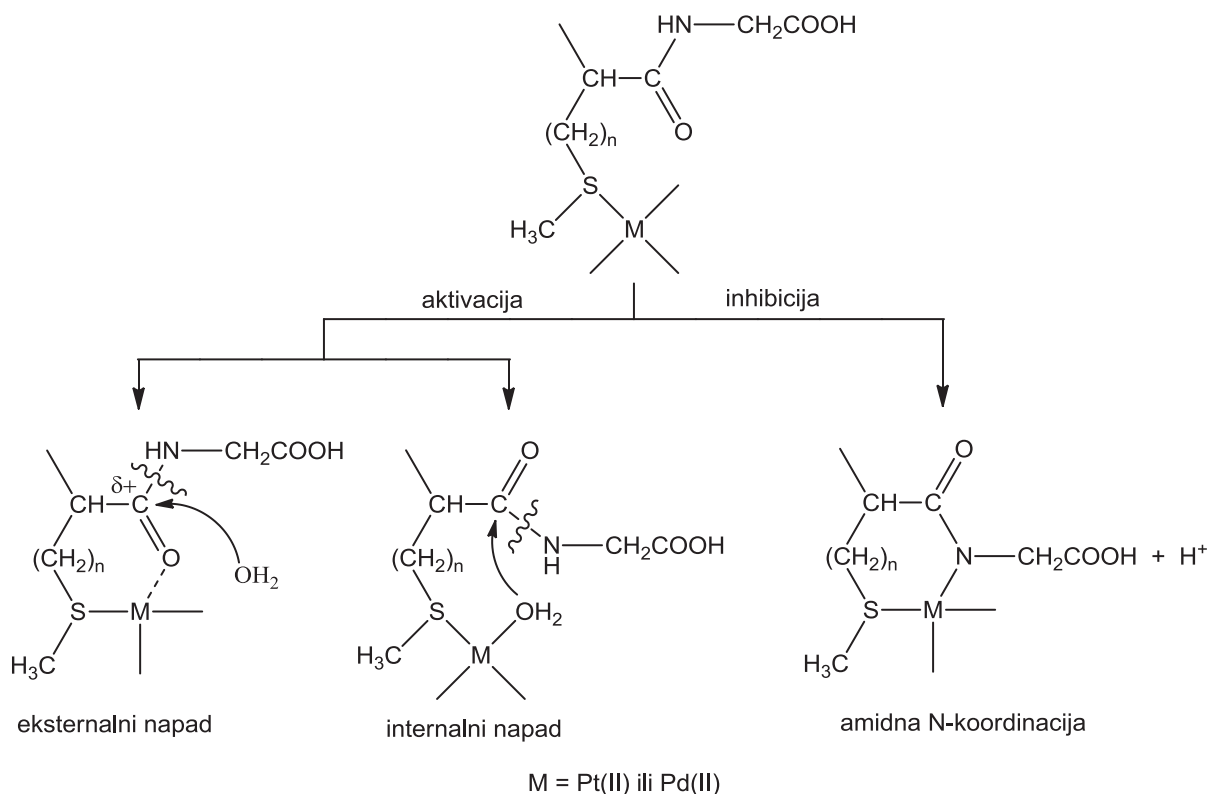
бидентатно координованим *S*-метил-*L*-цистеином, *L*-метионином и 2,5-дитиохексаном.

1.3.2. Механизам хидролизе пептида који садрже аминокиселине *L*-метионин и *L*-цистеин помоћу мононуклеарних комплекса платине(II) и паладијума(II)

Механизам реакције хидролизе пептида у присуству комплекса платине(II) и паладијума(II) као катализатора је веома сложен. Хидролиза пептида са комплексима ова два јона метала детаљно је изучавана и познате су кинетичке вредности многих реакција. Као што је познато, Pd(II) и Pt(II) јони имају велики афинитет за сумпор-везивне лиганде и брзо се координују за бочни низ *L*-цистеина, *S*-метил-*L*-цистеина и *L*-метионина. Уопштено се може рећи да се реакције хидролизе пептидне везе могу одвијати на два начина (Слика 20). Прва фаза у овим реакцијама је монодентатна координација Pt(II) и Pd(II) јона за бочни низ пептида. Ако се овако координован комплекс паладијума(II) даље координује за депротоновани пептидни азот, при чему настаје стабилан хелатни комплекс, не долази до хидролизе пептидне везе. Међутим, ако комплекс метала интерреагује са карбонилним атомом кисеоника из пептидне везе хидролиза је могућа. Интеракција јона метала са кисеониковим атомом условљава поларизацију карбонилне групе, па карбонилни атом угљеника постаје парцијално позитиван и погодан за нуклеофилни напад молекула воде. Молекул воде у овом случају потиче из растварача, па се овај механизам назива *екстернални начин* раскидања пептидне везе. Друга могућност је да молекул воде координован за јон метала врши нуклеофилни напад на угљеник карбонилне групе из одговарајуће пептидне везе. Молекул воде неопходан за хидролизу у овом случају потиче из комплекса метала, па се овај начин назива *интернални механизам* раскидања пептидне везе. Као што се види, разлика између ова два механизма је у пореклу молекула воде. Такође, могуће је да се ова реакција одвија комбинацијом ова два механизма. Оба механизма имају исти кинетички пут [104].

Екстернални напад је доминантан када је фаворизовано формирање прстена, као на пример код хидролизе *S*-метил-глутатиона, где настаје шесточлани хелатни прстен. Интернални механизам је фаворизован у случају када дужина бочног низа омогућава интеракцију молекула воде из комплекса са пептидном везом која се раскида, док је тада екстернални механизам немогућ јер захтева настајање већих прстенова (већих од шесточланог прстена) који су веома нестабилни [104]. Према томе, у конкретном случају

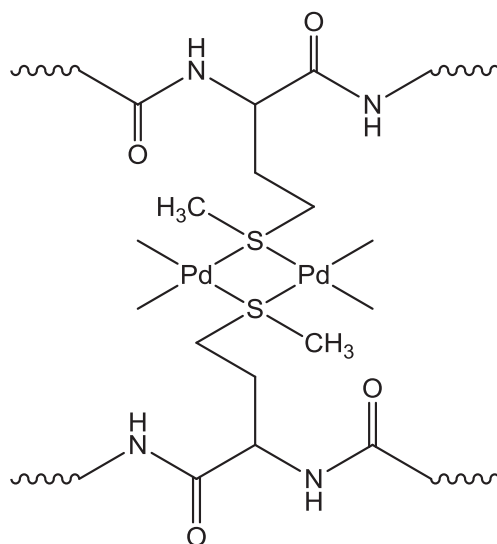
хидролиза Ac-L-Met-Gly пептида мора се одвијати по интерналном механизму, јер би за екстернални механизам било неопходно грађење седмочланог хелатног прстена



Слика 20. Шематски приказ *интерналног* и *екстерналног* начина хидролизе пептидне везе у присуству $Pt(II)$ и $Pd(II)$ комплекса [104]

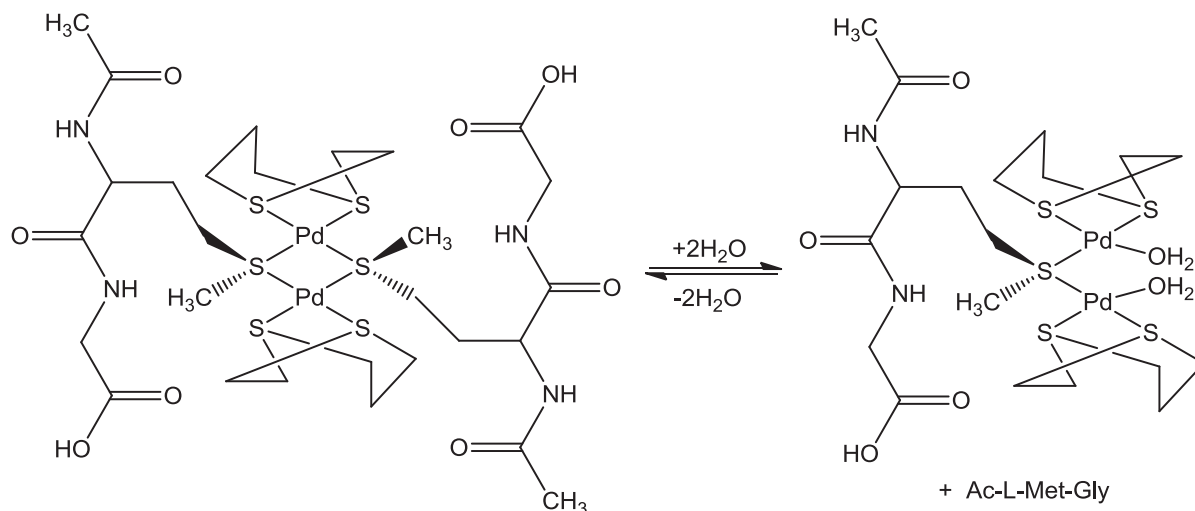
На основу NMR спектроскопских података закључено је да различити хидролитички активни комплекси дају различите производе хидролизе. Када се у раствор пептида дода $[PdCl_4]^{2-}$ каталитички активна форма је мононуклеарни паладијум(II)-пептид комплекс. Међутим, када се пептид помеша са $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ настаје динуклеарни комплекс у коме су терминални лиганди молекули воде (Слика 21). Сви аква лиганди у овом комплексу су у *trans*-положају у односу на тиоетарски лиганд због чега су врло лабилни (*trans*-ефект). Насупрот овоме молекули воде су у приказаном комплексу у *cis*-положају у односу на супстрат због чега је могућа његова хидролиза. На основу кинетичких и стереохемијских ефеката може се закључити да су динуклеарни комплекси каталитички много ефикаснији у односу на одговарајуће мононуклеарне комплексе. У случају

$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{Me}_4\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $\text{trans}-[\text{Pd}(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ азот-донорски лиганди се супституишу са молекулима воде, при чему настаје динуклеарани паладијум(II)-пептид комплекс идентичан ономе који настаје у реакцији са $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (Слика 21) [105,106].



Слика 21. Структурна формула каталитички активног динуклеарног Pd(II)-пептид комплекса који настаје у реакцији пептида који садрже тиоетарски атом сумпора у бочном ланцу са $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ комплексом [104-106]

У случају испитивања реакција $[\text{Pd}(\text{dtco})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са пептидима који у бочном низу садрже тиоетарски атом сумпора кинетички и NMR подаци указују на постојање динуклеарног хидролитички активног комплекса који има два бидентатна 1,5-дитиоциклооктанска (dtco) лиганда (Слика 22). Овај динуклеарни комплекс нема аква лиганде, али је ипак хидролитички активан. Каталитички активна форма паладијум(II)-пептид комплекса настаје дисоцијацијом једног од пептидних лиганда из динуклеарног комплекса. Присуство слободног пептида у равнотежној реакцији, приказаној на слици 22, потврђено је помоћу NMR спектроскопије. На овај начин формира се једномостни комплекс који има два аква лиганда у положају који је неопходан за хидролизу пептидне везе (Слика 22).



Слика 22. Структурна формула динуклеарног хидролитички активног комплекса који настаје у реакцији пептида који садрже L-метионин или S-метил-L-цистеин са $[\text{Pd}(\text{dtco})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ [104]

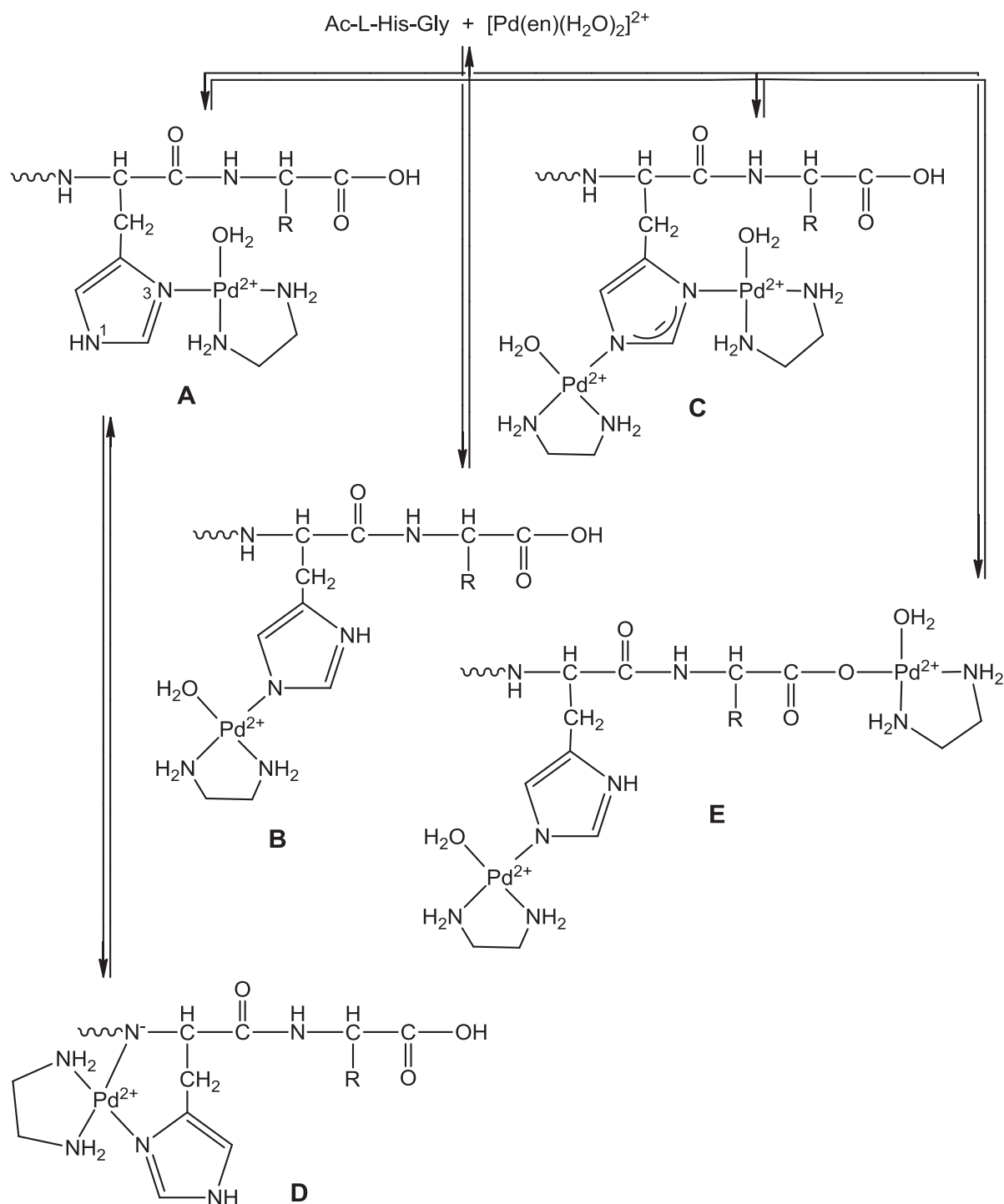
На основу NMR и кинетичких изучавања реакција инхибиције процеса хидролизе пептидне везе потврђено је да динуклеарни комплекс представља каталитички активну форму. У овим комплексима постоји могућност за интеракцију два јона метала. Ова кооперативност јона метала, такође је запажена и код динуклеарних комплекса који хидролизују фосфордиестарске везе у ДНК и РНК [107].

1.3.3. Хидролиза пептида који садрже аминокиселину L-хистидин помоћу мононуклеарних комплекса паладијума(II) и платине(II)

Атоми азота имидазоловог прстена из аминокиселине хистидина имају изражен афинитет за координовање са Pd(II) и Pt(II) јонима. У пептидима након координовања јона метала за N3 атом азота имидазоловог прстена долази до хелатног везивања јона метала за један, два или три пептидна атома азота при чему се формирају хелатни комплекси. Хелатни комплекс који при томе настаје садржи један шесточлани прстен који је настао координовањем N3 атома азота из имидазола и пептидног азота. Поред тога, настали метал-пептид комплекс може имати још један, односно максимално два петочлана хелатна прстена који садрже координоване пептидне атоме азота. Као што је раније поменуто

Pd(II) јон је веома ефикасан у депротонавању пептидног азота, ако је претходно координован за атом азота имидазоловог прстена [99,109-114]. У пептидима код којих је хистидин *N*-терминална аминокиселина настаје веома стабилан Pd(II)-пептид комплекс у коме је Pd(II) координован преко *N3* атома имидазоловог прстена и азота терминалне амино групе [115]. На овај начин настаје хидролитички неактиван Pd(II) комплекс у коме је Pd(II) јон удаљен од пептидне везе у чију структуру улази карбоксилна група хистидина, тако да не долази до њене хидролизе. Ацетиловањем *N*-терминалног краја у пептидима који садрже *N*-терминални хистидин спречава се бидентатна координација пептида за катализатор, што има за последицу настајање хидролитички активног Pd(II)-пептид комплекса који доводи до хидролизе пептидне везе. Применом ^1H NMR спектроскопије испитиване су реакције Pd(II) комплекса са Ac-L-His-Gly пептидом [95,116]. У реакционој смеши овог дипептида и $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса у молском односу 1:1 и рН око 2,0 на основу резултата ^1H NMR спектра потврђено је постојање пет паладијум(II)-пептид комплекса, означених у овом раду као **A**, **B**, **C**, **D** и **E** (Слика 23). Етилендиамински лиганд остаје координован за Pd(II) у току реакције са Ac-L-His-Gly пептидом јер азотови атоми имидазола имају слаб *trans*-ефекат, за разлику од атома сумпора из метионина, који због јаког *trans*-ефекта доводи до елиминације етилендиаминског лиганда из $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. Пет паладијум(II)-пептид комплекса који настају у реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са Ac-L-His-Gly идентификовани су на основу разлика у хемијским померањима за C2H и C5H протоне имидазоловог прстена.

Добијене вредности хемијских померања су у сагласности са публикованим резултатима за реакцију $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са Ac-L-His-Gly пептидом и његовим дериватима [102,118,119]. У комплексима **A** и **B** паладијум(II) јон је координован преко *N3*, односно *N1* атома азота из имидазоловог прстена. У комплексу **C** оба азотова атома имидазоловог прстена су координована за Pd(II), тако да овај прстен представља мост између два паладијум(II) јона.



Слика 23. Шематски приказ структурних формула паладијим(II)-пептид комплекса који су окарактерисани на основу ^1H NMR спектроскопије у реакцији дипептида Ac-L-His-Gly и његових *N*-метиллованих деривата са $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом [117]

Комплекс **D** настаје из комплекса **A** након депротонавања пептидног азота и његовог координовања за Pd(II). Резултати показују да је рКа вредност депротонавања пептидног азота на око 2, или мања уколико је Pd(II) јон координован за бочни низ аминокиселине [98]. Комплекс **E** садржи Pd(II) координован за *N1* атом азота имидазоловог прстена и депротонован карбоксилни кисеоник *C*-терминалне аминокиселине. Постојање комплекса који садржи два молекула пептида координована за Pd(II) јон није потврђено. Полувреме хидролизе пептидне везе у Ac-L-His-Gly дипептиду при рD 1,36 и температури од 60 °C је око 50 дана. Међутим, у присуству еквимоларне количине $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса пептидна веза хидролизује много брже и хидролиза је комплетна за мање од 2 дана.

На основу кинетичких испитивања реакција са пептидима који садрже метионин закључено је да су реакције хидролизе првог реда. Нађено је да је за хидролизу неопходно координовање пептида за Pd(II) и да је хидролитичка реакција интрамолекулског типа, као и то да се одвија преко пептид-Pd(II) комплекса. Присуство слободног глицина и одсуство слободне сирћетне киселине у реакционој смеши након завршене реакције доказује да хидролизује само пептидна веза која садржи карбоксилну групу хистидина. При упоредним експериментима са Ac-Gly-His пептидом нађено је да ниједна пептидна веза не хидролизује. Према томе, резултати показују да у реакцијама са Pd(II) комплексима и пептидима који садрже слободну карбоксилну групу хистидина не долази до хидролизе пептидне везе. Тако у трипептиду Ac-Gly-His-Gly само His-Gly пептидна веза хидролизује, док преостале две пептидне везе Ac-Gly и Gly-His не хидролизују.

Прва испитивања реакција хидролизе вршена су при $1,46 < pH < 2,61$ [95]. Утврђено је да су концентрације комплекса **A** и **B** у овој pH области константне, док се концентрације комплекса **C**, **D** и **E** смањују са смањењем pH вредности. Као што се из слике 23 види, само је комплекс типа **A** каталитички активан. Други начини координовања пептида за катализатор дају каталитички неактивне паладијум(II)-пептид комплексе. Међутим, све реакције у раствору су реверзибилне и неактивни паладијум(II)-пептид комплекси могу прећи у активни комплекс типа **A**, тако да пептидна веза на крају комплетно хидролизује. Ефекат одлазеће групе на брзину хидролизе испитиван је на серији дипептида Ac-L-His-X типа, у којима *C*-терминална аминокиселина X је Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Phe или Tyr. Пошто је природа пептидне везе у наведеним пептидима

идентична, брзине њене хидролизе једино зависи од природе бочног низа C-терминалних аминокиселина. За пет од седам испитиваних пептида вредности константе брзине хидролизе линеарно опадају са повећањем стерног ефекта C-терминалне аминокиселине. На основу вредности константе брзине хидролизе His-X пептидних веза може се закључити да брзина хидролизе зависи од могућности интеракције Pd(II) јона са пептидном везом која хидролизује. Вредности константе брзине хидролизе пептидне везе за Ac-L-His-Ser и Ac-L-His-Thr пептиде одступају од линеарности. Ако се узме у обзир стерни ефекат одлазеће аминокиселине (Ser и Thr) у ова два пептида хидролиза пептидне везе је много спорија. Ово се може објаснити на основу резултата NMR спектроскопије и молекулског моделирања. Хидроксилна група из бочног низа Ser и Thr гради водоничну везу.

У реакцијама између паладијум(II) комплекса типа $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ у којима је L хелатно координовани диамински лиганд (етилендиамин, en; 1,2-пропилендиамин, 1,2-pn; N-метилетилендиамин, Meen; изобутилендиамин, ibn; и N,N,N',N'-тетраметилетилендиамин, Me₄en) или S,N-координована аминокиселина (S-метил-L-цистеин, MeS-L-HCys и L-метионин, L-HMet) и Ac-L-His-Gly пептида у pH области од 2,0 до 2,5 на 60 °C одвија се селективна хидролиза His-Gly пептидне везе [120]. Брзина хидролизе пептидне везе опада са повећањем стерног ефекта комплекса (en > 1,2-pn > Meen > MeS-L-HCys > ibn > L-HMet > Me₄en) што се доводи у везу са стерним ефектима катализатора.

У реакцији $[Pd(L-Ala-N,O)Cl_2]^-$ и $[Pd(L-Ala-N,O)(H_2O)_2]^+$ комплекса са Ac-L-His-Gly за мање од 24 сата на pH од 1,5 до 2,5 одвија се комплетна хидролиза His-Gly пептидне везе. Хидролиза овог пептида је селективна. У реакцијама између ова два паладијум(II) комплекса и Ac-Gly-His и Ac-Gly-Gly-His пептида, код којих је карбоксилна група хистидина слободна, хидролизују Ac-Gly и Gly-Gly пептидне везе, док у реакцији са трипептидом Ac-Gly-His-Gly хидролизују Ac-Gly и His-Gly пептидне везе. Механизам ових неселективних хидролитичких реакција садржи елиминацију хелатно координованог L-Ala лиганда у полазном комплексу праћену координовањем два молекула воде за паладијум(II) јон, као и хелатну координацију овог јона за пептид преко N3 атома азота из имидазола и депротонovanог пептидног азота [121].

Испитивања реакција хидролизе пептидних веза у полипептидима помоћу

паладијум(II) комплекса су показала да, поред хидролизе His-X пептидне везе (X је било која аминокиселина), хидролизује и пептидна веза која се налази у суседству везе која садржи амино групу из хистидина. Тако, резултати испитивања реакција Ac-Gly-Gly-His-Gly пептида са паладијум(II) комплексима су показали да у овом пептиду хидролизују His-Gly и Gly-Gly пептидне везе. Хидролиза биолошки активног пептида ангиотенсина II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) са $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ квантитативно је испитивана [122]. Нађено је да се хидролиза His-Pro пептидне везе у овом пептиду одвија брзо, док је хидролиза Tyr-Ile везе знатно спорија и она захтева елиминацију етилендиаминског лиганда са Pd(II) јона. Испитивања реакција хидролизе S-оксидованог облика инсулина помоћу комплекса паладијума(II) су показала да се у ланцу В овог пептида такође, раскида пептидна веза која се налази у суседству везе која садржи амино групу хистидина. Међутим, у свим наведеним случајевима нађено је да не долази до хидролизе пептидне везе у чију структуру улази амино група из хистидина. Претходно описани резултати су веома значајни и са аспекта потенцијалне примене комплекса паладијума(II) за селективно раскидање пептидних веза у протеинима.

Шелдрик (Sheldrick) и сарадници су испитивали реакције антитуморски активних *cis*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$ и $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса са пептидима који садрже метионин. Реакције су испитиване у pH области 2,5 - 11,0 на 40 °C, применом течне хроматографије под високим притисцима (HPLC), масене спектрометрије (MS) и 1H и ^{195}Pt NMR спектроскопије. Нађено је да у реакцијама $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса са ди- и три-пептидима код којих је L-метионин N-терминална аминокиселина (Met-Gly, Met-Gly-Gly, Gly-Met, Gly-Gly-Met и Gly-Met-Gly), у зависности од pH вредности раствора, настају $[Pt(en)(peptid-N,S)]^{2+}$ и $[Pt(en)(peptid-N,N')]^+$ комплекси [123]. Насупрот томе, у реакцијама између пептида код којих метионин није N-терминална аминокиселина (Gly-Met, Gly-Gly-Met и Gly-Met-Gly) и $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса, у киселој средини, у првој фази настаје $[Pt(en)(peptid-N,S)]^+$ комплексна врста. Међутим, при вишим pH вредностима у реакцијама овог комплекса са пептидима доминантна врста у раствору је $[Pt(en)(peptid-N,N')]^+$ комплекс. Нађено је да у свим претходно испитиваним реакцијама не долази до хидролизе пептидних веза, јер настају $[Pt(en)]^{2+}$ -пептид комплекси који су хидролитички неактивни.

Испитиване су и реакције *cis*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$ комплекса са пептидима који садрже метионин, Gly-Met и Gly-Gly-Met, као и N-ацетилованих пептида Ac-L-Ser-Met, Ac-L-Met-

Gly, Ac-L-Met-Pro, Ac-Gly-Met-Gly, Ac-L-Met-Pro-Gly-Gly и Ac-Gly-Met-Pro-Gly-Gly [124-126]. Нађено је да одмах након мешања у свим реакцијама долази до монодентатног координовања пептида преко атома сумпора метионинског остатка за Pt(II) јон. Након монодентатне координације пептида, долази до брзе интрамолекулске супституције другог хлоридо лиганда у Pt(II) комплексу, при чему настаје релативно стабилни Pt(II)-пептид комплекс у коме је пептид бидентатно, преко атома сумпора метионинског остатка и депротонованог атома азота пептидне везе, координован за платину(II).

У реакцији *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекса и Gly-Met у рН области 2,5 - 10,0 не долази до хидролизе пептидне везе, јер се дипептид тридентатно координује за Pt(II) при чему настаје стабилан [Pt(Gly-Met-*N,N',S*)(NH₃)]⁺ комплекс [124]. Нађено је да селективна хидролиза пептидне везе у присуству *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекса искључиво зависи од положаја метионинског остатка у пептидима. Када се метионин налази на *N*-терминалном крају, који је заштићен, долази до селективне хидролизе Met-Z пептидне везе (пептиди типа Ac-L-Met-Z-). Међутим, у случају пептида који имају -X-Y-Met-Z секвенцу долази до хидролизе X-Y пептидне везе. Ако су X, Y и Z аминокиселине које у бочном низу немају хетероатом који се може координовати за Pt(II) хидролиза се одвија при рН < 6,0 [124,127].

Комплекс *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] катализује селективну хидролизу Ac-Gly везе у Ac-Gly-Met-Gly трипептиду при рН < 6,0. Трипептид се тридентатно координује за Pt(II) при чему настаје [Pt(Ac-Gly-Met-Gly-*S,N,N'*)(NH₃)] комплекс. У раствору је након 10 сати, применом HPLC хроматографије и ¹H NMR спектроскопије, детектован [Pt(Gly-Met-Gly-*S,N,N'*)(NH₃)] комплекс, као и слободна сирћетна киселина. У неутралној и слабо базној средини (рН > 6,0) не долази до хидролизе пептида и у раствору је присутан само [Pt(Ac-Gly-Met-Gly-*S,N,N'*)(NH₃)] комплекс. У реакцији цисплатине и Ac-Gly-Met-Gly, у 1:2 молском односу, не долази до хидролизе пептида и главни производ реакције је [Pt(Ac-Gly-Met-Gly-*S,N,N'*)(Ac-Gly-Met-Gly-*S*)] комплекс [125].

При рН > 4,0 *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекс катализује хидролизу Ac-L-Ser пептидне везе у Ac-L-Ser-Met дипептиду. На рН = 4,4 концентрација производа хидролизе је минимална, међутим током времена и са повећањем рН вредности раствора концентрација производа хидролизе расте, да би у рН области од 7,0 до 9,5 концентрација слободне сирћетне киселине била највећа [125]. У рН области од 2,8 до 10,0 *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]

катализује селективну хидролизу пептидне везе која садржи карбоксилну групу L-метионина у Ac-L-Met-Gly и Ac-L-Met-Pro дипептидима [126]. За разлику од Ac-L-Met-Pro, у неутралној и слабо базној средини, Met-Pro пептидна веза у Ac-L-Met-Pro-Gly-Gly не хидролизује [126,127].

Испитиване су хидролитичке реакције између различитих Pt(II) комплекса типа $[Pt(L)Cl_2]$ и $[Pt(L)(CBDCA-O,O')]$ (L је етилендиамин, en; (±) -транс-1,2-диаминоциклохексан, dach, (±)-1,2-пропилендиамин, 1,2-pn, а CBDCA је 1,1-циклобутандикарбоксилни анјон) и Ac-L-Met-Gly дипептида на 37 °C са еквимоларним количинама Pt(II) комплекса и дипептида на pH = 7,4 у 50 mM фосфатном пуферу. Под овим експерименталним условима је примећена спора хидролиза Met-Gly пептидне везе. Хидролизи ове везе претходи формирање хидролитички активног $[Pt(L)(H_2O)(Ac-L-Met-Gly-S)]^+$ комплекса. Реакција хидролизе Ac-L-Met-Gly дипептида је бржа у случају Pt(II) комплекса који садрже хлоридо лиганд у односу на одговарајуће Pt(II) комплексе са CBDCA лигандом. Брзина хидролизе пептида опада са повећањем стерног ефекта комплекса Pt(II) у низу $en > 1,2-pn > dach$ [128].

1.3.4. Хидролиза пептида који садрже аминокиселину L-метионин помоћу динуклеарних комплекса паладијума(II)

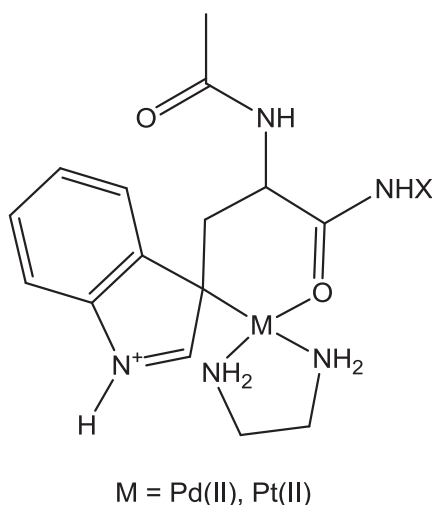
Имајући у виду да у многим ензимима активни центар садржи динуклеарни комплекс, за испитивање хидролитичких реакција са пептидима и протеинима коришћени су динуклеарни комплекси паладијума(II). Ови комплекси најчешће у мосту садрже сумпор-донорске атоме и добро су познати у координационој хемији [129].

Неке металохидролазе, као што су леуцин-аминопептидаза и метионин-аминопептидаза, имају динуклеарни активни центар са два јона метала који учествују у хидролизи. Један се координује за терминалну аминокиселинску групу и активира нуклеофил стабилизујући прелазно стање, док други поларизује карбонилну групу и стабилизује тетраедарски интермедијер. Ови резултати сугеришу да динуклеарни и полинуклеарни комплекси Pd(II) и Pt(II) могу бити ефикаснији катализатори за хидролизу у односу на мононуклеарне комплексе. Динуклеарни $[Pd_2(\mu-SPh)_2(sol)_4]^{2+}$ комплекс (Слика 19) коришћен је као катализатор за хидролизу пептидне везе у различитим пептидима који садрже L-метионин типа Ac-L-Met-X (X је Gly, Val, Phe или Ala) [108]. Све реакције су

испитиване у ацетону као растварачу, тако да је лиганд који се лако супституише у динуклеарном комплексу молекул воде или ацетон. У овом комплексу мостни тиолатни лиганд се не може супституисати са донорским групама из пептида. На слабо и реверзибилно координовање метионина из пептида за Pd(II) утиче *trans*-ефекат тиолатних атома сумпора који се налазе у комплексу. Нађено је да у присуству динуклеарног $[Pd_2(\mu-SPh)_2(sol)_4]^{2+}$ комплекса у ацетону као растварачу Met-Ala пептидна везе у Ac-L-Met-Ala дипептиду хидролизује око 80 пута брже у односу на хидролизу у воденом раствору у присуству $[PtCl_4]^{2-}$ комплекса. На основу испитивања реакција хидролизе дипептида типа Ac-L-Met-X који имају различиту C-терминалну аминокиселину (X) закључено је да волуминозност ове аминокиселине значајно утиче на брзину хидролизе. Користећи динуклеарне комплексе као катализаторе знатно се смањује полувреме хидролизе. Полувреме хидролизе Ac-L-Met-Ala је 35 минута на собној температури, а само 5 минута на 50 °C. Према томе, $[Pd_2(\mu-SPh)_2(sol)_4]^{2+}$ је веома реактиван неензимски катализатор хидролизе пептидне везе.

1.3.5. Хидролиза пептида који садрже аминокиселину L-триптофан помоћу комплекса паладијума(II) и платине(II)

Координовање јона есенцијалних метала за индолов прстен аминокиселине триптофана није познато у биолошким системима. Међутим, у реакцији дипептида Ac-L-Trp-X (где је X = Ala, Val или ValOMe) са Pd(II) и Pt(II) комплексима, који садрже координован ацетон, нађено је да се индолов γ -C атом (C3) координује за наведене јоне метала [93]. Претпоставка је да се координовани ацетон у овим комплексима лакше супституише са C3 атомом угљеника из индола у односу на аква лиганд. Волуминознија C-терминална аминокиселина успорава реакцију координовања триптофана за јон метала. До координовања индоловог C3 атома долази само онда када је на располагању и неки хетероатом, тако да се пептид може бидентатно координовати за јон метала. У реакцији Ac-L-Trp-X пептида и Pd(II) комплекса друго место координовања је кисеоников атом из карбонилне групе (Слика 24). Бидентатно координовани јон метала селективно хидролизује само Trp-X пептидну везу. У ацетону који садржи $HClO_4$ у концентрацији од $1,0 \cdot 10^{-3}$ M хидролиза пептидне везе је комплетно завршена за мање од 24 сата на 50 °C.



Слика 24. Начин координовања Pd(II) или Pt(II) комплекса за Ac-L-Trp-X пептиде [93]

Међутим, у воденим растворима нема координовања C3 атома индола за потенцијално активне комплексе платине(II) и паладијума(II), а самим тим нема ни хидролизе пептидне везе. Катализатори који садрже тридентатне лиганде нису активни, јер се не могу бидентатно координовати за пептид. Иако паладијум(II) комплекси имају много већи афинитет за координовање хистидина и метионина у односу на триптофан, ове хидролитичке реакције отварају нове могућности у биоаналитичкој пракси. Испитивање утицаја растварача на хидролизу пептидне везе са пептидима који садрже хистидин, метионин или триптофан су показала да у воденим растворима, с обзиром на велики афинитет Pd(II) и Pt(II) јона за сумпор и азот донорске атоме, доминантно је раскидање пептидних веза у околини хистидина или метионина. Насупрот овој, у органским растварачима одвија се хидролиза пептидне везе у околини триптофана. Примена неводених растварача отвара ново поље примене комплекса платине(II) и паладијума(II) за хидролизу хидрофобних пептида и протеина.

1.4. ХИДРОЛИЗА ПРОТЕИНА ПОМОЋУ КОМПЛЕКСА ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА

Главни разлог примене синтетичких протеаза које садрже паладијум(II) јон је потреба за региоселективном хидролизом протеина. Да би се синтетички катализатори могли примењивати у ову сврху неходно је да буду погодни за примену у

биоаналитичкој пракси. Ранији резултати испитивања хидролитичких реакција хистидин, метионин и триптофан везивних пептида са паладијум(II) комплексима су потврдили да ови комплекси могу имати и практичну примену. Као што је претходно наведено, комплекси Pd(II) региоселективно раскидају пептидне везе у близини координованих бочних низова, обично хистидина и метионина. Ове две аминокиселине налазе се у протеинима у просеку око 5,5 %, тако да се велики фрагменти могу секвенционисати и припремити за друге биохемијске трансформације. Уклањањем паладијума(II) из реакционе смеше добијени фрагменти протеина могу се користити даље без накнадне обраде. Пошто је раскидање пептидне везе хидролитички процес (није редокс реакција), аминокиселине и карбоксилне групе у фрагментима могу се рекомбиновати на различите начине и градити нове пептидне везе.

Утицај конформације на региоселективну хидролизу пептидних веза испитиван је на сегменту протеина миохемеритрина [130]. Секвенца сегмента миохемеритрина је Ac-L-E-V-V-P-H-K-K-Nle-H-K-D-F-L-E-K-I-G-G-L-NH₂. Овај полипептид у воденом раствору, при pH 2,0 на 40 °C, има конформацију слободне спирале, док се на 22 °C у 50% воденом раствору трифлуороетанола (TFE) пептид налази претежно у α-хеликсу. Било да се пептид налази у α-хеликоидној, или слободној спиралној конформацији [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ катализатор се координује за оба, His5 и His9, остатка. Конформација слободне спирале нема ефекат на брзину координовања Pd(II) катализатора за His5 и His9 остатке, али α-хеликоидна конформација смањује брзину интеракције полипептида и катализатора, што је и очекивано за квадратно-планарне комплексе паладијума(II) [131]. Катализатор селективно хидролизује пептидну везу у обе конформације, при чему само веза између V3-P4, односно друга пептидна веза лево од His5, подлеже хидролитичким реакцијама. Резултати испитивања су показали да је хидролиза знатно бржа када је пептид у слободној конформацији у односу на α-хеликоидну.

Први протеин код кога је селективно раскинута пептидна веза уз каталитичко дејство комплекса паладијума(II) је цитохром c изолован из срца коња. Молекулска маса овог протеина је 12,4 kDa и садржи 104 аминокиселине, а његова терцијарна структура је позната. У структури овај пептид садржи пет места за која се могу координовати паладијум(II) комплекси, од којих три места припадају хистидинском, а два метионинском бочном остатку. Пептидна веза у цитохрому c је селективно раскинута у киселој средини

на 40 °C помоћу Pd(II) комплекса [132]. Испитивања хидролизе протеина са различитим комплексима паладијума(II) су показала да је углавном 60% протеина хидролизовало. Међутим, ако се као катализатор употреби $[\text{Pd}(\text{dtco-OH})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ помешан са протеином у молском односу 1:10 на 40 °C и pH око 1,7, нађено је да након 2 дана трајања реакције хидролизује 80% протеина. Помоћу Едманове деградационе методе одређено је место раскидања протеина, а резултати показују да је само пептидна веза између His18-Thr19 раскинута. На основу тога закључено је да место координовања Pd(II) може бити His18 или Cys17.

Место координовања Pd(II) јона за цитохром с утврђено је на основу упоредних експеримената са различитим трипептидима. Тако, пептид Ac-L-MeCys-His-Ala у присуству Pd(II) катализатора се раскида искључиво између His и Ala, што значи да се хидролиза одвија на потпуно истом месту као у цитохрому с. Пептид Ac-L-MeCys-Ala-Gly, који не садржи аминокиселину хистидин, хидролизује искључиво између MeCys и Ala, а утврђено је да не долази до хидролизе других пептидних веза. На основу ових испитивања закључено је да се Pd(II) координује за цитохром с искључиво преко His18, а не преко Cys17 [133].

Истраживања су показала да са повећањем броја молова паладијума(II) у односу на протеин, као и са побољшањем електрофоретске резолуције, цитохром с се раскида на још неколико места. Међутим, закључено је да је хидролиза и у овом случају била региоселективна, односно дешава се искључиво у близини Met и His остатка, при чему хидролизује друга пептидна веза лево, или прва пептидна веза десно, од места координовања катализатора за протеин [122]. На основу свих напред изнетих резултата очигледно је да се хидролиза дешава, како у кратким пептидима, тако и у протеинима.

Ефикаснија селективна хидролиза цитохрома с постигнута је применом $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. Након 24 сата на 40 °C и pH 2,5 применом аналитичке HPLC хроматографије и Едманове деградационе методе одређено је место цепања протеина, а резултати показују да долази до хидролизе само Met-X пептидне везе. Детектована су три фрагмента који настају услед хидролитичког раскидања Met65-Glu66 и Met80-Ile81 пептидних веза у цитохрому с. Пептидна Met-Pro веза не хидролизује у присуству протеолитичких ензима, док у присуству $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса долази до њене хидролизе. Такође, нађено је да $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс селективно хидролизује протеин

бoвин β -казеин [134].

Испитиван је утицај ултраљубичастих и микроталаса на хидролизу цитохрома с у присуству $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. Када се реакциона смеша изложи дејству ултраљубичастих таласа од 300 nm, нађено је да се константа брзине хидролизе Met-X (X је аминокиселина која не садржи хетероатом у бoчном низу) пептидне везе удвостручи, али да при томе долази и до споредних реакција. Међутим, употребом микроталаса хидролиза је бржа 2-3 пута на 60 °C, односно 7 пута на 100 °C, при чему не долази до споредних реакција. Утицај температуре на брзину хидролизе пептидне везе у присуству Pt(II) и Pd(II) комплекса је добро познат, док је утицај микроталаса на ове реакције још увек недовољно испитан. Хидролиза пептида и протеина под утицајем микроталаса у присуству Pt(II) комплекса је метода која ће вероватно наћи своје место у синтези и модификовању протеина, као и у биотехнологији [135].

Протeин миоглобин изолован из срчаног мишића коња има молекулску масу око 17,6 kDa. Око 80% протеина има α -хеликсoidну структуру, а у структури нису присутне ковалентне везе. Његова структура се доста разликује у односу на структуру протеина цитохрома с. Од свих комплекса који су коришћени за испитивање реакција хидролизе миоглобина најбоље резултате је показао $[\text{Pd}(\text{dtco-OH})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс [136]. Након 24 сата инкубације на 60 °C и у pH области од 6,2 до 3,2 количина хидролизованог пептида се креће од 39% до 85%. Резултати показују да денатурација протеина не утиче на брзину хидролизе и да брзина хидролизе, као и место раскидања везе, једино зависе од места координовања паладијум(II) комплекса за протеин и од његове околине.

Када се миоглобин и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс помешају у 1:5 молском односу, на 60 °C и pH 2,5, хидролизују само две пептидне везе, које садрже карбоксилну групу Met55 и Met131 [137].

Комплекси паладијума(II), $\text{trans-}[\text{Pd}(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{dtco-3-OH})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (где је py = пиридин, en = етилендиамин, dach = 1,4-диазоциклохептан и dtco-3-OH = 1,5-дитиоциклооктан-3-ол) су испитивани као катализатори за хидролизу протеина, бoвин серум албумина, серум албумина изолованог из крви свиње и албумина изолованог из кокошијег јајета. Комплекси и протеини су мешани у молском односу 8:1 или 16:1 на pH = 4,6, а затим су реакционе смеше инкубирале на 60 °C два дана или на 50 °C шест дана. Осим $[\text{Pd}(\text{dtco-3-OH})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$

комплекса који је показао каталитичку инертност, преостала три Pd(II) комплекса селективно хидролизују X-Ser или X-Thr пептидне везе, као и пептидне везе у близини His и Met остатка. У бовин албумину долази до хидролизе Glu57-Ser58, Gly85-Asp86, Leu103-Ser104 и Lys285-Ser286 пептидних веза, албумин изолован из крви свиње хидролизовао је само на једном месту (Lys285-Ser286), док албумин изолован из јајета кокошке хидролизује на четири места (Ala6-Ser7, Ala220-Ser221, Gly237-Thr238 и Met239-Ser240) [138].

2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА

У оквиру ове докторске дисертације предвиђена је синтеза и карактеризација нових мононуклеарних и динуклеарних комплекса платине(II), који су структурни аналози комплекса платине(II) који показују антитуморску активност. Такође, предвиђено је да се применом спектроскопских метода, при различитим експерименталним условима, испитају реакције пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин са мононуклеарним и динуклеарним комплексима платине(II).

У првом делу рада предвиђено је да се применом ^1H NMR спектроскопије, при pH вредности 7,4 у D_2O као растварачу и температури 37 °C, испитају реакције $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса (en је етиленедиамин, Me-mal и $\text{Me}_2\text{-mal}$ су бидентатно кординовани анјони 2-метилмалонске и 2,2-диметилмалонске киселине) са *N*-ацетилованим L-метионил-глицином (Ac-L-Met-Gly) и пептидима који у својој структури садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин, Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-Gly-NH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly. Поред тога, планирано је да се резултати ових испитивања доводе у везу са механизмом токсичног деловања антитуморских комплекса платине(II).

Модификовањем ранијих поступака за синтезу динуклеарних комплекса платине(II), који као мостни лиганд садрже различите диазине, у овој дисертацији предвиђена је синтеза и карактеризација нових динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-X})\}\text{Cl}_2$

комплекса (где је L етилендиамин, en; (±)-1,2-пропилендиамин, 1,2-pn; изобутилендиамин, ibn; *trans*-(±)-1,2-диаминоциклохексан, dach; а X је пиразин, pz; или пиридазин, pydz). Карактеризација ових комплекса извршиће се на основу резултата микроанализе, као и применом ^1H NMR и ^{13}C NMR спектроскопије. Молекулска структура динуклеарних комплекса платине(II) одредиће се на основу резултата рендгенске структурне анализе.

Поред тога, применом ^1H NMR спектроскопије испитаће се реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду у присуству два платина(II) комплекса, мононуклеарног $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ у 1:1 и 2:1 молском односу, у pH области од 2,0 до 2,5 у D_2O као растварачу на 37 °C. Реакција Ac-L-Met-Gly дипептида са $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ испитиваће се у вишку Pt(II) комплекса (1:2 молски однос). Такође, поредиће се брзина хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly у присуству мононуклеарног и динуклеарног платина(II) комплекса.

Применом ^1H NMR спектроскопије испитиваће се каталитичко дејство аква деривата динуклеарних комплекса платине(II), $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, $\{[\text{Pt}(1,2\text{-pn})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, $\{[\text{Pt}(\text{ibn})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, на хидролизу пептидне везе у Ac-L-Met-Gly. Добијени резултати ових испитивања поредиће се са одговарајућим резултатима за реакције мононуклеарног $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. Све реакције испитиваће се 1:1 и 1:2 молском односу, у D_2O као растварачу на 37 °C и у pH области од 2,0 до 2,5.

Динуклеарни хлоридо $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекси ће се превести у одговарајуће аква деривате $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, односно $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$. Применом ^1H NMR спектроскопије испитиваће се реакције динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекса са Ac-L-His-Gly и Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ пептидима. Све реакције изучаваће се у pH области од 2,0 до 2,5 на 37 °C. Такође, поредиће се каталитичка способност два динуклеарна Pt(II) комплекса, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$, на хидролизу пептидне везе пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин, у зависности од природе мостног диазинског лиганда.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Хемикалије и реагенси

Хемикалије и реагенси D_2O , DNO_3 , $NaOD$, $DMSO-d_6$, етилендиамин (en), (\pm)-1,2-пропилендиамин (1,2-pn), изобутилендиамин (ibn), (\pm)-*trans*-1,2-диаминоциклохексан (dach), пиразин или 1,4-дiazин (pz), пиридазин или 1,2-дiazин (pydz), малонска киселина (H_2mal), 2-метилмалонска киселина (Me- H_2mal), 2,2-диметил малонска киселина (Me₂- H_2mal), $K_2[PtCl_4]$, пептиди L-метионил-глицин (L-Met-Gly), L-метионил-L-хистидин (L-Met-L-His), L-хистидил-глицин (L-His-Gly) су набављени од Sigma-Aldrich Chemical Co. Пентапептид L-метионил-глицил-глицил-L-хистидил-глицин (L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly) је набављен од Bachem A.G. Тетрапептид, N-ацетиловани L-метионил-глицил-L-хистидил-глицинамид (Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂), је синтетизован помоћу Fmoc-chemistry методе [139,140]. Синтетизовани пептид је пречишћен коришћењем семипрепаративне RP-HPLC хроматографије, а чистоћа му је проверена помоћу аналитичке HPLC хроматографије и електроспреј јонизационе масене спектрометрије. Остале хемикалије употребљене у овом раду биле су комерцијални производи аналитичког степена чистоће и купљене су од домаћег произвођача. За припремање раствора наведених реагенаса употребљена је бидестилована вода.

3.2. Ацетиловање терминалне аминок групе у пептидима

За ацетиловање терминалне аминок групе у пептидима L-метионил-глицину, L-метионил-L-хистидину, L-хистидил-глицину, L-метионил-глицил-глицил-L-хистидил-глицину употребљена је метода која је раније описана у литератури [94,103].

У што мањој запремини глацијалне сирћетне киселине растворити $5,0 \cdot 10^{-4}$ mola пептида и у овај раствор додати $7,5 \cdot 10^{-4}$ mola (70,9 μ l) анхидрида сирћетне киселине. Раствор се меша на собној температури за време од три сата, а затим остави да испари до сува. У већини случајева добија се уљаста супстанца која представља ацетиловани пептид. Чист ацетиловани пептид може се добити прекристалисавањем из смеше вода-ацетон, или неког другог органског растварача. Ацетиловани пептид у кристалном облику може се добити и растварањем уластог остатка у води, а затим испаравањем раствора на собној температури до сува. По потреби овај поступак се може поновити више пута. Чистоћа ацетилованог пептида проверена је помоћу ^1H NMR спектроскопије.

3.3. Добијање $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ комплекса

Платина(II) комплекси типа $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ (где је L бидентатно координовани en, 1,2-rn, ibn или dash диамински лиганд) синтетизовани су по модификованом поступку који је раније описан у литератури [141-143].

У 10 cm^3 воде растворити 0,2076 g ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mola) $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ и додати еквимоларну количину одговарајућег диаминског лиганда L. Добијени раствор закиселити ($\text{pH} = 3,0$) додавањем раствора HCl концентрације 1,0 mol/dm^3 . Реакциону смешу загревати на 80 $^\circ\text{C}$ за време од 2 сата. Сви комплекси кристалишу из мале запремине воденог раствора на собној температури. Издвојене кристале комплекса одвојити цеђењем, испрати са мало хладне воде, а затим етанолом и сушити на ваздуху. Чисти комплекси су добијени прекристализацијом из мале количине топле воде и хлађењем. Чистоћа и састав комплекса проверени су помоћу резултата елементарне микроанализе, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије. За снимање ^1H и ^{13}C NMR спектра $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ комплекса као растварач коришћен је DMSO- d_6 .

Израчунато за $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2] = \text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$ ($M_r = 326,08$): C, 7,37; H, 2,47; N, 8,59. Нађено: C, 7,48; H, 2,43; N, 8,59 %. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm) 2,24 (s, 4H, 2CH_2), 5,30 (s, 4H, 2NH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm) 48,76 (CH_2).

Израчунато за $[\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}_2] = \text{C}_3\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$ ($M_r = 340,11$): C, 10,59; H, 2,96; N, 8,24. Нађено: C, 11,15; H, 3,17; N, 8,05 %. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm): 1,11 (d, 3H, CH_3), 2,10 – 2,58 (m, 3H, CH и CH_2), 5,12-5,39 (m, 4H, 2NH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm): 15,71 (CH_3), 52,49 (CH_2), 55,42 (CH).

Израчунато за $[\text{Pt}(\text{ibn})\text{Cl}_2] = \text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$ ($M_r = 354,14$): C, 13,57; H, 3,42; N, 7,91. Нађено: C, 13,15; H, 3,47; N, 7,88 %. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm): 1,24-1,29 (m, 6H, 2CH_3), 2,30 (s, 2H, CH_2), 5,14-5,36 (m, 4H, 2NH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm): 15,85 (2CH_3), 58,10 (CH_2), 60,28 (C).

Израчунато за $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2] = \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$ ($M_r = 380,17$): C, 18,96; H, 3,71; N, 7,37. Нађено: C, 19,20; H, 3,49; N, 7,46 %. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm) 1,06 (m, 4H, 2CH_2 од C4 и C5), 1,63 (m, 4H, 2CH_2 од C3 и C6), 2,07 (m, 2H, 2CH од C1 и C2), 4,98-5,71 (m, 4H, 2NH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm) 24,08 (2CH_2 , C4 и C5), 31,27 (2CH_2 , C3 и C6), 62,66 (2CH , C1 и C2).

3.4. Добијање $[\text{Pt}(\text{en})(\text{L-O},\text{O}')] \text{ комплекса}$

Платина(II) комплекси типа $[\text{Pt}(\text{en})(\text{L-O},\text{O}')] \text{,}$ (где је L-O,O' бидентатно координовани анјон малонске, 2-метилмалонске и 2,2-диметилмалонске киселине преко кисеоникових атома карбоксилних група) синтетизовани су по модификованом поступку који је раније описан у литератури [144].

Платина(II)-аква комплекс $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ добијен је мешањем одговарајућег $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса са AgNO_3 у молском односу 1:1,95 при рН вредности 2,0 у одговарајућој запремини H_2O , на начин који је раније описан у литератури [96].

Издвојени талог AgCl одвојити цеђењем. У раствор одговарајућег аква комплекса додати еквимоларну количину чврстог лиганда H_2mal , односно $\text{Me-H}_2\text{mal}$ или $\text{Me}_2\text{-H}_2\text{mal}$ и два еквивалента NaHCO_3 обрачунатог у односу на лиганд. Реакциону смешу мешати на 60°C за време од 3 сата. Одговарајући комплекси кристалишу из мале запремине воденог раствора на собној температури. Чистоћа и састав комплекса проверени су помоћу

результата елементарне микроанализе, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије. Принос је око 50–60%.

Израчунато за $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ = $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$ (M_r = 371,25): C, 19,41; H, 3,26; N, 7,55. Нађено: C, 19,50; H, 3,22; N, 7,48 %. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 2,57 (s, 4H, 2CH₂), 4,16 (q, H, CH), 1,37 (d, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 16,54 (CH₃), 50,79 (2CH₂), 53,68 (CH), 183,30 (C=O).

Израчунато за $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ = $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$ (M_r = 385,28): C, 21,82; H, 3,66; N, 7,27. Нађено: C, 21,54; H, 3,42; N, 7,43 %. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 2,59 (s, 4H, 2CH₂), 1,77 (d, 6H, 2CH₃); ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 27,87 (2CH₃), 50,68 (2CH₂), 55,32 (C), 185,63 (C=O).

Ови подаци су у складу са раније објављеним вредностима за одговарајуће Pt(II) комплексе [145,146].

3.5. Добијање $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\text{X})\}\text{Cl}_2$ комплекса

Комплекси типа $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ (где је L бидентантно кординовани диамин: en, 1,2-pn, ibn или dach, а X је мостни лиганд пиразин (pz) или пиридазин (pydz) су добијени из одговарајућих мононуклеарних комплекса типа $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ по модификованом поступку који је раније описан у литератури [57,147].

Мононуклеарни комплекси типа $[\text{Pt}(\text{L})(\text{dmf})\text{Cl}]\text{NO}_3$ (где је dmf диметилформаид), добијени су мешањем одговарајућег хлоридо-комплекса ($[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$) са AgNO_3 у молском односу 1:0,98 у диметилформиду као растварачу.

У 5 cm³ диметилформаида растворити 0,0553 g ($3,25 \cdot 10^{-4}$ mola) AgNO_3 . У овако добијени раствор додати суспензију $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ комплекса ($3,32 \cdot 10^{-4}$ mola) у 10 cm³ диметилформаида. Реакциону смешу увити у алуминујумску фолију и оставити преко ноћи уз мешање на собној температури. Издвојени талог AgCl одвојити цеђењем, а бледо жути раствор $[\text{Pt}(\text{L})(\text{dmf})\text{Cl}]^+$ комплекса у диметилформиду користи се као полазна супстанца за синтезу одговарајућих динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-X})\}\text{Cl}_2$ комплекса.

У раствор који садржи $[\text{Pt}(\text{L})(\text{dmf})\text{Cl}]^+$ комплекс лагано укапавати раствор који је добијен растварањем $1,69 \cdot 10^{-4}$ mola пиразина (pz), односно пиридазина (pydz) у 5 cm³ диметилформаида. Реакциону смешу увити у алуминујумску фолију и оставити уз

мешање на собној температури око 12 h. На ротационом вакум упаривачу испарити диметилформамид, а суви остатак испрати неколико пута са етром. Након испаравања етра, суви остатак је растворен у што мањој запремини $0,5 \text{ mol/dm}^3$ LiCl. Добијени раствор оставити у фрижидеру преко ноћи. Светло жуте кристале $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-X})\}\text{Cl}_2$ комплекса одвојити цеђењем, испрати са метанолом, затим етром и сушити на ваздуху. Принос је 30–40%. Чистоћа и састав комплекса проверени су помоћу резултата елементарне микроанализе, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије.

Израчунато за $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ ($M_r = 732,25$): C, 13,12; H, 2,75; N, 11,48. Нађено: C, 13,16; H, 2,98; N, 11,19%. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 2,68–2,79 (m, 8H, 4CH₂), 9,03 (s, 4H, 4CH); ^{13}C NMR δ (D_2O , 200 MHz); (ppm) 52,34 (4CH₂), 153,46 (4CH).

Израчунато за $\{[\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ ($M_r = 760,31$): C, 15,80; H, 3,18; N, 11,05. Нађено: C, 15,45; H, 3,19; N, 10,82%. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 1,34 (d, 6H, 2CH₃), 1,45–2,98 (m, 4H, 2CH₂), 3,11–3,32 (m, 2H, 2CH), 9,01 (s, 4H, 4CH); ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 17,83 (2CH₃), 54,52 (2CH₂), 59,86 (2CH), 153,44 (4CH).

Израчунато за $\{[\text{Pt}(\text{ibn})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ ($M_r = 788,36$): C, 18,28; H, 3,58; N, 10,66. Нађено: C, 17,84; H, 3,63; N, 10,47%. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 1,42–1,48 (m, 12H, 4CH₃), 2,66 (s, 4H, 2CH₂), 9,13 (s, 4H, 4CH); ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm): 25,96 (4CH₃), 60,09 (2CH₂), 63,61 (2C), 153,36 (4CH).

Израчунато за $\{[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ ($M_r = 840,43$): C, 22,87; H, 3,84; N, 10,00. Нађено: C, 22,56; H, 3,94; N, 9,56%. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 1,27–1,62 (m, 8H, 4CH₂, C4,C5), 1,76–2,08 (m, 8H, 4CH₂, C3,C6), 2,45–2,61 (m, 4H, 4CH, C1,C2), 9,00 (s, 4H, 4CH); ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm): 26,55 (4CH₂, C4,C5), 34,56 (4CH₂ C3,C6), 65,15 и 65,30 (4CH, C1,C2), 153,31 (4CH).

Израчунато за $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ ($M_r = 732,25$): C, 13,12; H, 2,75; N, 11,48%. Нађено: C, 13,16; H, 2,98; N, 11,19%. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm): 2,78–2,82 (m, 8H, 4CH₂), 8,14 (m, 2H, C4H и C5H), 9,58 (m, 2H, C3H и C6H); ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm): 51,10 (4CH₂), 137,33 (2CH, C4 и C5), 164,36 (2CH, C3 и C6).

3.6. Добијање $[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-X})\}^{4+}$ комплекса

Мононуклеарни $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс је добијен из одговарајућег $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса, у реакцији са 1,98 еквивалената AgNO_3 [96]. Суд са реакционом смешом ($\text{pH} \approx 2$) увити у алуминијумску фолију и оставити преко ноћи уз мешање на собној температури. Издвојени талог AgCl одвојити цеђењем, а свежи раствор аква комплекса чувати у фрижидеру.

Динуклеарни комплекси типа $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-X})\}^{4+}$ (где је L: en, 1,2-pn, ibn или dach, X је pz или pydz) су добијени из одговарајућих хлорида $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-X})\}\text{Cl}_2$ комплекса, у реакцији са 3,98 еквивалената AgNO_3 у одговарајућој запремини D_2O , на начин који је раније публикован [96]. Суд са реакционом смешом ($\text{pH} \approx 2$) увити у алуминијумску фолију и оставити преко ноћи уз мешање на собној температури. Издвојени талог AgCl одвојити цеђењем, а свеже растворе аква комплекса чувати у фрижидеру. Помоћу ^1H NMR спектроскопије повремено проверити њихову чистоћу и у случају одговарајуће промене аква комплекса или разградње полазних комплекса, припремити свеж раствор динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-X})\}^{4+}$ комплекса.

3.7. Мерење pH вредности

Сва pH мерења су рађена на 25°C . За ову сврху употребљен је pH-метар Iskra MA 5704, који је калибрисан у односу на Фишерове (Fischer) пуферске растворе за $\text{pH} = 4,0$ и $\text{pH} = 7,0$. Измерене pH вредности нису кориговане у односу на деутеријумски ефекат.

3.8. Микроанализа

Микроанализе за C, H и N параметре рађене су у Микроаналитичком одељењу Института за хемију Хемијског факултета, Универзитета у Београду и на Хемијском факултету, Технолошког Универзитета у Варшави, Пољска.

3.9. NMR (^1H и ^{13}C) мерења

За снимање ^1H и ^{13}C NMR спектра употребљени су D_2O и $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ($\text{DMSO-}d_6$) као растварачи и TSP (натријум-3-(триметилсилил)-пропионат-2,2,3,3- d_4) као референтни

стандард. Спектри су снимани на Varian Gemini 2000, Bruker AC 250 и Bruker AM360 NMR спектрометрима. Све реакције су извођене у стандардним NMR киветама пречника 5 mm.

Реакције $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса са *N*-ацетилованим пептидима Ac-L-Met-Gly, Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly праћене су помоћу ¹H NMR спектроскопије. Платина(II) комплекси и пептиди мешани су у 1:1 молском односу, директно у NMR кивети у 50 mM фосфатном пуферу. Концентрација раствора након мешања била је 10 mM у односу на реактанте. Наведене реакције су извођене на температури од 37 °C, а pH вредности реакционе смеше била је 7,4.

Константе брзине реакција $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса са Ac-L-Met-Gly и Ac-L-Met-L-His су одређене применом ¹H NMR спектроскопије. Еквимоларне количине платина(II) комплекса и одговарајућег дипептида су мешане у NMR кивети. Концентрација раствора након мешања је била 10 mM у односу на реактанте, а запремина 0,6 cm³. Наведене реакције су извођене на температури од 37 °C, а pH вредности реакционе смеше била је 7,4. Реакције формирања комплекса **1a** и **1b** (Слика 27), посматране су као реакције другог реда. Вредности константи брзина (k_2) добијене су из нагиба праве када се из једначине за реакцију другог реда:

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

израз $x/a_0(a_0-x)$ посматра у функцији времена (t). У овој релацији a_0 је почетни концентрација Pt(II) комплекса, а x концентрација Pt(II)-пептид комплекса (**1a** и **1b**, Слика 27) у времену t [147].

Реакције формирања хидролитички активног комплекса **2** из комплекса **1a** и макрохелатног комплекса **4** из **1b** (Слика 27), посматране су као реакције првог реда. Вредности константи брзина (k) добијене су из нагиба праве када се из једначине за реакцију првог реда:

$$kt = \ln \frac{a_0}{a_t}$$

израз $\ln(a_0/a_t)$ посматра у функцији времена (t). У овој релацији a_0 је концентрација Pt(II)-пептид комплекса (**1a** и **1b**), а a_t је концентрација истог комплекса у времену t [147].

Реакције између мононуклеарног $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса са *N*-ацетилованим дипептидом *Ac-L-Met-Gly* изучаване су помоћу ^1H NMR спектроскопије. Мононуклеарни комплекс и дипептид мешани су у 1:1, 1:2 и 2:1 молским односима, док су реакције динуклеарног комплекса и дипептида изучаване у 1:1 и 1:2 молским односима. Почетна концентрација дипептида и комплекса је била 40 mM. Реакције су извођене на температури од 37 °C, а pH вредност реакционе смеше била је у опсегу 2,0-2,5.

Реакције између *N*-ацетилованог дипептида *Ac-L-Met-Gly* и динуклеарних платина(II) комплекса типа $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ (где је *L* бидентатно координовани *en*, 1,2-*pn*, *ibn* или *dach* лиганд) изучаване су помоћу ^1H NMR спектроскопије. Одговарајући динуклеарни платина(II) комплекс и пептид мешани су у молским односима 1:1 и 1:2 директно у NMR кивети. Почетна концентрација дипептида и аква комплекса је била 40 mM. Реакције су извођене на температури од 37 °C, а pH вредност реакционе смеше била је у опсегу 2,0-2,5.

Реакције између динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса са *N*-ацетилованим дипептидима (*Ac-L-His-Gly* и *Ac-L-Met-Gly*) и *N*-ацетилованим тетрапептидом *Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂* праћене су помоћу ^1H NMR спектроскопије. Почетне концентрације пептида и комплекса су биле 40 mM. Реакције су извођене на температури од 37 °C, а pH вредност реакционе смеше била је у опсегу 2,0-2,5. Реакције платина(II) комплекса са *Ac-L-His-Gly* и *Ac-L-Met-Gly* извођене су у 1:1 молском односу, док су реакције платина(II) комплекса са *Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂* извођене у 1:1 и 1:2 молским односима.

3.10. Рендгенска структурна анализа

Рендгенска структурна испитивања за кристале $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса су вршена на бази мерења интензитета рефлексија помоћу дифрактометра типа Xcalibur kappa-geometry дифрактометра применом CrysAlisPro софтвера [148] и монохроматске $\text{Mo K}\alpha$ радијације ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Подаци о експерименталним мерењима, резултати рендгенске структурне анализе као и други релевантни подаци за поменуте комплексе су приказани у табели 2.

Структуре комплекса су решене помоћу директних метода употребом SHELXS-86 програма [149], док је за утацњавање структура употребљен програм SHELXL-97 [149]. Добијени интензитети су кориговани за ефекте апсорбције [148]. Сви атоми тежи од водоника су утацњавани анизотропно. Водоникови атоми везани за угљеникове атоме су смештени на израчунате позиције (метиленски C-H = 0,97, ароматични C-H = 0,93 и амински N-H = 0,90 Å). Позиције свих водоникових атома су утацњаване тако што су њихови изотропни температурни фактори фиксирани на вредност 20% већу од изотропних температурних фактора атома на којима се налазе. За графичку презентацију кристалних структура употребљени су програми SIEMENS [150] и MERCURY [151]. Кристалографски подаци су депоновани у "Cambridge Crystallographic Data Centre" број CCD C895153 за $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$, и CCDC 946083 за $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплексе.

Табела 2. Кристалографски и други експериментални подаци за $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплексе

Комплекс	$\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$	$\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$
Емпиријска формула	$\text{C}_8\text{H}_{20}\text{Cl}_4\text{N}_6\text{Pt}_2$	$\text{C}_8\text{H}_{20}\text{Cl}_4\text{N}_6\text{Pt}_2$
Молекулска маса	732,28	732,28
Кристални систем	Моноклиничан	Моноклиничан
Просторна група	$\text{P2}_1/\text{n}$	$\text{C2}/\text{c}$
Температура (K)	295	295
Параметри јединичне ћелије		
a (Å)	5,07703(9)	12,1865 (2)
b (Å)	12,6594(2)	10,4368 (2)
c (Å)	14,1839(2)	14,3753 (3)
B (°)	97,7545(16)	103,721 (2)
V (Å ³)	903,29(2)	1776,19 (6)
Z	2	4
Тип радијације	Mo K α	Mo K α
Апсорбциони коефицијент μ (mm ⁻¹)	16,06	16,34
Димензије кристала (mm)	0,20 x 0,20 x 0,10	0,25 x 0,20 x 0,15
T_{min} , T_{max}	0,405; 1,000	0,082; 0,185
Број сакупљених рефлексија	20103	17632
Број независних рефлексија	1588	1570

Број употребљених рефлексија	1545 [$I > 2\sigma(I)$]	1428 [$I > 2\sigma(I)$]
Метода утацњавања структуре	F^2	F^2
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$	0,014	0,019
$wR(F^2)$	0,035	0,048
S	1,2	1,21
Број употребљених рефлексија у процесу утацњавања структуре	1588	1570
Број параметара	91	91
$\Delta\rho_{\max}$ (e Å ⁻³)	0,65	0,49
$\Delta\rho_{\min}$ (e Å ⁻³)	-0,35	-1,10

4. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

4.1. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ И ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ИСПИТИВАЊЕ ЊИХОВИХ РЕАКЦИЈА СА ПЕПТИДИМА

Биомедицинска неорганска хемија је важна област бионеорганске хемије, која има значајну примену у испитивању нових терапеутских и дијагностичких агенаса у фармацеутској и клиничкој пракси. Познато је да се неки комплекси платине(II), као што су цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина, користе у хемиотерапији као антитуморски агенси [10,20,21]. Поред мононуклеарних комплекса платине(II) и неки динуклеарни комплекси платине(II), са пиразином као мостним лигандом, су показали значајну антитуморску активност [75-77]. Проблем примене ових комплекса у медицини је њихово токсично дејство (нефротоксичност, неуротоксичност, кардиотоксичност, мучнина, опадање косе и др), ограничена растворљивост и појава резистенције након дуге примене [11-16]. Боље познавање механизма реакција комплекса платине(II) са пептидима и другим биолошки значајним молекулима је од великог значаја за тумачење механизма њиховог антитуморског и токсичног деловања.

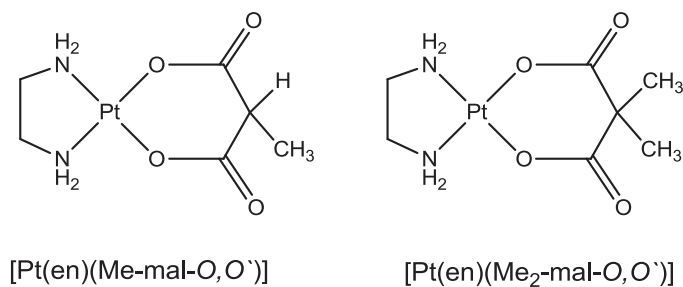
Досадашњи резултати испитивања су показали да се токсично дејство комплекса платине(II) може објаснити њиховом реакцијом са биомолекулима који се налазе у људском организму (аминокиселине, пептиди, протеини и др.), а који садрже сумпор

донорске атоме. Изучавање реакција комплекса платине(II) са пептидима је показало да се ови комплекси координују за неку од аминокиселина (L-метионин, L-цистеин, L-хистидин) које се налазе у бочном низу ових биомолекула. Ове интеракције најчешће имају за последицу хидролизу пептидне везе у пептидима, што се доводи у везу са токсичним деловањем антитуморских комплекса платине(II) [94]. Упркос чињеници да су реакције хидролизе пептида у присуству комплекса платине(II) интензивно изучаване у току последње три деценије, механизам каталитичког деловања ових комплекса на хидролизу пептидне везе је још увек недовољно разјашњен и представља предмет најновијих испитивања у области бионеорганске хемије. Такође, нађено је да неки динуклеарни комплекси паладијума(II) селективно раскидају пептидне везе у чију структуру улази карбоксилна група координоване аминокиселине [108].

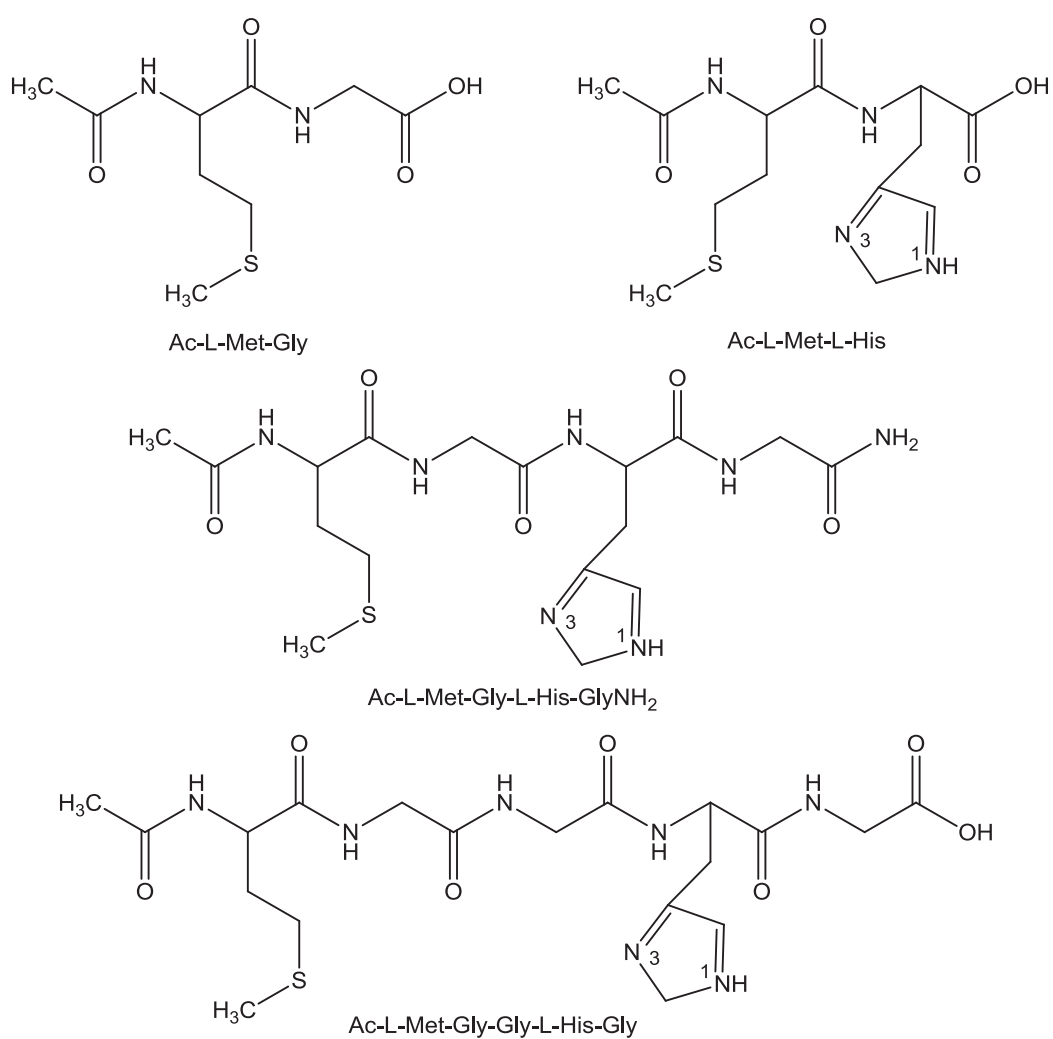
Имајући у виду биолошки значај ових реакција и њихову потенцијалну примену у биоаналитичкој пракси, ова докторска дисертација се бави синтезом нових динуклеарних комплекса платине(II) и испитивањем механизма хидролитичких реакција пептида који садрже аминокиселине L-хистидин и L-метионин у присуству различитих мононуклеарних и динуклеарних комплекса платине(II).

4.1.1. Испитивање реакција мононуклеарних комплекса платине(II) са пептидима који садрже L-метионин и L-хистидин

Реакције $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса (en је етиленедиамин, Me-mal и Me₂-mal су бидентатно координовани анјони 2-метилмалонске и 2,2-диметилмалонске киселине) са *N*-ацетилованим L-метионил-глицином (Ac-L-Met-Gly) и пептидима који у својој структури садрже L-метионин и L-хистидин, *N*-ацетилованим L-метионил-L-хистидином (Ac-L-Met-L-His), L-метионил-глицил-L-хистидил-глициламидом (Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂) и L-метионил-глицил-глицил-L-хистидил-глицином (Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly), су изучаване помоћу ¹H NMR спектроскопије. Све реакције су извођене у 1:1 молском односу одговарајућег платина(II) комплекса и пептида у 50 mM фосфатном пуферу при pH вредности од 7,4 и на температури од 37 °C. Структурне формуле испитиваних платина(II) комплекса приказане су на слици 25, док су одговарајуће формуле испитиваних пептида дате на слици 26.



Слика 25. Структурне формуле испитиваних платина(II) комплекса



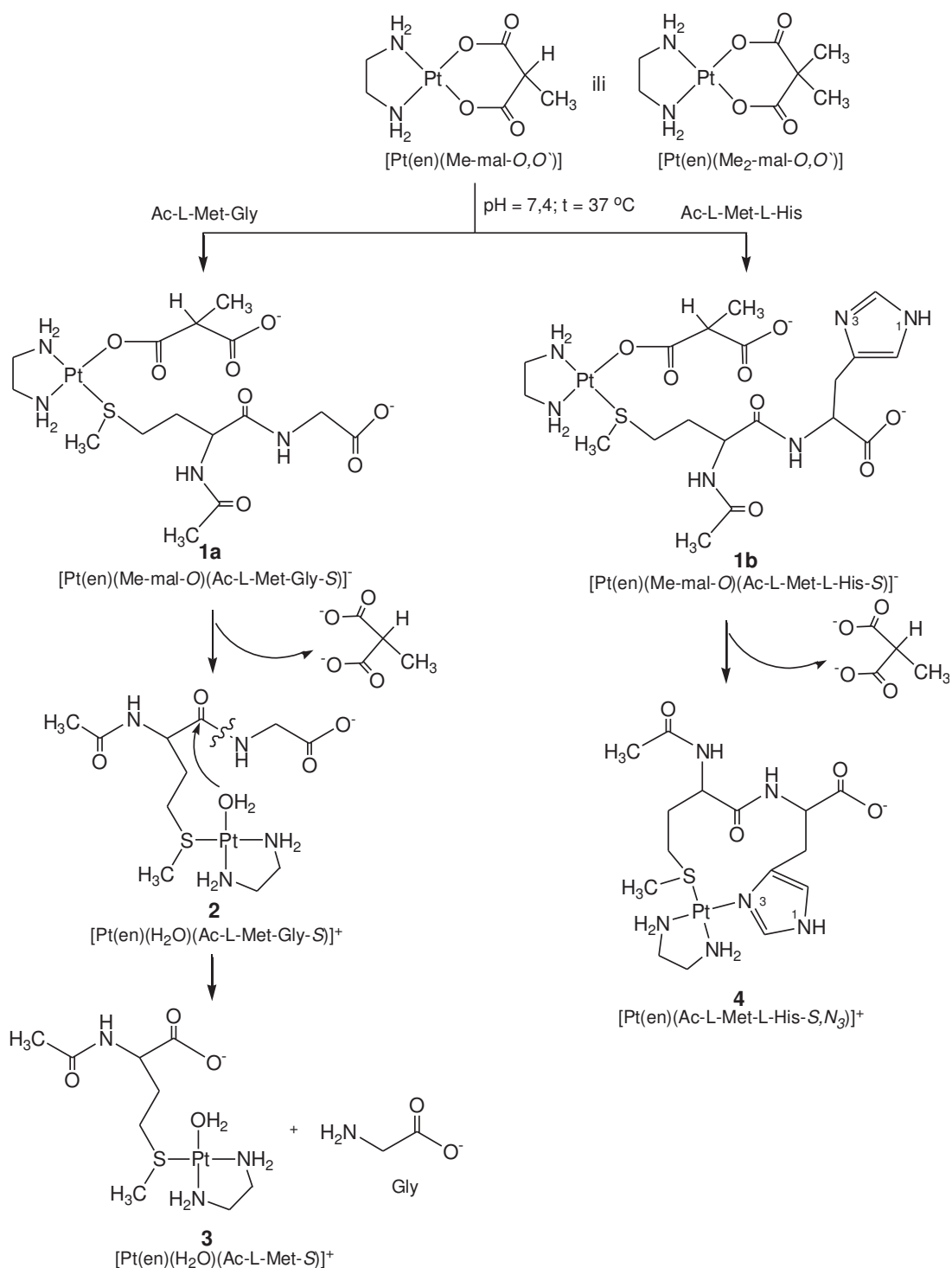
Слика 26. Структурне формуле испитиваних пептида

У овим комплексима бидентатно координовани етилендиамин не подлеже реакцијама супституције и остаје координован за Pt(II) јон током реакционог времена [152]. Међутим, бидентатно координовани Me-mal и Me₂-mal лиганди у платина(II) комплексима подлежу супституцији у реакцијама са наведеним пептидима. Нађено је да у реакцијама [Pt(en)(Me-mal-O,O')] и [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] комплекса са Ac-L-Met-Gly долази до споре, селективне хидролизе Met-Gly пептидне везе, док у реакцијама ових Pt(II) комплекса са Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly пептидима, не долази до хидролизе пептидне везе. У овим реакцијама настају стабилни макрохелатни платина(II)-пептид комплекси.

Реакције Pt(II) комплекса са Ac-L-Met-Gly

Шематски приказ хидролитичких реакција [Pt(en)(Me-mal-O,O')] и [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] комплекса са Ac-L-Met-Gly дипептидом дат је на слици 27. Када се одговарајући Pt(II) комплекс и Ac-L-Met-Gly помешају у 1:1 молском односу, под наведеним експерименталним условима, након 15 минута реакционог времена у раствору је идентификован интермедијерни Pt(II)-пептид комплекс **1a** (Слика 27). Формирање интермедијерног комплекса **1a** који садржи монодентатно координовани Me-mal, односно Me₂-mal, је брз процес и може се пратити у ¹H NMR спектру на основу смањења интензитета сигнала на 2,11 ppm који потиче од S-CH₃ протона некоординованог Ac-L-Met-Gly дипептида и повећања интензитета сигнала на 2,38 ppm који одговара S-CH₃ протонима дипептида координованог за Pt(II) јон преко атома сумпора метионинског остатка у комплексу **1a** (Табела 3).

Такође, формирање интермедијерног [Pt(en)(Me-mal-O)(Ac-L-Met-Gly-S)]⁻ комплекса (**1a**) који настаје у реакцији дипептида Ac-L-Met-Gly са [Pt(en)(Me-mal-O,O')] се може пратити у ¹H NMR спектру. Интензитети сигнала на 4,16 ppm (q, J = 6,92 Hz), који потиче од α-CH протона и сигнала на 1,37 ppm (d, J = 6,96 Hz), који потиче од CH₃ протона бидентатно координованог Me-mal лиганда у [Pt(en)(Me-mal-O,O')] комплексу током реакционог времена опадају док интензитети нових сигнала на 3,29 (q, J = 7,02 Hz) за α-CH и 1,24 ppm (d, J = 7,14 Hz) за CH₃, који одговарају овим протонима за Me-mal лиганд у комплексу **1a** током времена расту (Слика 27 и Табела 3).



Слика 27. Шематски приказ реакција Ac-L-Met-Gly, Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly пептида са $[Pt(en)(Me-mal-O,O')]$ и $[Pt(en)(Me_2-mal-O,O')]$ комплексима. Пептиди и одговарајући Pt(II) комплекси су реаговани у 1:1 молском односу

Табела 3. ^1H NMR хемијска померања (δ , ppm) за производе који настају у реакцијама $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ са Ac-L-Met-Gly дипептидом при физиолошким условима ($\text{pH} = 7,4$ и 37°C) у D_2O као растварачу

Реактант/Производ	Карактеристична ^1H NMR хемијска померања (δ , ppm; J , Hz)*				
	$\alpha\text{-CH-mal}$	$\text{CH}_3\text{-mal}$	$(\text{CH}_3)_2\text{-mal}$	$\text{CH}_3\text{-Met}$	Gly-CH_2
Ac-L-Met-Gly				2,11(s)	3,78 (s)
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$	4,16(<i>q</i>) $J = 6,92$	1,37(<i>d</i>) $J = 6,96$			
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$			1,77 (s)		
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O)(\text{Ac-L-Met-Gly-S})^-]$ (1a)	3,29(<i>q</i>) $J = 7,02$	1,24(<i>d</i>) $J = 7,14$		2,38 (s)	3,78 (s)
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O)(\text{Ac-L-Met-Gly-S})^-]$ (1a)			1,27 (s)	2,38 (s)	3,78 (s)
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})^+]$ (2)				2,38 (s)	3,78 (s)
слободан Me-mal		1,31(<i>d</i>)			
слободан $\text{Me}_2\text{-mal}$			1,34 (s)		
слободан Gly					3,56 (s)

*У свим комплексима мултиплет метиленских протона је центриран на 2,70 ppm.

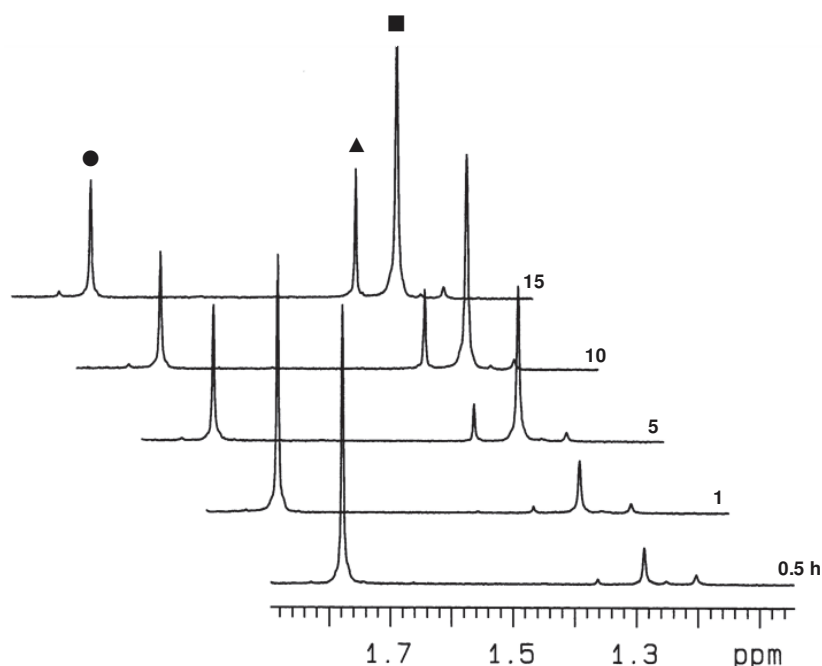
Ова хемијска померања су у сагласности са одговарајућим за отварања шесточланог прстена, бидентатно координованог Me-mal лиганда у реакцијама $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ комплекса са Ac-L-Met и Met-Gly [153]. Формирање **1a** интермедијерног комплекса у реакцији $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ и Ac-L-Met-Gly може се пратити у ^1H NMR спектру на основу смањења интензитета синглета на 1,77 ppm који потиче од метил протона бидентатно координованог $\text{Me}_2\text{-mal}$ лиганда у $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплексу и пораста интензитета новог сигнала на 1,27 ppm који одговара овим протонима за $\text{Me}_2\text{-mal}$ лиганд монодентатно координован за Pt(II) јон (комплекс **1a**, Слика 27 и Табела 3). Међутим, применом ^1H NMR спектроскопије, није могуће пратити отварање бидентатно координованог mal- O,O' прстена у реакцији $[\text{Pt}(\text{en})(\text{mal-}O,O')]$ комплекса (mal- O,O' је бидентатно координован анјон малонске киселине) са Ac-L-Met-Gly, због брзе измене киселих $\alpha\text{-CH}_2$ протона са деутерисаним протонима растварача (D_2O). Такође, до H/D-измене долази и када се слободна малонска киселина раствори у D_2O [154,155]. Формирање интермедијерног **1a** комплекса може се пратити

током времена као реакција другог реда. Нађено је да је реакција $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ са Ac-L-Met-Gly ($k_2 = (26,20 \pm 0,62) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) око шест пута бржа у односу на аналогну реакцију $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса са истим дипептидом ($k_2 = (4,05 \pm 0,04) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Табела 4).

Табела 4. Константе брзине за реакције $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса са Ac-L-Met-Gly и Ac-L-Met-L-His дипептидима, при физиолошким условима ($\text{pH} = 7,4$ и 37°C) у D_2O као растварачу

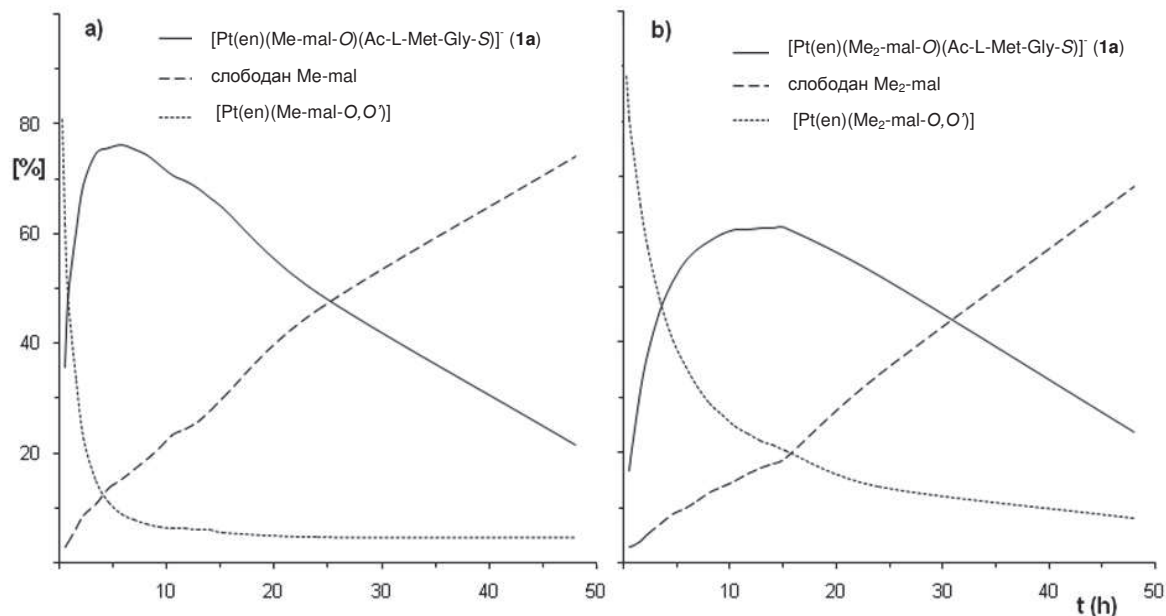
Реакција	Константа другог реда за формирање комплекса отвореног- прстена 1a (Ac-L-Met-Gly) и 1b (Ac-L-Met-L-His) $10^3 k_2 / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Константа првог реда за конверзију 1a у 2 (Ac-L-Met-Gly) и 1b у 4 (Ac-L-Met-L-His) $10^6 k / \text{s}^{-1}$
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ + Ac-L-Met-Gly	$(26,20 \pm 0,62)$	$(3,02 \pm 0,02)$
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ + Ac-L-Met-Gly	$(4,05 \pm 0,04)$	$(1,45 \pm 0,02)$
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ + Ac-L-Met-L-His	$(11,95 \pm 0,31)$	$(5,22 \pm 0,03)$
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ + Ac-L-Met-L-His	$(6,19 \pm 0,02)$	$(5,98 \pm 0,03)$

Током реакције хидролитички неактивни комплекс **1a** прелази у хидролитички активни комплекс **2** (Слика 27). Супституција монодентатно координованих Me-mal и $\text{Me}_2\text{-mal}$ лиганата са молекулом воде може се пратити у ^1H NMR спектру на основу смањења интензитета дублета на 1,24 ppm и синглета на 1,27 ppm који потичу од метил протона монодентатно координованих Me-mal , односно $\text{Me}_2\text{-mal}$, и пораста интензитета сигнала на 1,31 ppm и 1,34 ppm који потичу од одговарајућих протона слободних Me-mal и $\text{Me}_2\text{-mal}$ лиганата (Табела 3). На слици 28 приказан је део ^1H NMR спектра реакције $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса са Ac-L-Met-Gly током времена.



Слика 28. Делови ^1H NMR спектра за реакцију $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ са еквимоларном количином Ас-*L*-Met-Gly дипептида у функцији времена на $37\text{ }^\circ\text{C}$ у 50 mM фосфатном пуферу ($\text{pH } 7,40$) у D_2O као растварачу у односу на TSP као референтни стандард, (■) протони метил групе $\text{Me}_2\text{-mal}$ у $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O)(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]$ комплексу, (▲) протони метил групе слободне $\text{Me}_2\text{-mal}$ и (●) протони метил групе $\text{Me}_2\text{-mal}$ у $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплексу

Промена концентрације [%] комплекса **1a**, слободног Me-mal и $\text{Me}_2\text{-mal}$, као и промена концентрације испитиваних $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса за време од 48h приказана је на слици 29. Из ове слике се може видети да концентрација комплекса **1a** расте током првих 5 h реакционог времена за Me-mal и 15 h за $\text{Me}_2\text{-mal}$ комплекс. Након овог времена концентрација **1a** опада и после 48h у раствору је присутно око 25% овог комплекса. Супституција монодентатно координованог Me-mal односно $\text{Me}_2\text{-mal}$ лиганда у комплексу **1a** са молекулом воде, односно настајање комплекса **2** из **1a**, посматрана је као реакција првог реда. На основу ^1H NMR мерења израчунато је да вредности константи брзине за ове реакције износе: $k = (3,02 \pm 0,02) \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ за Me-mal, односно $k = (1,45 \pm 0,02) \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ за $\text{Me}_2\text{-mal}$ (Табела 4).



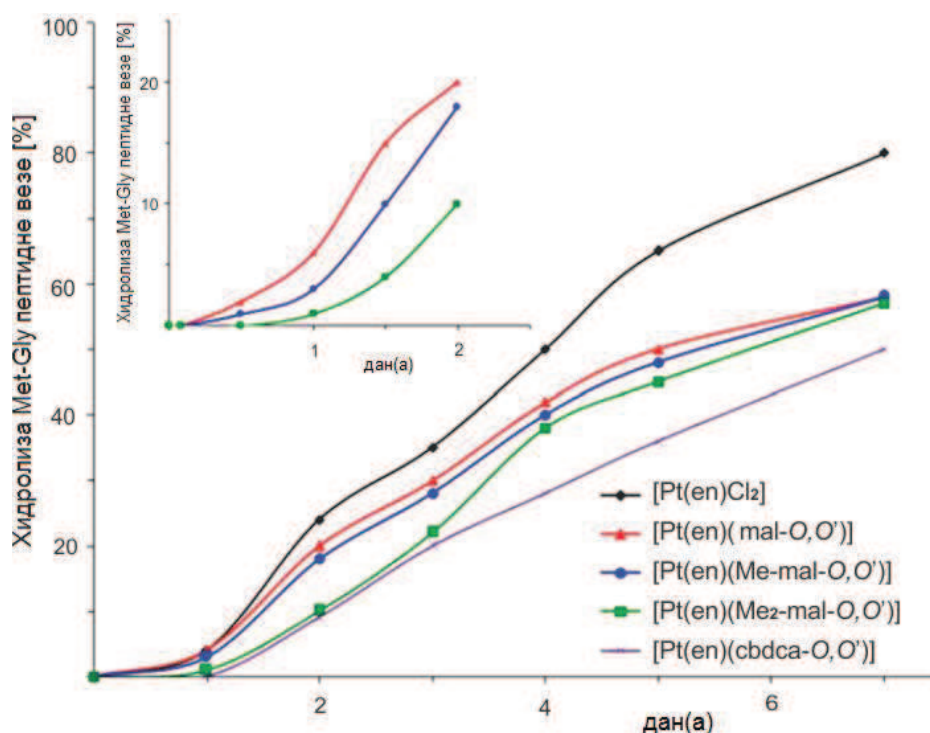
Слика 29. Временска зависност промене концентрације [%] Me-mal, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]^-$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]^-$ за реакцију $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]^-$ са Ac-L-Met-Gly (a) и Me₂-mal, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]^-$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]^-$ за реакцију $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]^-$ са Ac-L-Met-Gly (b)

Ранији резултати су показали да координовани молекул воде у Pd(II) и Pt(II) комплексима има значајну улогу у реакцијама региоселективне хидролизе пептидне везе у пептидима који садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин [95,116,117,120,121,156]. Према томе, након супституције монодентатно координованог Me-mal и Me₂-mal лиганда у комплексу **1a** са молекулом воде настаје хидролитички активан комплекс **2**, који катализује хидролизу Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду (Слика 27). Хидролиза ове пептидне везе се може пратити у ¹H NMR спектру. Интензитет сигнала на 3,78 ppm који потиче од глицинских протона нехидролизованог пептида се смањује, док интензитет сигнала на 3,56 ppm који потиче од -CH₂- протона слободног глицина са временом расте (Табела 3). Додатком глицина у реакциону смешу долази до повећања интензитета сигнала на 3,56 ppm, чиме је јасно потврђено да овај сигнал потиче од слободног глицина. Из односа интеграла сигнала

слободног глицина и сигнала који одговара почетној концентрацији Ас-L-Met-Gly израчунат је проценат хидролизе Met-Gly пептидне везе.

Каталитичка способност $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса у испитиваним реакцијама је одређена израчунавањем процента хидролизованог Ас-L-Met-Gly у току времена, под наведеним експерименталним условима. Концентрација слободног и хидролизованог дипептида је одређивана сваких четири сата, а реакција је праћена у току седам дана. Временска зависност реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе у реакцијама Ас-L-Met-Gly дипептида са $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплексима је приказана на слици 30.

У овом раду поређене су каталитичке способности $[\text{Pt}(\text{en})(\text{mal-}O,O')]$, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')]$ комплекса у хидролизи Met-Gly пептидне везе у Ас-L-Met-Gly дипептиду, са раније испитиваним $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{cbdca-}O,O')]$ комплексима (Слика 30) [128]. Као што се на слици 30 може видети, каталитичка способност Pt(II) комплекса расте у следећем низу: $[\text{Pt}(\text{en})(\text{cbdca-}O,O')] < [\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')] < [\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')] < [\text{Pt}(\text{en})(\text{mal-}O,O')] < [\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$. Разлике у каталитичкој способности ових комплекса могу се приписати стерном ефекту одлазећег анјонског (Cl^- , mal, односно cbdca) лиганда. Такође, са графика који је инсертован на слици 30 се може видети да три Pt(II)-малонато комплекса, који се разликују по броју метил група везаних за α -угљеников атом, имају различиту каталитичку способност. Проценат хидролизе пептидне везе у дипептиду опада у следећем низу: mal > Me-mal > Me₂-mal (Слика 30), што указује на директну зависност брзине хидролизе и броја метил група у одлазећем малонато лиганду. До истог закључка се може доћи и на основу поређења кинетичких података приказаних у Табели 4. Из ове табеле се види да супституција монодентантно координованог Me₂-mal лиганда са молекулом воде у комплексу **1a** је два пута спорија у односу на одговарајућу супституцију Me-mal лиганда. Формирање хидролитички активног комплекса **2** је фаза која одређује брзину реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе. Разлика у брзини супституције малонато лиганда зависи и од стабилности њихових интермедијерних комплекса (комплекс **1a**) који садрже монодентатно координовани малонато лиганд.



Слика 30. Временска зависност реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду у реакцији са различитим Pt(II) комплексима. Инсертовани график приказује хидролизу Met-Gly везе у присуству три Pt(II)-малоната комплекса за време од два дана

Реакција Pt(II) комплекса са пептидима који садрже L-метионин и L-хистидин у бочном низу

Реакције $[Pt(en)(Me-mal-O,O')]$ и $[Pt(en)(Me_2-mal-O,O')]$ комплекса са пептидима који у бочном низу садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин (Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly, слика 26), су изучаване применом ¹H NMR спектроскопије. Све реакције су извођене у 1:1 молском односу одговарајућег Pt(II) комплекса и пептида у 50 mM фосфатном пуферу при pH вредности од 7,4 у D₂O и температури од 37 °C. У свим испитиваним реакцијама након 48 h идентификован је у раствору само један Pt(II)-пептид комплекс **4** (Слика 27). Као што је приказано на слици **27**, у комплексу **4** пептид је хелатно координован за Pt(II) јон преко N3 атома имидазоловог прстена L-хистидина и тиоетарског атома сумпора L-метионина. Испитиване реакције праћене су за време од 15 дана, при чему је

закључено да је комплекс **4** веома стабилан и да не долази до хидролизе пептидне везе. У наведеним пептидима нађено је да у првој фази ових реакција долази до монодентатне координације Met-His-секвенце пептида за Pt(II) преко тиоетарског атома сумпора метионина. Формирање овог интермедијерног производа (**1b**) је брз процес, и може се пратити у ^1H NMR спектру на основу смањења интензитета сигнала на 2,10 – 2,11 ppm који потичу од *S*-метил протона некоординованих Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly пептида и повећања интензитета сигнала на 2,57 – 2,60 ppm, који одговара *S*-метил протонима ових пептида координованих за Pt(II) јон преко атома сумпора метионинског остатка (Табела 5). Хемијска померања за формирани **1b** интермедијерни комплекс су у сагласности са хемијским померањима за раније описане реакције Pt(II) комплекса са различитим пептидима који садрже L-метионин [126,152]. Да би дошло до формирање комплекса **1b**, односно до монодентатне координације Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly пептида за [Pt(en)(Me-mal-*O,O'*)] и [Pt(en)(Me₂-mal-*O,O'*)] комплексе долази до отварања малонатног прстена у овим комплексима. Овај процес се може пратити у ^1H NMR спектру на основу разлике у хемијским померањима метил протона Me-mal и Me₂-mal лиганата бидентатно, односно монодентатно координованих за Pt(II) јон. Хемијска померања су приближна са хемијским померањима за реакције [Pt(en)(Me-mal-*O,O'*)] и [Pt(en)(Me₂-mal-*O,O'*)] комплекса са Ac-L-Met-Gly дипептидом (Табела 3). Константе другог реда за формирање комплекса **1b** су одређене на основу ^1H NMR мерења и дате су у Табели 4. Интензитет дублета на 1,37 ppm (који потиче од метил протона Me-mal у [Pt(en)(Me-mal-*O,O'*)] и синглета на 1,77 ppm (који потиче од метил протона Me₂-mal у [Pt(en)(Me₂-mal-*O,O'*)] комплексу) се током времена смањују, док интензитети нових сигнала на 1,24 ppm и 1,27 ppm који потичу од метил протона монодентатно координованих малонато лиганата у комплексу **1b** ([Pt(en)(Me-mal-*O*)(Ac-L-Met-L-His-*S*)], односно [Pt(en)(Me₂-mal-*O*)(Ac-L-Met-L-His-*S*)] током времена расту. Реакција формирања комплекса **1b** је реакција другог реда и на основу познате почетне концентрације Pt(II) комплекса и промене интеграла напред описаних сигнала одређене су константе брзине за реакције [Pt(en)(Me-mal-*O,O'*)] и [Pt(en)(Me₂-mal-*O,O'*)] комплекса са Ac-L-Met-L-His. Поређењем бројних вредности константи ових реакција

($k_2 = (11,95 \pm 0,31) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ за Me-mal и $k_2 = (6,19 \pm 0,02) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ за Me₂-mal комплекс) са константама за реакције Pt(II) комплекса са Ac-L-Met-Gly дипептидом, закључено је да се формирање комплекса **1a** и **1b** одвија приближно истом брзином (Табела 4).

У другој фази реакција Pt(II) комплекса и Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly пептида настају веома стабилан макрохелатни Pt(II)-пептид комплекси **4** (Слика 27). Конверзија **1b** у комплекс **4** праћена је интрамолекулском супституцијом монодентантно координованог Me-mal, односно Me₂-mal лиганда из комплекса **1b**, са N3 атомом азота имидазоловог прстена хистидинског остатка. Формирање комплекса **4** може се пратити у ¹H NMR спектру на основу смањања интензитета сигнала који потичу од метил протона Me-mal и Me₂-mal лиганда монодентантно координованих за Pt(II) јон, док интензитет сигнала метил протона за некоординоване Me-mal и Me₂-mal лиганде временом расте. Хемијска померања сигнала који одговарају монодентатно координованим Me-mal и Me₂-mal лигандима у комплексу **1b** и некоординованим лигандима су идентична са хемијским померањима која одговарају за реакцију формирања комплекса **2** из **1a** комплекса (Слика 27, Табела 3). Поред тога, формирање макрохелатног Pt(II) комплекса **4** може се пратити применом ¹H NMR спектроскопије. Интензитет сигнала који потичу од C2H и C5H протона некоординованог имидазола из хистидинског остатка се смањују током времена, док се у спектру јављају два нова сигнала који потичу од истих протона макрохелатног комплекса **4**.

Као што се може видети из података приказаних у Табели 5, хемијска померања за C2H протоне су већа ($\Delta\delta = 0,22 - 0,31 \text{ ppm}$) у односу на хемијска померања C5H ($\Delta\delta = 0,12 - 0,17 \text{ ppm}$), што се може приписати чињеници да је C2H протон ближи центру координовања, односно N3 атому азота [119,157,158]. Вредности константи првог реда за реакције интрамолекулске супституције, односно формирање комплекса **4** из **1b** за Me-mal комплекс износи $k = (5,22 \pm 0,03) \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, док је за Me₂-mal $k = (5,98 \pm 0,03) \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Поређењем бројних вредности ових константи са бројним вредностима константи за реакцију формирања комплекса **2** из **1a** (Табела 4), може се закључити да је N3 атом азота имидазоловог прстена у пептидима са -Met-His-секвенцом бољи нуклеофил у односу на молекула воде у реакцији са Ac-L-Met-Gly дипептидом. Нађено је да у свим

испитиваним реакцијама Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly пептида са Pt(II) комплексом долази до макрохелатне *S,N3*-координације пептида. Такође, број глицинских остатака (један или два) између метионинског и хистидинског остатка не утиче на брзину формирања хидролитички неактивног комплекса **4**.

Табела 5. ¹H NMR хемијска померања (δ , ppm) за пептиде са -Met-His-секвенцом и одговарајућих макрохелатних Pt(II)-пептид комплекса **4** који настају у реакцији [Pt(en)(Me-mal-*O,O'*)] и [Pt(en)(Me₂-mal-*O,O'*)] комплекса са пептидима на pH 7,40 и 37 °C у D₂O.

Пептид/Макрохелат Pt(II)-пептид комплекс 4	Имидазолони протони		<i>S</i> -CH ₃	Gly1 CH ₂	Gly2 CH ₂	Gly3 CH ₂
	C2H	C5H				
Ac-L-Met-L-His	8,44	7,20	2,10			
[Pt(en)(Ac-L-Met-L-His- <i>S,N3</i>)] ⁺	8,13	7,08	2,58; 2,60			
Ac-L-Met-Gly1-L-His-Gly2-NH ₂	8,31	7,19	2,11	3,93	3,93	
[Pt(en)(Ac-L-Met-Gly-L-His-Gly-NH ₂ - <i>S,N3</i>)] ⁺	8,09	7,02; 6,97	2,57	3,98	3,93	
Ac-L-Met-Gly1-Gly2-L-His-Gly3	8,61	7,34	2,11	4,04	3,96	3,80
[Pt(en)(Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly- <i>S,N3</i>)] ⁺	8,07	7,09	2,59	4,00	3,94	3,81

На основу ових испитивања може се закључити да у реакцијама [Pt(en)(Me-mal-*O,O'*)] и [Pt(en)(Me₂-mal-*O,O'*)] комплекса са *N*-ацетилованим Ac-L-Met-Gly, Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly пептидима при физиолошким условима (pH = 7,4 и 37 °C), у првој фази долази до формирања Pt(II)-пептид комплекса који садржи монодентатно координовани малонато лиганд и пептид монодентатно координован преко атома сумпора из метионинског остатка. Овај интермедијерни производ је стабилан у раствору и подлеже веома спорој интермолекулској супституцији са молекулом воде у реакцији са Ac-L-Met-Gly, односно интрамолекулској супституцији са *N3* атомом азота имидазоловог прстена хистидинског остатка у реакцијама са Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly пептидима. Супституција Me-mal и Me₂-mal са молекулом воде доводи до формирања хидролитички активног Pt(II)-пептид комплекса који катализује веома

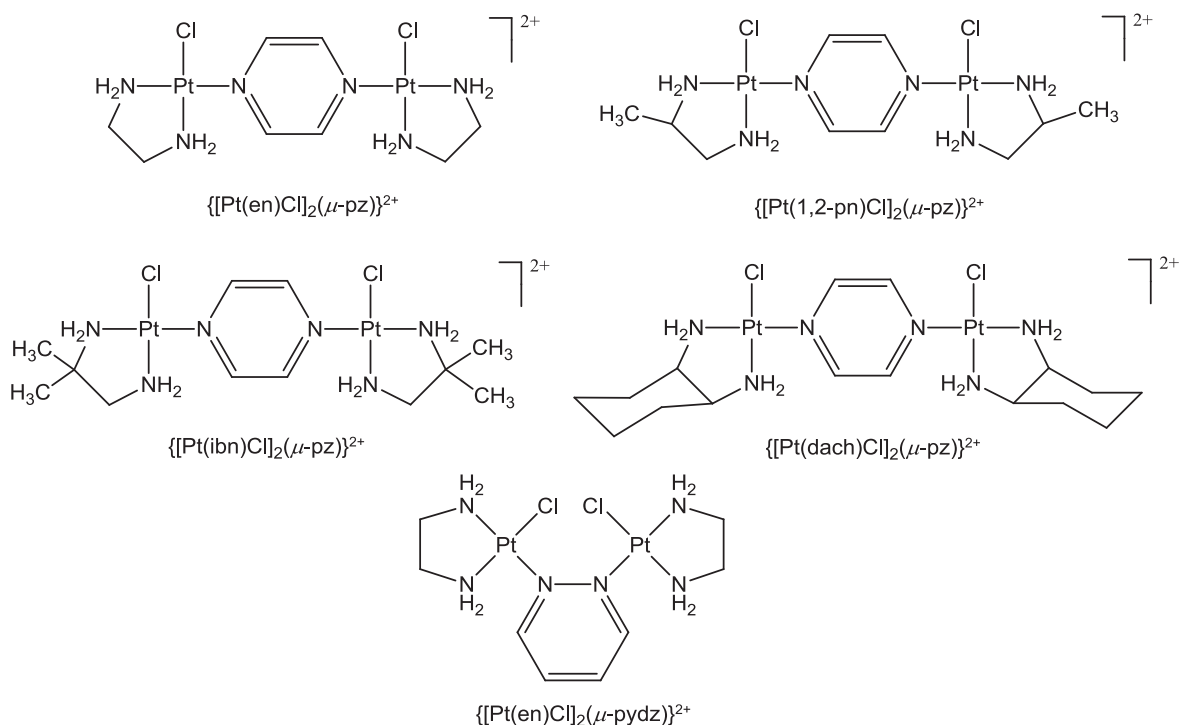
спору хидролизу Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду. Међутим, интрамолекулска супституција монодентатно координованих малонато анјона са *N*3 атомом из Ac-L-Met-L-His-типа пептида доводи до формирања веома стабилног хидролитички неактивног макрохелатног Pt(II)-пептид комплекса.

Ови резултата показују да Pt(II) комплекси могу да хидролизују пептидну везу у пептидима који садрже аминокиселину L-метионин при физиолошким условима рН и температуре, може бити од значаја за боље разумевање токсичног ефекта антитуморских Pt(II) комплекса. Такође, макрохелатно координовање пептида са -Met-His-секвенцом за Pt(II) комплексе може се довести у везу са токсичним ефектом антитуморских Pt(II) комплекса. Ови резултати могу бити од значаја код синтезе нових комплекса платине који ће потенцијално имати већу антитуморску активност и мање токсично деловање.

4.1.2. Синтеза и карактеризација динуклеарних комплекса платине(II) и испитивање њихових реакције са пептидима

У овом раду синтетизовано је пет нових динуклеарних $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-X)\}Cl_2$ комплекса (где је L етилендиамин, en; (±)-1,2-пропилендиамин, 1,2-pn; изобутилендиамин, ibn; *trans*-(±)-1,2-диаминоциклохексан, dach; а X је пиразин, pz; или пиридазин, pydz). Структуре ових комплекса су претпостављене на основу резултата 1H и ^{13}C NMR спектроскопије и елементарне микроанализе. Кристалне структуре $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu-pz)\}Cl_2$ и $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu-pydz)\}Cl_2$ комплекса су одређене применом рендгенске структурне анализе. Структурне формуле Pt(II) комплекса приказане су на слици 31. Шематски приказ реакције синтезе ових комплекса је дат на слици 32. Мононуклеарни платина(II) комплекси $[Pt(L)Cl_2]$ -типа (Слика 32) добијени су у реакцији K_2PtCl_4 и еквимоларне количине одговарајућег диаминског лиганда (L), у складу са поступком који је описан у литератури [57,128,145]. У диметилформаиду као растварачу у реакцији $[Pt(L)Cl_2]$ комплекса и еквимоларне количине $AgNO_3$ долази до супституције једног хлоридо лиганда са молекулом растварача. У реакцији добијеног $[Pt(L)Cl(DMF)]^+$ комплекса и пиразина односно пиридазина, приказаној на слици 32, настаје динуклеарни $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-X)\}Cl_2$ комплекс. Сви комплекси су кристалисали из воденог раствора LiCl. У експерименталном делу дисертације под бројем 3.5 приказани

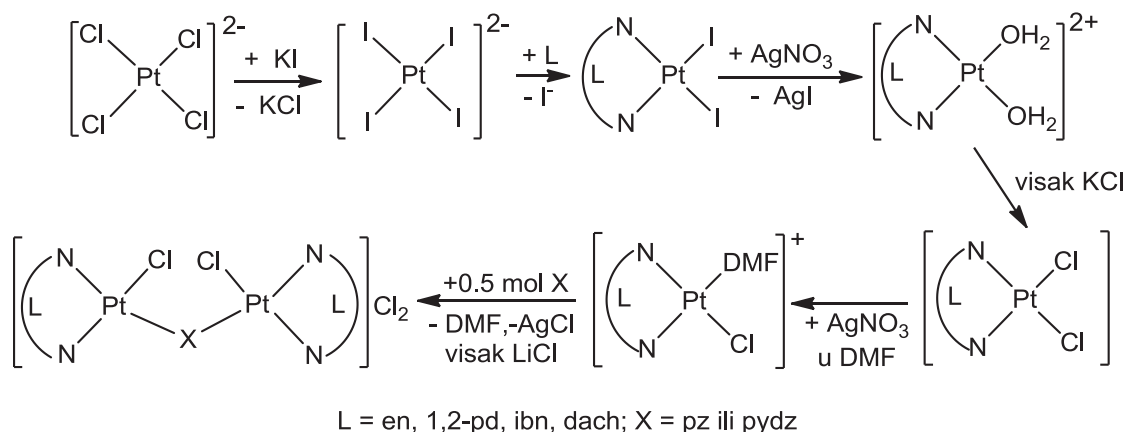
су NMR подаци синтетизованих комплекса и они су у сагласности са резултатима за сличне комплексе који су раније описани у литератури [57,120,128]. Као што је приказано на слици 31, сви испитивани Pt(II) комплекси имају мостни пиазински, односно пиридазински лиганд и разликују се у бидентатно координованом диаминском лиганду L.



Слика 31. Структурне формуле динуклеарних Pt(II) комплекса

Синтетизовани комплекси су преведени у одговарајуће аква комплексе, $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$. Применом 1H NMR спектроскопије изучаване су реакције динуклеарних Pt(II) комплекса са пептидима који у бочном низу садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин: N-ацетилзовани L-метионил-глицин (Ac-L-Met-Gly), L-хистидил-глицин (Ac-L-His-Gly) и L-метионил-глицил-L-хистидил-глицинамид (Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂) (Слика 26).

Терминална амино група у овим пептидима је ацетилована да би се спречило њено координовање за Pt(II). Реакције комплекса Pt(II) са пептидима су изучаване у pH области од 2,0 до 2,5 на 37 °C у D₂O као растварачу.



Слика 32. Шематски приказ синтезе динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-X})\}\text{Cl}_2$ комплекса

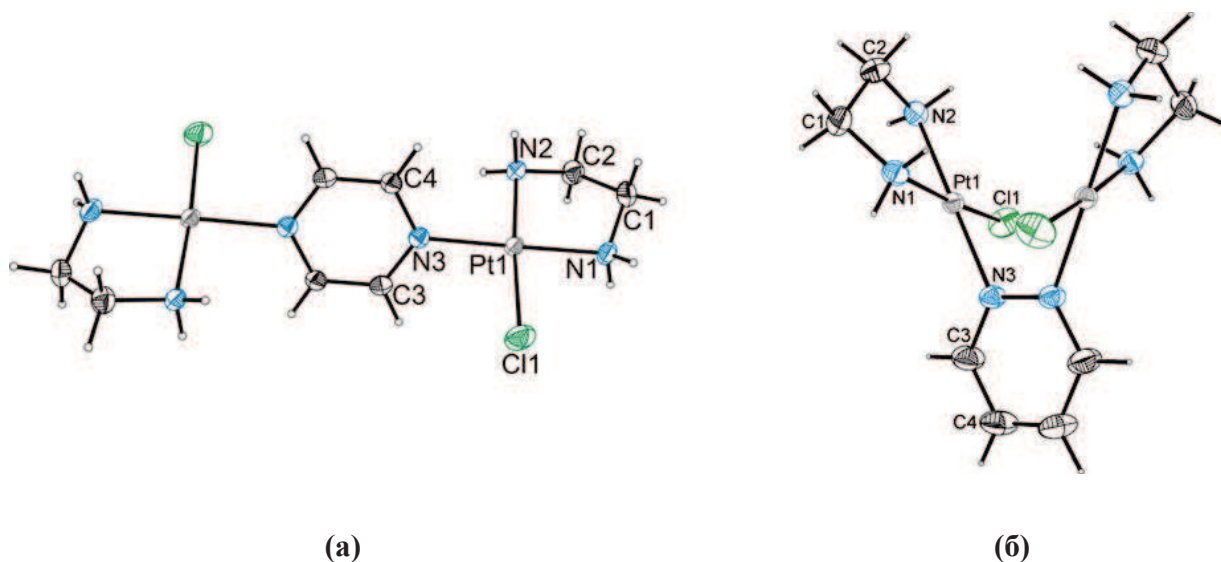
Као што су претходна истраживања показала, кисела средина у овим реакцијама је неопходна да би се спречило формирање полимерних хидроксо-платина(II) комплекса, који су хидролитички неактивни [95,116,117,152,183,184]. Хелатни диамински и мостни пиразински односно пиридазински лиганди у овим комплексима су инертни у односу на супституционе реакције и очекује се да остану координовани за платину(II) јон током реакције са Ac-L-Met-Gly, Ac-L-His-Gly и Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ пептидима.

Опис кристалних структура $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса

Опис кристалне структуре $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ комплекса. Кристалне структуре $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса су приказане на слици 33. Резултати рендгенске структурне анализе су показали да су синтетизовани комплекси платине(II) динуклеарни и да су два Pt(II) јона повезана мостним пиразинским односно пиридазинским лигандом. Одабрани геометријски параметри за $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ комплекс дати су у табели 6.

Комплекс $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ кристалише у P2₁/n просторној групи и поседује центар инверзије тако да има C_i симетрију. Оба атома платине(II) имају приближно квадратно-планарну геометрију, са једном Pt-Cl везом, једном Pt-N пиразин (pz) везом и две Pt-N везе које потичу од бидентатно координованог етилендиаминског лиганда.

Растојање Pt---Pt је 6,7890(3) Å и одговара средњој вредности од 6,815(8) Å која је израчунато на основу 17 кристалних структура, које садрже динуклеарни Pt(II) комплекс са пиразином као мостним лигандом у кристалографској бази података CSD [185] (CSD = Cambridge Structural Database).



Слика 33. Кристалне структуре $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}^{2+}$ (a) и $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}^{2+}$ (b) комплексних катјона. Елипсоди су дати са 40% вероватноће, а водоникови атоми су приказани као мале сфере произвољног пречника.

Табела 6. Дужине веза (Å) и углови веза ($^\circ$) у $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ комплексу

Pt1—N1	2,032 (3)	Pt1—N3	2,018 (3)
Pt1—N2	2,040 (3)	Pt1—Cl1	2,2980 (10)
N1—Pt1—N2	83,24 (12)	N1—Pt1—Cl1	92,82 (10)
N1—Pt1—N3	175,61 (12)	N2—Pt1—Cl1	175,67 (9)
N2—Pt1—N3	93,51 (11)	N3—Pt1—Cl1	90,52 (8)
Pt1—N1—C1—C2	-41,0 (4)	C2—N2—Pt1—N1	13,2 (2)
N1—C1—C2—N2	52,1 (4)	N2—Pt1—N1—C1	15,7 (3)
C1—C2—N2—Pt1	-38,5 (4)		

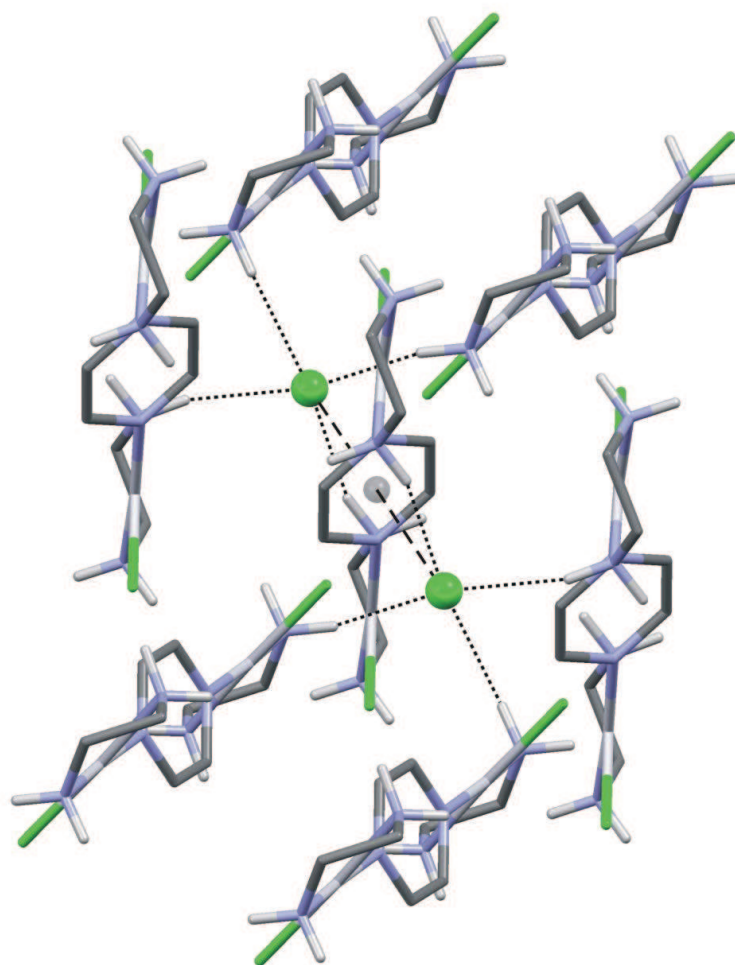
Два хлоридо и два етилендиаминска лиганда су међусобно у *trans* оријентацији тако да $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}^{2+}$ комплексни катјон има центар инверзије односно C_i молекулску симетрију. Положаји атома који су директно координовани за Pt(II)

одступају мање од 0,045 Å од просечне равни. Положаји атома Pt одступају од ове равни за само 0,010(1) Å, а у односу на раван прстена за 0,084(6) Å. Дужине Pt–N веза имају очекиване вредности, само су Pt–N(етилендиамин) растојања незнатно већа (2,032(3) и 2,040(3) Å), у односу на Pt–N(пиразин) (2,018(3) Å), што је последица веће електронске густине на атому азота пиразина у поређењу са атомима азота етилендиамина. Дужина Pt–Cl веза износи 2,298(3) Å. Углови које граде N1–Pt–Cl(1), Cl1–Pt–N3 и N3–Pt–N2 везе су 92,8(1)°, 90,5(1)° и 93,5(1)°, док угао N1–Pt–N2 у петочланом хелатном прстену је само 83,2(1)°. Вредност овог угла је у сагласности са средњом вредношћу N–Pt–N углова у комплексима платине(II) који садрже етилендиамин (средња вредност угла је 83,33(6)° и израчуната је на основу 207 структура са $R < 5\%$ [185]). Координовани пиразински прстен налази се ван Pt(II) квадратно-планарне равни.

Диедарски угао између две равни, једне у којој се налази пиразински прстен и друге квадратно-планарне равни Pt(II) јона износи 58,4(1)°. Диедарски углови за Cl1–Pt–N3–C3 равни износи -60,6(3)°, док за Cl1–Pt–N3–C4 износи 122,9(3)°. Етилендиамински прстенови заузимају увијену (*twist*) конформацију (један има λ , а други δ) у односу на апроксимативну осу другог реда која приближно пролази кроз C1–C2 везу. Конформација петочланог диаминског прстена одређена је на бази “Cremer-Pople”-ових параметара и они износе 0,439(4)Å и -92,0(4)° (рачунати програмом PARST/WinGX) [186].

Кристално паковање $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$ комплекса. Комплексни катјони $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}^{2+}$, формирају колоне дуж *a*-правца, са растојањем од 5,077(1)Å између Pt(II) јона и пиразинских прстенова (Слика 34). Некоординовани хлоридни анјони (Cl2) се налазе изнад и испод пиразинских прстенова и учествују у анјон... π интеракцијама са ароматичним прстеновима пиразина. Пиразински прстен има већу електронску густину у односу на триазински прстен где је већина анјон... π интеракција уочена. Експериментално и теоријски је доказано да након координације хетероароматичних прстенова за јон метала, долази до јачих анјон... π интеракција [164,169,171,187]. Сходно томе, у испитиваном комплексу пиразински прстен је додатно активиран координовањем за два Pt(II) центра. Растојање Cl2---C_g (C_g означава центар пиразинског прстена) износи 3.410Å, док угао Cl2---C_g---Cl2 износи 12,9°.

Mascal и сарадници су нашли да средње растојање између хлоридног анјона и ароматичног прстена 1,3,5-триазина износи 3,2 Å [166]. Као што се са слике 34 може видети, Cl2 анјон учествује у водоничном везивању са N–H групама четири комплексна катјона. Параметри водоничних веза су дати у Табели 7. Координовани хлоридо анјон (Cl1) не учествује у водоничним везама или било којим другим интермолекулским интеракцијама.



Слика 34. Специфичне интермолекулске интеракције између комплексног катјона и некоординованих хлоридних анјона у кристалној структури $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$ комплекса. NH \cdots Cl водоничне везе су обележене испрекиданим линијама, док анјон $\cdots\pi$ интеракције између хлоридног анјона и пиразинског прстена су приказане цртицама. Приказани су само Н атоми који учествују у водоничним везама

Табела 7. Дужине и углови интермолекулских водоничних веза у $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ комплексу

$D\cdots H\cdots A$	$D\cdots H$ (Å)	$H\cdots A$ (Å)	$D\cdots A$ (Å)	$D\cdots H\cdots A$ (°)
N1—H1B \cdots Cl2	0,90	2,44	3,291 (3)	156,9
N1—H1A \cdots Cl2 ⁱ	0,90	2,41	3,230 (3)	150,9
N2—H2A \cdots Cl2 ⁱⁱ	0,90	2,46	3,313 (3)	157,4
N2—H2B \cdots Cl2 ⁱⁱⁱ	0,90	2,34	3,211 (3)	161,9

Опис кристалне структуре $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса. Комплекс $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ (Слика 33а) кристалише у центросиметричној $C2/c$ просторној групи са $Z = 4$. Одабрани геометријски параметри за $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекс дати су у табели 8. За разлику од $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}^{2+}$ катјона, у коме два етилендиаминска петочлана прстена заузимају конформације супротног хелицитета (λ и δ), комплексни катјон $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}^{2+}$ који поседује C_2 молекулску симетрију, има два етилендиаминска прстена у *увијеној* конформацији истог хелицитета, то јест δ у случају молекула приказаног на слици 33а.

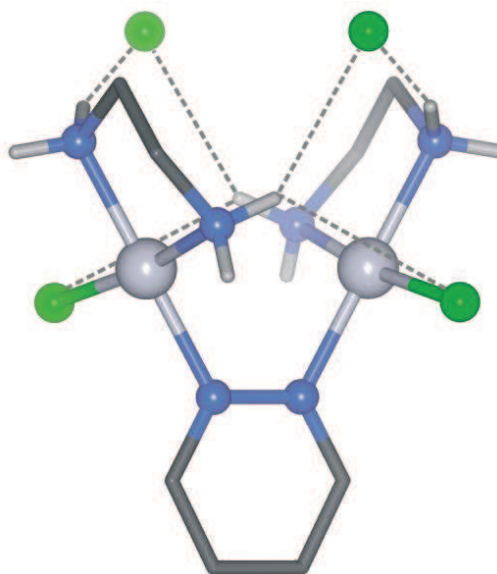
Табела 8. Дужине веза (Å) и углови веза (°) у $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплексу

Pt1—N2	2,011 (4)	N3—C3	1,325 (7)
Pt1—N3	2,027 (4)	N3—N3 ⁱ	1,342 (9)
Pt1—N1	2,048 (4)	C2—C1	1,497 (8)
Pt1—Cl1	2,3036 (15)	C3—C4	1,368 (9)
N1—C1	1,471 (7)	C4—C4 ⁱ	1,340 (14)
N2—C2	1,482 (7)		
N2—Pt1—N3	179,55 (18)	C3—N3—N3 ⁱ	118,9 (3)
N2—Pt1—N1	82,77 (17)	C3—N3—Pt1	123,0 (4)
N3—Pt1—N1	97,67 (18)	N3 ⁱ —N3—Pt1	117,82 (13)
N2—Pt1—Cl1	90,68 (13)	N2—C2—C1	107,8 (4)
N3—Pt1—Cl1	88,88 (13)	N1—C1—C2	108,1 (4)
N1—Pt1—Cl1	173,34 (13)	N3—C3—C4	123,0 (6)
C1—N1—Pt1	107,7 (3)	C4 ⁱ —C4—C3	118,0 (4)
C2—N2—Pt1	111,9 (3)		

Симетријске трансформације: (i) $-x+2$, y , $-z+1/2$

Дужине веза Pt-N и Pt-Cl имају очекиване вредности и могу се поредити са дужинама веза у сличним кристалним структурама у којима платина(II) има $[\text{N}_3\text{Cl}]$

координацију. Угао између две равни у којима се налазе Pt(II) јони је $52,0(1)^\circ$, док диедарски угао између квадратно-планарне равни у којој се налази Pt и равни пиридазинског прстена износи $76,5(2)^\circ$. У аналогном пиразинском комплексу ови углови се разликују и износе 0° односно $58,4(1)^\circ$. Атоми платине имају квадратно-планарну координацију у $[\text{PtN}_3\text{Cl}]^+$ јединици и није нађено значајно одступање од правог угла. У пиридазинском мостном лиганду два донорска атома азота налазе се у *орто* положају, због чега је интрамолекулско растојање између два атома платине од $3.2535(4) \text{ \AA}$ краће од двоструког van der Waals-овог радијуса за Pt [$1,72 \times 2 = 3.44 \text{ \AA}$] и много краће у односу на растојање два Pt атома у аналогном $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}^{2+}$ комплексном катјону ($6.7890(3) \text{ \AA}$). Мостна улога pydz лиганда је подржана помоћу пара интрамолекулских водоничних веза које укључују амино групу једне комплексне јединице платине и хлоридо лиганд друге комплексне јединице платине, што доводи до додатне стабилизације димерне структуре и изазива приметну пренатрпаност око платинских центара и хлоридо лиганда (Слика 35).

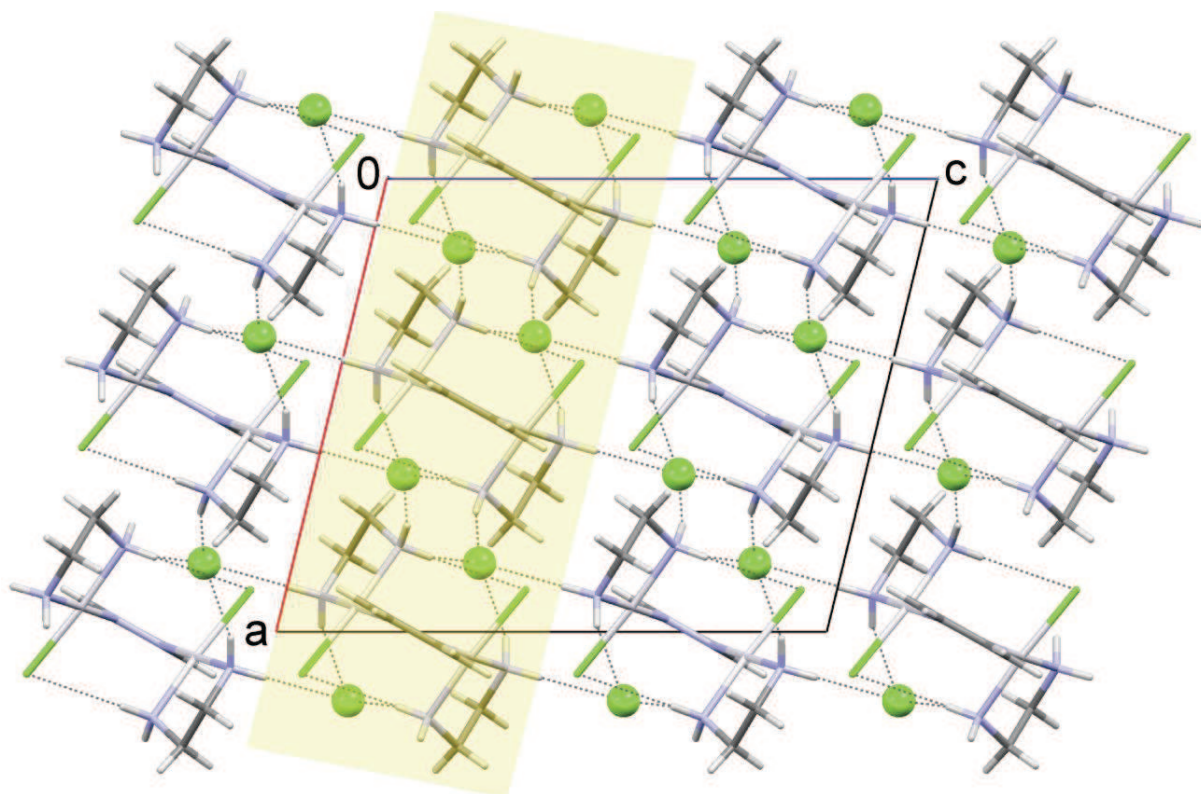


Слика 35. Приказ структуре $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса који презентује подршку коју обезбеђују водонични мостови бидентатној мостној функцији пиридазинског прстена

Међутим, главну структурну карактеристику динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса представљају парови интермолекулских $\text{NH}\cdots\text{Cl}^-\cdots\text{HN}$ водоничних веза, које имају важну улогу у супрамолекулској подршци при мостном повезивању између два Pt(II) метална центра помоћу координованог пиридазинског прстена (Слика 35). Ове водоничне интеракције стабилизују молекулску структуру $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса.

Ово је у супротности са улогом некоординованог хлоридног ањона у сличном $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ комплексу, у којем Cl^- ањони, који се налазе изнад и испод пиразинских прстенова учествују у ањон $\cdots\pi$ интеракцијама са ароматичним прстеновима, на тај начин стабилизујући пре кристалну него молекулску структуру. Структуре комплекса платине(II) које су до сада депоноване у кристалографској бази података у Кембриџу (CSD вер. 5.34 + 2 ажурирања [185]) садрже искључиво монодентатно координовани пиридазински лиганд (POSPIW & POSPOC [188]), док је монодентатна и бидентатна мостна координација уочена у случају комплекса Pt(IV) (PILMUS [189] и ZEWKOB [190] монодентатна; HERCEM [191] бидентатна мостна координација). У том смислу, структура $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса која садржи пар $\text{NH}\cdots\text{Cl}^-\cdots\text{HN}$ интермолекулских водоничних линкера који играју важну улогу у супрамолекулској подршци при мостном повезивању између два Pt(II) метална центра помоћу координованог пиридазинског прстена је јединствена.

Кристално паковање $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекса. У кристалној решетки комплексни катјони су распоређени у (001) слојеве (слика 36). Молекули из суседних слојева су повезани *c*-клизном равни и померени су у односу на оне који леже у суседним слојевима. Хлоридни ањони се такође налазе у овим слојевима. Амински лиганди су доноси у водоничним везама док хлоридни јони имају улогу четвороструких акцептора (Слика 36). У табели 9 дате су дужине и углови водоничних веза У кристалној структури $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ комплекса, координовани хлоридни ањон (Cl1) није укључен у везивању водоника или било којим другим специфичним интермолекулским интеракцијама.



Слика 36. Паковање $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pydz})\}Cl_2$ молекула посматрано дуж b -правца. Осенчена област приказује један (001) молекулски слој

Табела 9. Дужине и углови интрамолекулских и интермолекулских водоничних веза у $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pydz})\}Cl_2$ комплексу

$D-H\cdots A$	$D-H$ (Å)	$H\cdots A$ (Å)	$D\cdots A$ (Å)	$D-H\cdots A$ (°)
<i>интрамолекулске водоничне везе</i>				
$N1-H1B\cdots Cl1^i$	0,90	3,02	3,645 (5)	128
<i>интермолекулске водоничне везе</i>				
$N1-H1A\cdots Cl2$	0,90	2,28	3,154 (5)	166
$N1-H1B\cdots Cl2^{ii}$	0,90	2,67	3,425 (5)	142
$N2-H2A\cdots Cl2^{iii}$	0,90	2,34	3,215 (5)	162
$N2-H2B\cdots Cl2^{iv}$	0,90	2,32	3,191 (5)	162

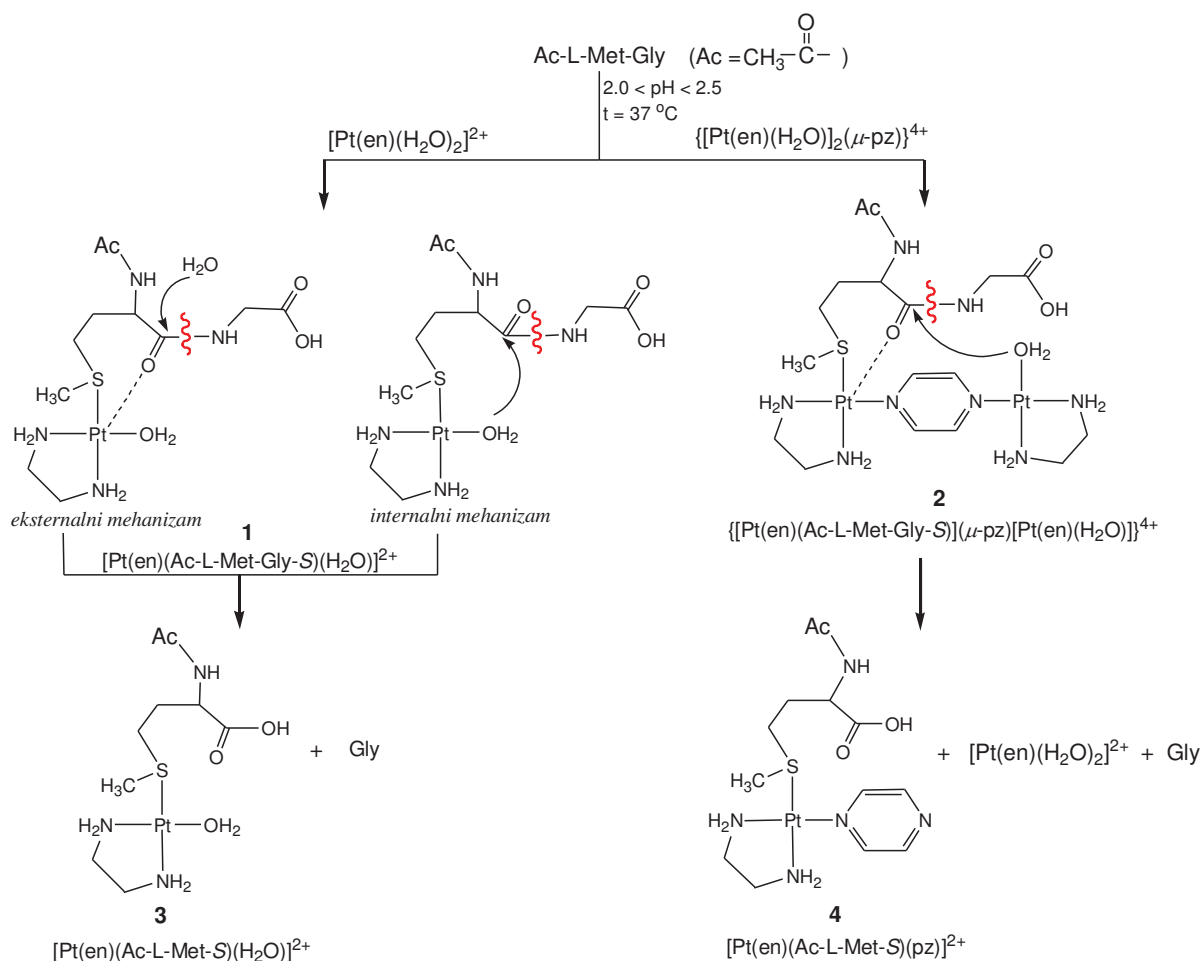
Симетријске трансформације које се односе на акцепторски атом (A): (i) $-x+2, y, -z+1/2$; (ii) $-x+3/2, y+1/2, -z+1/2$; (iii) $x+1/2, y+1/2, z$; (iv) $-x+3/2, -y+1/2, -z$.

Испитивање реакција хидролизе *N*-ацетилованог дипептида **Ac-L-Met-Gly** у присуству $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса

Хидролитичко раскидање Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду у присуству два платина(II) комплекса, моонуклеарног $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ (en је бидентантно координовани етилендиамин, pz је мостни пиразински, или 1,4-дiazин, лиганд), испитивано је применом ^1H NMR спектроскопије. Одговарајући пептид и Pt(II) комплекси су реаговани у 1:1 и 2:1 молском односу. Реакције су изучаване у pH области од 2,0 до 2,5 у D_2O као растварачу на 37 °C. Поред тога, реакција дипептида Ac-L-Met-Gly са $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ испитивана је у вишку Pt(II) комплекса (1:2 молски однос).

Реакције платина(II) комплекса са еквимоларном количином Ac-L-Met-Gly дипептида

У реакцијама $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са еквимоларном количином Ac-L-Met-Gly дипептида, под напред описаним експерименталним условима, у првој фази долази до спонтаног координовања атома сумпора метионинског остатка дипептида за Pt(II) јон, при чему настаје хидролитички активни платина(II)-пептид комплекси, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (**1**) и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]\}^{4+}$ (**2**). Шематски приказ испитиваних реакција хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly у присуству моонуклеарног и динуклеарног комплекса платине(II) дат је на слици 37. Координовање атома сумпора из метионина је веома брз процес и лако се може пратити применом ^1H NMR спектроскопије. Синглет на 2,11 ppm који потиче од *S*-метил протона некоординованог Ac-L-Met-Gly дипептида временом се смањује, док интензитета синглета на 2,54 ppm, који потиче од *S*-метил протонима координованог метионинског остатка за Pt(II) јон временом расте. Хемијска померања одговарајућих протона за платина(II) комплексе, дипептид, интермедијерне платина(II)-пептид комплексе, као и за производе хидролизе дата су у табели 10. Ова хемијска померања су у сагласности са хемијским померањима производа реакције који настају у реакцијама платина(II) комплекса са пептидима који садрже метионин [94,152,192,193].



Слика 37. Шематски приказ реакција хидролизе Ac-L-Met-Gly дипептида у присуству $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса. Дипептид и одговарајући Pt(II) комплекс реаговани су у 1:1 молском односу

У испитиваним реакцијама нађено је да долази до хидролизе пептидне везе која потиче од карбоксилне групе метионина. Хидролиза пептидне везе праћена је применом ^1H NMR спектроскопије. Синглет на 3,99 ppm који потиче од метиленских протона глицина у комплексима **1** и **2** током реакције опада, док интензитет синглета на 3,77 ppm који одговара $-\text{CH}_2-$ протонима слободног глицина временом расте. Додатком глицина у реакциону смешу, у којој се налази платина(II) комплекс и дипептид интензитет синглета на 3,77 ppm се повећава, чиме је потврђено да овај сигнал потиче од метиленских протона слободног глицина. Из односа интеграла синглета на 3,99 ppm који потичу од $-\text{CH}_2-$ глицинских протона у интермедијерним комплексима **1** и **2**

(концентрација комплекса **1** и **2** једнака је почетној концентрацији Ac-L-Met-Gly) и слободног глицина на 3,77 ppm израчунат је проценат хидролизе Met-Gly пептидне везе. Након 24 h у раствору су поред слободног глицина присутни $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (**3**) и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{pz})]^{2+}$ (**4**) комплекси (Слика 37), на основу чега је закључено да бидентатно координовани етилендиамин представља стабилан део молекула и остаје координован за платину(II). Такође, није нађено да долази до промене интензитета сигнала на 2,54 који потиче од $\text{CH}_3\text{-S}$ протона координованог метионина за Pt(II) јон (Табела 10).

Табела 10. ^1H NMR хемијска померања (δ , ppm) за производе који настају у реакцијама $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ са Ac-L-Met-Gly дипептидом у pH области од 2,0 до 2,5 на 37 °C у D_2O као растварачу

Дипептид/Pt(II) комплекс/ Реакциони производ	Карактеристично ^1H NMR померање (δ , ppm)
Ac-L-Met-Gly	2,11 (s, MetCH ₃); 3,99 (s, GlyCH ₂)
$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$	2,64 (s, enCH ₂); 9,03 (s, pzCH)
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	2,64 (s, enCH ₂)
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (1 и 7)	2,54 (s, MetCH ₃); 2,84 (s, enCH ₂)
$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\mu\text{-pz})][\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ (2)	2,54 (s, MetCH ₃); 2,70; 2,84 (2s, enCH ₂); 9,03 (s, pzCH)
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (3)	2,54 (s, MetCH ₃); 2,84 (s, enCH ₂)
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-S})(\text{pz})]^{2+}$ (4)	2,53 (s, MetCH ₃); 2,89 (s, enCH ₂); 8,75–9,00 (m, pzCH)
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})_2]^{2+}$ (5)	2,54 (s, MetCH ₃); 2,89 (s, enCH ₂)
$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ (6)	2,53 (s, MetCH ₃); 2,89 (s, enCH ₂); 9,03 (s, pzCH)
Слободан глицин (Gly)	3,77 (s, GlyCH ₂)
Слободан пиразин (pz)	8,66 (s, pzCH)

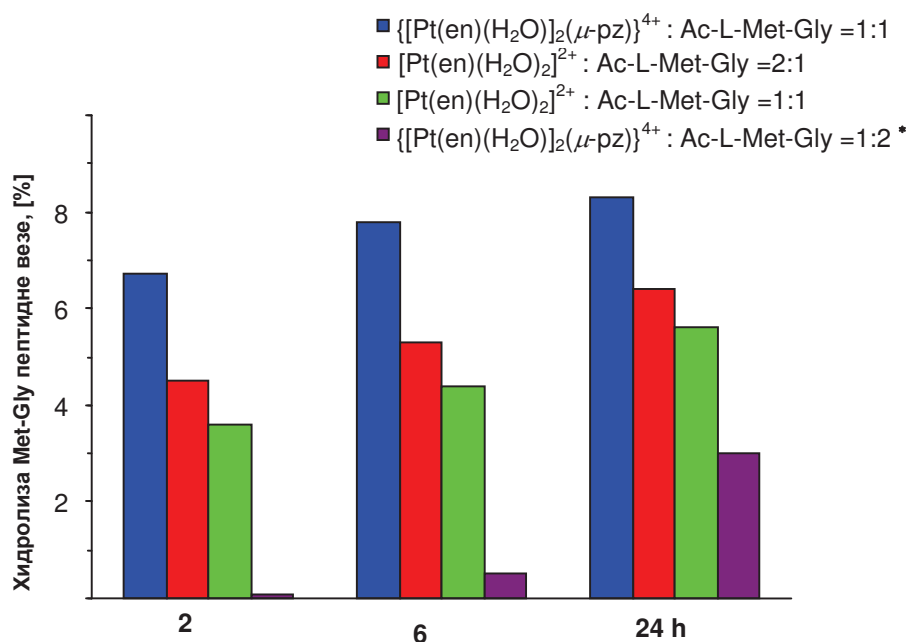
Међутим, хидролитички активни $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\mu\text{-pz})][\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ комплекс (**2**), који настаје у реакцији Ac-L-Met-Gly са $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, је нестабилан и након 24 h долази до раскидања једне Pt(II)-N(pz) везе. Раскидање платина(II)-пиразин везе може се пратити на основу померања сигнала у ароматичној области који потичу од метинских протона пиразина. Синглет на 9,05 ppm који потиче од метинских протона пиразина у динуклеарном комплексу, односно хидролитички

активном комплексу **2**, са временом опада, док интензитет симетричног мултиплета у области од 8,75 - 9,00 ppm (Табела 10), који потиче од монодентатно координованог pz лиганда за Pt(II) јон у $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{pz})]^{2+}$ комплексу **4** расте (Слика 37).

Појава симетричног мултиплета у ^1H NMR спектру указује на раскидање једне Pt(II)-N(pz) везе у комплексу (**2**), при чему четири пиразинска протона постају нееквивалентна и у спектру појављују се два мултиплета због вициналног купловања. Симетрични мултиплет који потиче од монодентатно координованог пиразина нађен је и за *cis*- и *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{pz})_2](\text{NO}_3)_2$ као и за $[\text{Pt}(\text{tmda})(\text{pz})_2](\text{NO}_3)_2$ (tmda је *N,N,N',N'*-tetrametilendiamin) комплексе [159]. Комплекс **4** који настаје након раскидања Pt(II)-N(pz) везе је веома стабилан и у ^1H NMR спектру нема сигнала на 8,66 ppm који одговара слободном пиразину [159] ни након 10 дана реакције. Временска зависност хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly у присуству $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса у различитим молским односима приказана је на слици 38. Нађено је да након два сата реакционог времена у реакцији мононуклеарног $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса и еквимоларне количине дипептида хидролизује 35% Met-Gly пептидне везе. Међутим, у присуству динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса хидролиза је два пута бржа и хидролизује око 70% Met-Gly пептидне везе. Након 24 h у присуству мононуклеарног комплекса хидролизује око 56% пептидне везе, док је у присуству динуклеарног 83% Met-Gly везе је раскинуто. На основу тога закључено је да је динуклеарни $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекс бољи катализатор селективног раскидања Met-Gly пептидне везе у односу на мононуклеарни $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс. Имајући у виду бољу каталитичку способност динуклеарног у односу на мононуклеарни комплекс, испитивали смо реакцију $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са Ac-L-Met-Gly, под напред наведеним експерименталним условима, у 2:1 молском односу. Као што се на слици 38 може видети, нађено је да је хидролиза Met-Gly пептидне везе у овој реакцији бржа у односу на хидролизу у присуству еквимоларне количине мононуклеарног Pt(II) комплекса.

Међутим, хидролиза пептидне везе у присуству два пута веће количине мононуклеарног $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса у односу на пептид је спорија у односу на хидролизу у присуству еквимоларне количине динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса и Ac-L-Met-Gly (види слику 38). Већа каталитичка активност динуклеарног

комплекса у поређењу са мононуклеарним комплексом, може се приписати структурним разликама њихових хидролитички активних платина(II)-пептид комплекса **1** и **2** (Слика 37).



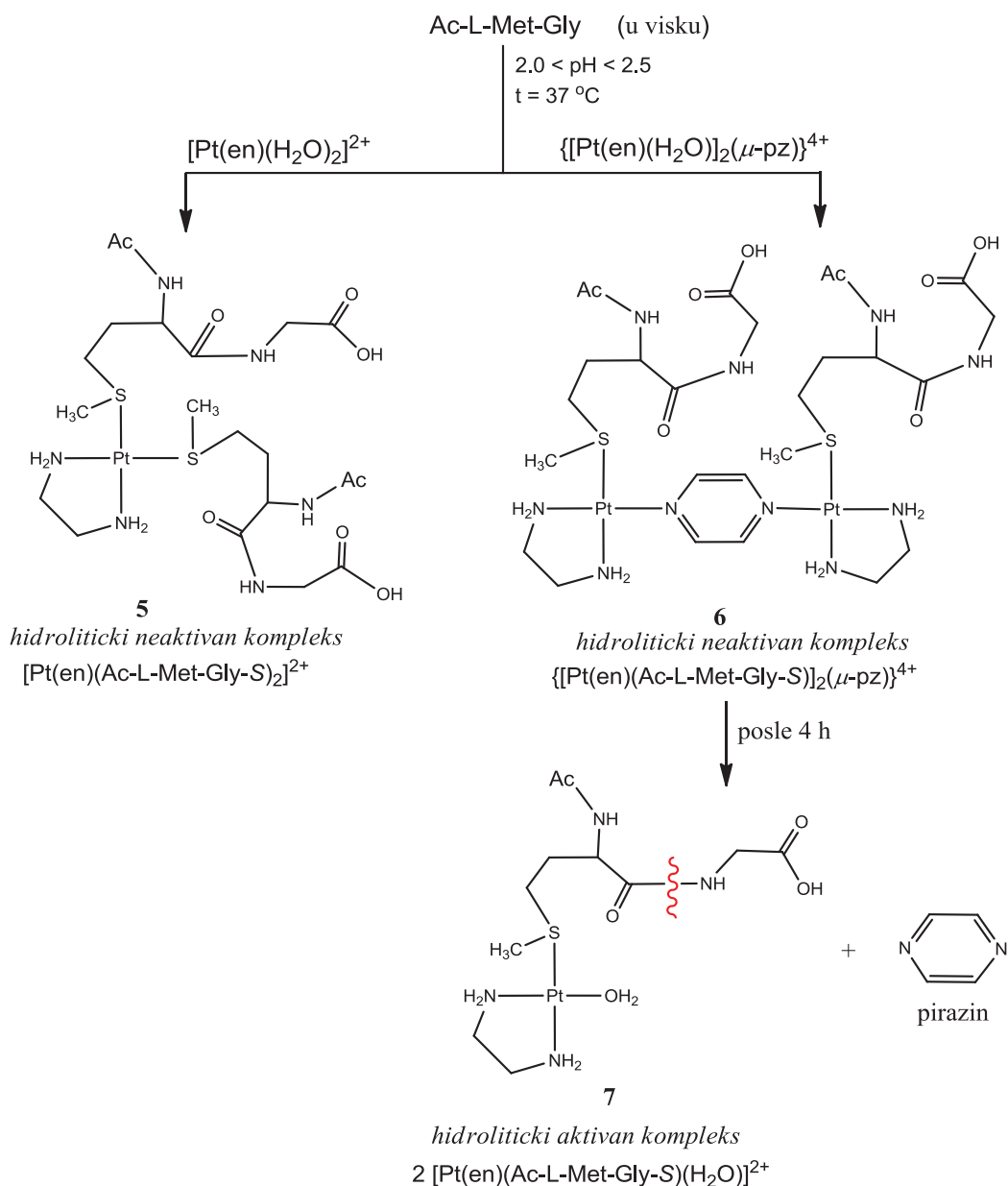
Слика 38. Временска зависност реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду у реакцији са платина(II) комплексима *У реакцији $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са вишком дипептида не долази до хидролизе пептидне везе

Механизам хидролизе Met-Gly пептидне везе у присуству мононуклеарног $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса може се објаснити на два начина (Слика 37) [44-46]. По првом механизму Pt(II) јон интерреагује са атомом кисеоника пептидне везе која хидролизује и поларизује карбонилну групу, при чему карбонилни угљеник постаје парцијално позитиван и погодан за нуклеофилни напад молекула воде из растварача (*екстернални механизам*). Друга могућност је да молекул воде који је координован за Pt(II) јон интерреагује са карбонилним С-атомом суседне пептидне везе која подлеже хидролизи (*интернални механизам*). За хидролизу пептидне везе по овом механизму молекул воде координован за Pt(II) јон у комплексу **1**, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, се мора налазити у близини карбонилног атома угљеника пептидне везе која се раскида.

Међутим, могућа је и комбинација ова два механизма, као што је приказано у комплексу **2**. Ранији резултати су показали да молекула воде у Pd(II) и Pt(II) комплексима има важну улогу у реакцијама региоселективне хидролизе пептидне везе у пептидима који садрже аминокиселине L-хистидин и L-метионин [116,117,120, 121,156, 183,184,194]. У хидролитички активном комплексу **2** ($\{[Pt(en)(Ac-L-Met-Gly-S)](\mu-pz)[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$, Слика 37), Pt(II) јон за који је координован дипептид преко атома сумпора из метионинског остатка поларизује карбонилну групу пептидне везе, при чему карбонилни угљеник постаје парцијално позитиван и погодан за нуклеофилни напад молекула воде. Вода неопходна за хидролизу, у овој реакцији, потиче од другог Pt(II) јона динуклеарног комплекса. Два Pt (II) јона повезана мостним ароматичним лигандом (pz) у комплексу **2** су ефикаснији катализатори у односу на два пута већу количину мононуклеарног $Pt(en)(H_2O)_2^{2+}$ комплекса у односу на пептид. Два платина(II) јона у комплексу **2** истовремено учествују у раскидању пептидне везе, један тако што поларизује карбонилни атом кисеоника, а други даје воду која је неопходна за хидролизу. Међутим, један Pt(II) јон у мононуклеарном $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплексу не може истовремено поларизовати карбонилну групу и дати молекул воде неопходан за хидролизу пептидне везе. Ови резултати су у сагласности са ранијим резултатима за реакције хидролизе пептидне везе у пептидима који садрже метионин у присуству динуклеарних комплекса паладијума(II) који садрже мостне тиолато лиганде [176-178].

Реакције платина(II) комплекса са вишком Ac-L-Met-Gly дипептида

Реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду у присуству $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ и $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ комплекса изучаване су у вишку дипептида. Одговарајући Pt(II) комплекс и дипептид су помешани у 1:2 молском односу, у pH области од 2,0 до 2,5 у D₂O као растварачу на 37 °C. Формирање $[Pt(en)(Ac-LMet-Gly-S)_2]^{2+}$ (**5**) и $\{[Pt(en)(Ac-L-Met-Gly-S)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ (**6**) комплекса (Слика 39) може се пратити применом ¹H NMR спектроскопије. Синглет на 2,11 ppm који потиче од S-метил протона некоординованог Ac-L-Met-Gly дипептида временом се смањује, док интензитета синглета на 2,54 ppm, који потиче од S-метил протона координованог метионинског остатка за Pt(II) јон временом расте (комплекси **5** и **6**, Слика 39 и Табела 10).



Слика 39. Шематски приказ реакција $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексима у вишку Ac-L-Met-Gly дипептида (1:2 молски однос)

Након два сата реакционог времена у ^1H NMR спектру сигнал на 2.11 ppm је потпуно нестао, на основу чега је закључено да је целокупна количина дипептида координована за Pt(II) јон. Такође, нађено је да током реакције не долази до раскидања ниједне пептидне везе у Ac-L-Met-Gly, што указује да су платина(II)-пептид комплекси **5** и **6** хидролитички неактивни. У реакцији $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и Ac-L-Met-Gly, није нађено

да долази до раскидања пептидне везе, чак и када се реакција посматра за време од 4 дана. Поред тога, нема промена у ^1H NMR спектру за испитивану реакцију током овог времена, што потврђује да је комплекс **5** веома стабилан под датим експерименталним условима. Међутим, хидролитички неактиван комплекс **6**, који настаје у реакцији $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса и Ac-L-Met-Gly дипептида је нестабилан под описаним експерименталним условима и након 4 сата реакције нађено је да долази до раскидања једне Pt(II)-N(pz) везе при чему настаје хидролитички активан $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ комплекс (комплекс **7**). Овај комплекс је структурно идентичан са комплексом **1**, који настаје у реакцији мононуклеарног $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса и Ac-L-Met-Gly дипептида (Слика 37). У ^1H NMR спектру може се пратити формирање комплекса **7** на основу смањења интензитета синглета на 9,03 ppm, који потиче од четири еквивалентна протона мостног пиразинског лиганда у комплексу **6** и пораста интензитета синглета на 8,66 ppm, који потиче од слободног пиразина (Табела 10). Ова реакција је спора и након 48 сати у раствору је присутно само око 30% слободног пиразина. Настали комплекс **7** је хидролитички активан и у ^1H NMR спектру јавља се и нови синглет на 3,77 ppm, који потиче од метиленских протона слободног глицина. Из односа интеграла синглета на 3,99 ppm који потичу од $-\text{CH}_2-$ глицинских протона слободног Ac-L-Met-Gly и слободног глицина на 3,77 ppm израчунат је проценат хидролизе Met-Gly пептидне везе.

Нађено је да у реакцији $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса са Ac-L-Met-Gly у 1:2 молском односу, само 30% Met-Gly везе хидролизује за време од 24 сата (Слика 38), док након 48 h хидролизује око 50% ове везе. На основу претходних испитивања може се закључити да су динуклеарни комплекси Pt(II) бољи катализатори хидролизе пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду, у поређењу са мононуклеарним Pt(II) комплексом.

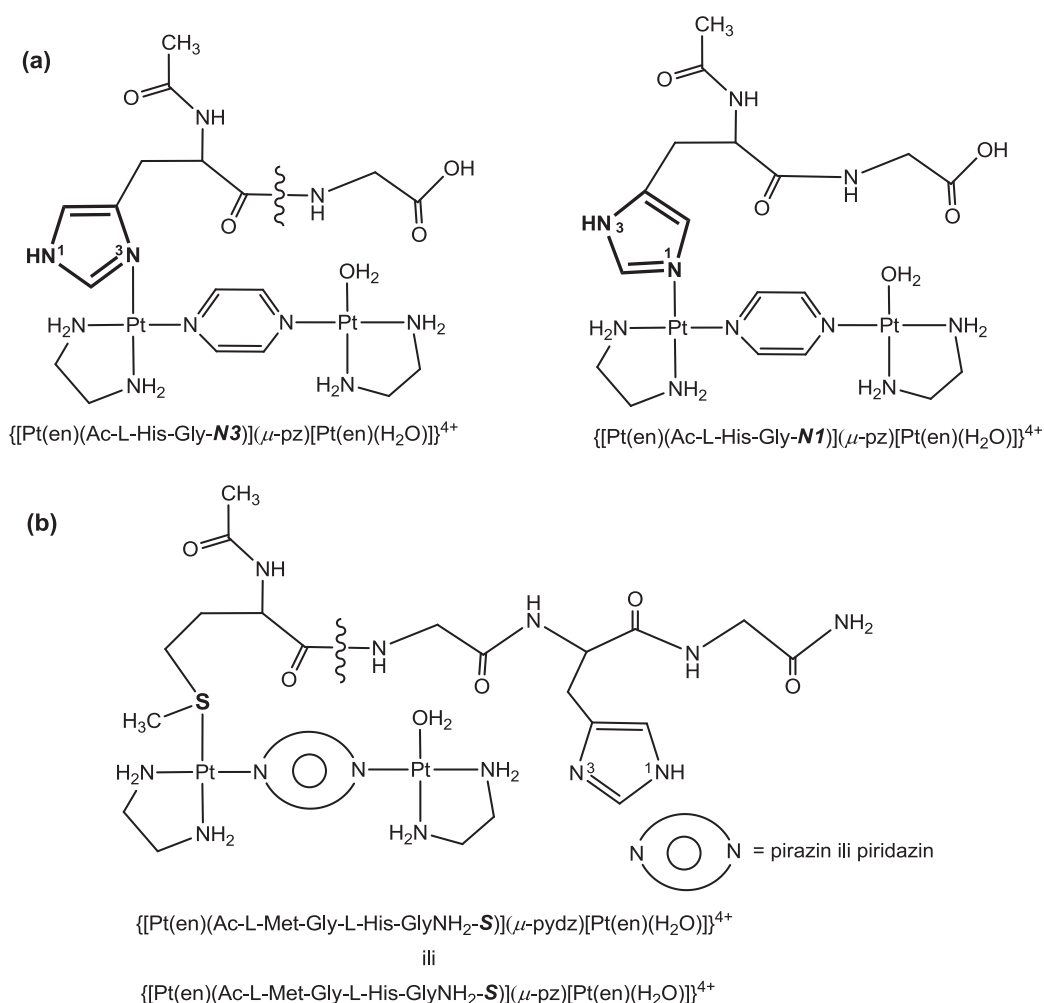
Испитивање реакција хидролизе Ac-L-His-Gly и $\text{Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2$ пептида у присуству $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекса

Динуклеарни $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплекси, слика 31 (en је бидентантно координовани етилендиамин, pz је мостни пиразински и pydz је мостни пиридазински лиганд), чија је структура потврђена на основу резултата рендгенске структурне анализе, преведени су у одговарајуће аква деривате,

$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, односно $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$, по поступку који је описан у експерименталном делу овог рада (поглавље 3.6.). Применом ^1H NMR спектроскопије изучаване су реакције динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекса са Ac-L-His-Gly и Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ (Слика 26). Све реакције су изучаване у pH области од 2,0 до 2,5 на 37 °C у D₂O као растварачу. Као што су претходна истраживања показала, кисела средина у овим реакцијама је неопходна да би се спречило формирање полимерних хидроксо-платина(II) комплекса који су хидролитички неактивни [95,116,117,152, 183,184]. Бидентатно координовани етилендиамин, мостни пиразински и пиридазински лиганди представљају стабилан део молекула и очекује се да остану координовани за Pt(II) током реакције са Ac-L-His-Gly и Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ пептидима.

Реакције динуклеарних платина(II) комплекса са Ac-L-His-Gly дипептидом

Када се еквимоларна количина $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса помеша са Ac-L-His-Gly дипептидом, у pH области од 2,0 до 2,5 на 37 °C, у раствору су након 48 сати формиран $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-His-Gly-N3})(\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]]\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-His-Gly-N1})(\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]]\}^{4+}$ комплекси (Слика 40а и Табела 11). Ови комплекси су окарактерисани на основу разлика у хемијским померањима за C2H и C5H протоне имидазоловог прстена и они представљају изомере у којима је Ac-L-His-Gly дипептид преко N3 или N1 атома имидазоловог прстена монодентатно координован за Pt(II) јон. Хемијска померања за C2H и C5H протоне имидазоловог прстена аминокиселине L-хистидина су у сагласности са хемијским померањима за сличне комплексе који настају у реакцијама Ac-L-His-Gly дипептида са мононуклеарним $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ [95,116,117,152] и $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплексима [157]. На основу овог поређења закључено је да се Ac-L-His-Gly дипептид координује за динуклеарни $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекс на исти начин као и за мононуклеарне $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплексе (Табела 11).



Слика 40. (a) Структурне формуле платина(II) пептид комплекса који настају у реакцији $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ са Ac-L-His-Gly. У реакцији тетрапептида Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ са $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ у 1:2 молском односу формирају се аналогни комплекси. **(b)** Структурна формула хидролитички активног Pt(II)-пептид комплекса који настаје у реакцији $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ и $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pydz)\}^{4+}$ са еквимоларном количином Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептида

Ранија испитивања реакција између пептида који садрже хистидин и мононуклеарних комплекса опште формуле $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ (L је бидентатно координован диамински лиганд) су показала да је хидролитички активан комплекс код кога је пептид преко N3 атома азота имидазола координован за Pd(II) јон, при чему

хидролизује пептидна веза која садржи карбоксилну групу хистидина [95,116,117,120,152,156,192,195].

Табела 11. ^1H NMR хемијска померања (δ , ppm) за Pt(II) пептид комплексе који настају у реакцијама $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ са Ac-L-His-Gly и Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ пептидима

Пептид/Pt(II)-пептид комплекс (pH = 7.0)	Хемијска померања (δ , ppm)	
	C2H	C5H
Ac-L-His-Gly	8,61	7,33
$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-His-Gly-N3})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$	8,09	7,10
$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-His-Gly-N1})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$	7,96	6,95
$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})(\text{Ac-L-His-Gly-N3})]^{2+}$	8,03	7,11
$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})(\text{Ac-L-His-Gly-N1})]^{2+}$	7,87	6,89
$[\text{Pt}(\text{dien})(\text{Ac-L-His-Gly-N3})]^{2+,a}$	8,00	7,12
$[\text{Pt}(\text{dien})(\text{Ac-L-His-Gly-N1})]^{2+,a}$	7,88	6,85
Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH ₂	8,63	7,31
$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-N3})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$	8,07	7,09
$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-N1})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$	7,92	6,92
$\{[\text{Pt}(\text{dien})(\mu\text{-Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-N3})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$	8,14	7,10
$\{[\text{Pt}(\text{dien})(\mu\text{-Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-N1})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$	7,88	6,89

Овај начин координовања омогућава близак контакт аква лиганда са Pd(II) јона и пептидне везе која хидролизује. Бидентатно координовани етилендиамин и мостни пиазински лиганд остају координовани за Pt(II) јон у реакцији $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ са Ac-L-His-Gly. У испитиваној реакцији нађено је да долази до хидролизе пептидне везе која садржи карбоксилну групу хистидина. Хидролиза пептидне везе праћена је применом ^1H NMR спектроскопије. Синглет на 3,89 ppm који потиче од метилених протона глицина у Ac-L-His-Gly дипептиду током времена опада, док интензитет синглета на 3,77 ppm који одговара -CH₂- протонима слободног глицина временом расте. Додатком глицина у реакциону смешу у којој се налази платина(II) комплекс и

дипептид интензитет синглета на 3,77 ppm се повећава, чиме је потврђено да овај сигнал потиче од метиленских протона слободног глицина. Из односа интеграла за $-\text{CH}_2-$ протоне слободног глицина и интеграла сигнала који одговара почетној концентрацији Ас-L-His-Gly израчунат је проценат хидролизе His-Gly пептидне везе. Након 48 сати нађено је да око 50% His-Gly пептидне везе хидролизује. Међутим, на основу ^1H NMR спектроскопије закључено је да у реакцији $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pydz})]^{4+}$ са Ас-L-His-Gly, под напред описаним експерименталним условима, не долази до координовања дипептида за платина(II) јон, ни за време од 48 сати. Као последица одсуства координације атома азота имидазоловог прстена дипептида за Pt(II) јон, не долази до хидролизе пептидне везе.

Разлика у реактивности ова два динуклеарна комплекса платине(II), $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pydz})]^{4+}$, са имидазоловим прстеном из Ас-L-His-Gly може се, без сумње, приписати присуству различитих мостних лиганда у овим комплексима. Одсуство координовања Ас-L-His-Gly за Pt(II) јон у $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pydz})]^{4+}$ комплексу је последица стерних сметњи.

Реакције динуклеарних платина(II) комплекса са Ас-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептидом

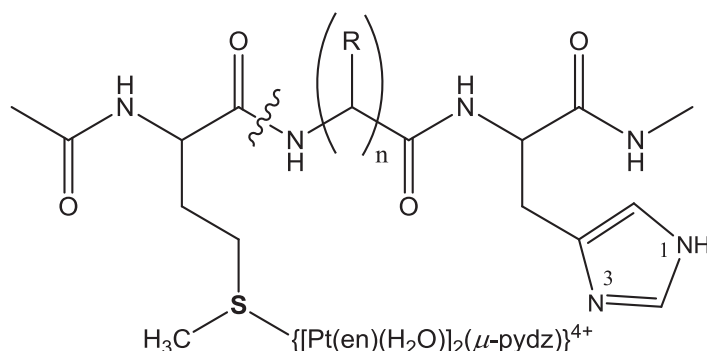
У реакцијама $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pydz})]^{4+}$ комплекса са еквимоларном количином Ас-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептида, у pH области од 2,0 до 2,5 на 37 °C, долази до спонтаног координовања атома сумпора метионинског остатка тетрапептида за Pt(II) јон. Координовање Ас-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ преко атома сумпора из L-метионина је веома брз процес и лако се може пратити применом ^1H NMR спектроскопије. Синглет на 2,11 ppm који потиче од S-метил протона некоординованог Ас-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептида временом се смањује, док интензитета синглета на 2,50 ppm, који потиче од S-метил протона координованог метионинског остатка за Pt(II) јон временом расте. Координовање атома сумпора из L-метионина за динуклеарни $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ комплекс комплетно је завршено за 10 минута, а у случају $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pydz})]^{4+}$ комплекса за 30 минута. Ова хемијска померања су у сагласности са хемијским померањима производа реакције који настају у реакцијама платина(II) комплекса са пептидима који садрже L-метионин

[94,152,192,193]. Када се динуклеарни Pt(II) комплекс и тетрапептид помешају у 1:1 молском односу, резултати ^1H NMR спектроскопије су показали да не долази до координовања атома азота имидазоловог прстена L-хистидина за Pt(II) јон. Монодентатна координација Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ за $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплексе доводи до формирања два хидролитички активна, платина(II)-пептид комплекса, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-S})](\mu\text{-pydz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ (Слика 40b), који катализују региоселективну хидролизу Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептиду. Хидролиза пептидне везе праћена је применом ^1H NMR спектроскопије. Интензитет сигнала на 3,94 ppm који потиче од метиленских протона глицина (глицин у суседству L-метионина) у Pt(II)-тетрапептид комплексима ($\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-S})](\mu\text{-pydz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$, слика 40b се смањује током времена, док се интензитет сигнала на 3,85 ppm који потиче од метиленских протона N-терминалног глицина у Gly-L-His-GlyNH₂ временом повећава. Додатком Gly-L-His-GlyNH₂ трипептида у реакциону смешу долази до повећања интензитета сигнала на 3,85 ppm, што потврђује да овај сигнал потиче од метиленских протона N-терминалног глицина у Gly-L-His-GlyNH₂ трипептиду. Из односа интеграла сигнала на 3,94 ppm, који потичу од -CH₂- глицинских протона у интермедијерним каталитички активним Pt(II)-тетрапептид комплексима и интеграла сигнала на 3,85 ppm, израчунат је проценат хидролизе Met-Gly пептидне везе. Нађено је да након 48 сати на 37 °C, хидролизује 80% Met-Gly пептидне везе у присуству $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и само 50% у присуству $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекса.

Реакције Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептида са $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ изучаване су у вишку Pt(II) комплекса. Динуклеарни Pt(II) комплекси и тетрапептид су помешани у 2:1 моларном односу, у pH области од 2,0 до 2,5 у D₂O као растварачу на 37 °C. У реакцији $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ са Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂, поред $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ комплекса, два нова Pt(II) тетрапептид комплекса се формирају у раствору. Ови комплекси су изомери у којима је тетрапептид преко атома азота (N1 односно N3) L-хистидина координован за Pt(II) јон. Структуре ових комплекса су идентичне са

структурама комплекса који настају у реакцији $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса са дипептидом Ас-L-His-Gly (Слика 40а и Табела 11). У реакцији $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ са Ас-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ у вишку Pt(II) комплекса нађено је да долази до хидролизе две пептидне везе. Поред хидролизе Met-Gly пептидне везе (хидролитички активан комплекс $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-S})(\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]]^{4+}$) хидролизује и His-GlyNH₂ пептидну везу у чију структуру улази карбоксилна група L-хистидина. Хидролиза His-GlyNH₂ пептидне везе последица је координовања тетрапептида преко N3 за други молекул динуклеарног комплекса. Хидролиза пептидне везе праћена је применом ¹H NMR спектроскопије. Интензитет сигнала на 3,94 ppm који потиче од метиленских протона N-терминалног глицинамида у Ас-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ се смањује током времена, док се интензитет сигнала на 3,70 ppm који потиче од метиленских протона слободног GlyNH₂ временом повећава. Додатком GlyNH₂ у реакциону смешу долази до повећања интензитета сигнала на 3,70 ppm, што потврђује да овај сигнал потиче од метиленских протона слободног GlyNH₂. Из односа интеграла сигнала на 3,94 ppm и интеграла сигнала на 3,70 ppm, израчунат је проценат хидролизе His-GlyNH₂ пептидне везе. Нађено је да након 48 сати у вишку $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса хидролизује око 80% Met-Gly и 28% His-GlyNH₂ пептидне везе. Међутим у реакцији Ас-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептида са $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплексом у 1:2 молском односу, хидролизује само Met-Gly пептидна веза. У овој реакцији не долази до хидролизе His-GlyNH₂ пептидне везе, јер атом азота имидазоловог прстена (N1 односно N3) због стерних сметњи не може да се координује за Pt(II) јон у $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплексу. На основу претходних резултата можемо закључити да каталитичка способност два динуклеарна Pt(II) комплекса, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$, у хидролизи пептидне везе пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин, зависи од природе мостног диазинског лиганда. Динуклеарни Pt(II) комплекс који као мостни лиганд садржи пиразин је много бољи катализатор хидролизе пептидне везе у испитиваним пептидима у односу на комплекс у коме је пиридазин мостни лиганд. Док $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекс реагује само са атомом сумпора из метионинског остатка и катализује хидролизу Met-Gly пептидне везе, аналогни пиразински Pt(II) динуклеарни комплекс, реагује са хетероатомима из бочног низа метионина и хистидина и катализује хидролизу

Met-Gly и His-GlyNH₂ пептидних веза. Разлика у каталитичкој способности ова два динуклеарна Pt(II) комплекса, може се објаснити положајем Pt(II) јона у пиразинском и пиридазинском комплексу. У $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплексу два Pt(II) јона су на веома малом растојању од 3,2535(4) Å, јер су у мостном пиридазинском лиганду атоми азота су у *orto*-положају, за разлику од растојања Pt(II) јона у $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ од 6,7890(3) Å, у коме су Pt(II) јони повезаним мостним пиразинским лигандом у коме су атоми азота у *para*-положају. Додатно у $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ комплексу постоје интрамолекулске водоничне везе између амино групе координоване за једну Pt(II) јединицу и хлоридо анјона са другог Pt(II) јона. У одговарајућем аква аналогу, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$, хлоридни анјон је супституисан са молекулом воде, при чему водоничне везе постају јаче, а самим тим и растојање метал-лиганд постаје краће. На основу овога можемо закључити да региоселективна хидролиза пептидне везе у коју улази карбоксилна група аминокиселине L-метионина у полипептидима који садрже обе аминокиселине, метионин и хистидин, се може постићи употребом динуклеарног Pt(II) комплекса који као мостни лиганд садржи пиридазин (Слика 41).



Слика 41. Шематски приказ региоселективне хидролизе пептидне везе у коју улази карбоксилна група метионина у полипептиду који садржи метионински и хистидински бочни ланац у присуству динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекса

Испитивање реакција хидролизе пептидне везе у *Ac-L-Met-Gly* помоћу различитих $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$ комплекса

У овом делу рада синтетизовани су динуклеарни платина(II) комплекси типа $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$ (L је (\pm)-1,2-пропилендиамин, 1,2-pn; изобутилендиамин, ibn; *trans*-(\pm)-1,2-диаминоциклохексан, dach; pz је мостни лиганд пиразин или 1,4-дiazин; види Сliku 31). Добијени комплекси су окарактерисани помоћу резултата микроанализе на C, H и N параметре и NMR (1H и ^{13}C) спектроскопије.

У Табели 12 приказани су NMR подаци за $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$ комплексе. Ови спектроскопски подаци су у сагласности са одговарајућим резултатима за сличне комплексе који су раније описани у литератури [57,120,128]. Као што је показано на слици 31 сви испитивани Pt(II) комплекси имају исти мостни пиразински лиганд, али се разликују у бидентатно координованом диаминском лиганду L. У овом раду применом 1H NMR спектроскопије испитиван је утицај бидентатно координованог диаминског лиганда L на хидролизу пептидне везе у *N*-ацетилованом L-метионил-глицину (*Ac-L-Met-Gly*, Слика 26). Терминална аминокска група у овом дипептиду је ацетилована да би се спречило бидентатно координовање дипептида за Pt(II) јон и на тај начин онемогућила хидролиза пептидне везе.

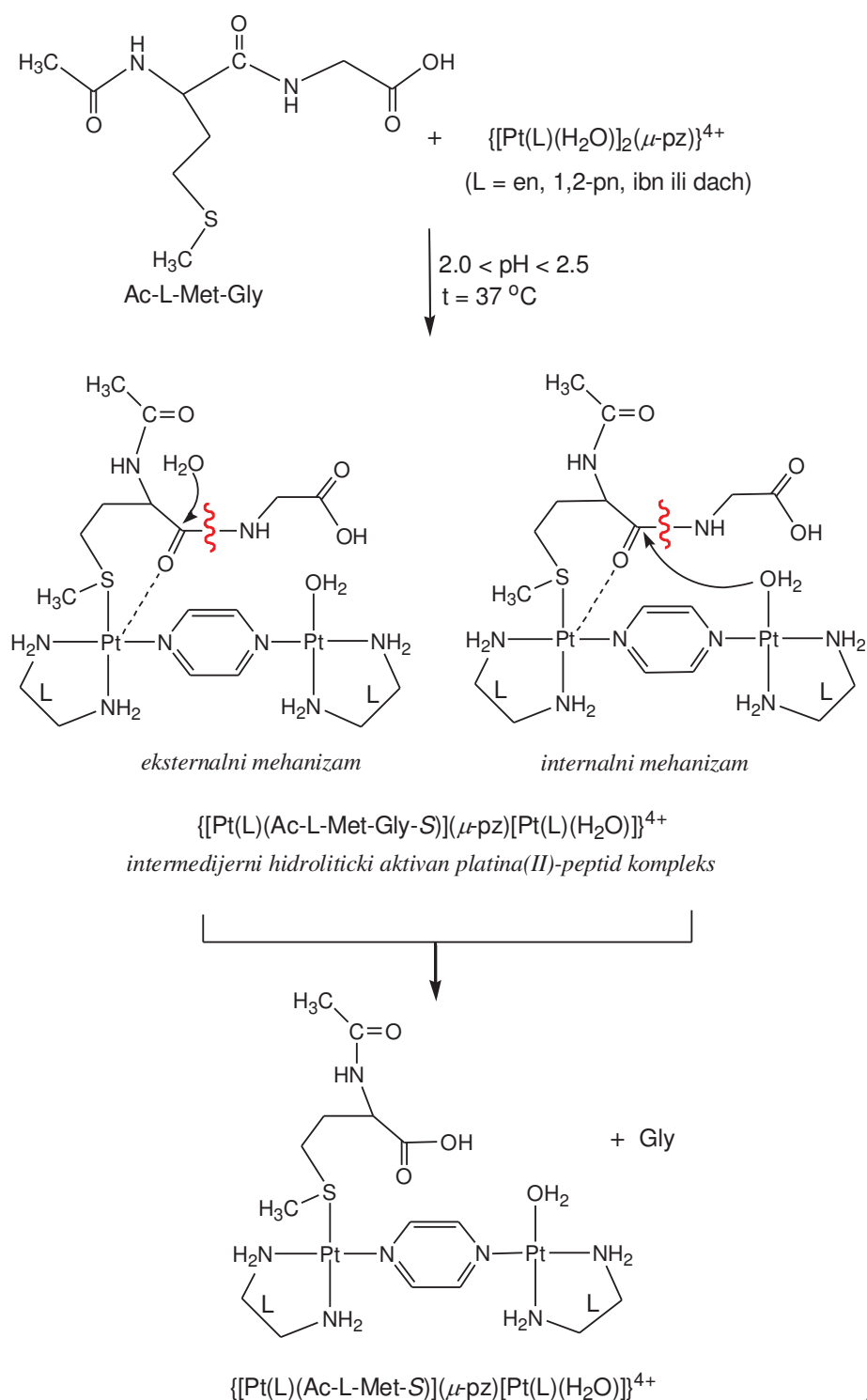
У циљу испитивања утицаја стерног ефекта бидентатно координованог диаминског лиганда L на брзину хидролизе пептидне везе у *Ac-L-Met-Gly* дипептиду, синтетизовани $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$ комплекси су преведени у одговарајуће аква комплексе, $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$. Реакције између Pt(II)-аква комплекса и *Ac-L-Met-Gly* су изучаване на 37 °C у pH области од 2,0 до 2,5, у D₂O као растварачу. Реакције између комплекса Pt (II) и *Ac-L-Met-Gly* извођене су директно у NMR кивети у 1:1, односно 1:2 молском односу. Као што су претходна истраживања показала, кисела средина у овим реакцијама је неопходна да би се спречило формирање олигомерних хидроксо-платина(II) комплекса, који су хидролитички неактивни [116,183,184]. Хелатни диамински лиганди L у $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексима представљају стабилни део молекула и остају координовани за Pt(II) јон у току реакција са дипептидом *Ac-L-Met-Gly*.

Табела 12. Карактеристична NMR (^1H и ^{13}C) хемијска померања за $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ комплексе. Наведена хемијска померања су у сагласности са претходно објављеним за сличне платина(II) комплексе [57,120,128]

Платина(II) комплекс	Карактеристична ^1H NMR померања (δ , ppm)		Карактеристична ^{13}C NMR померања (δ , ppm)	
$\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$	2,64 (s, enCH ₂)	9,03 (s, pzCH)	52,34 (enCH ₂)	153,46 (pz)
$\{[\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$	1,34 (d, 1,2-pnCH ₃), 2,45-2,98 (m, 1,2-pnCH ₂), 3,11-3,32 (m, 1,2-pnCH),	9,01 (s, pzCH)	17,83 (1,2-pnCH ₃), 54,52 (1,2-pnCH ₂), 59,86 (1,2-pnCH),	153,44 (pz)
$\{[\text{Pt}(\text{ibn})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$	1,42-1,48 (m, ibnCH ₃), 2,66 (s, ibnCH ₂),	9,13 (s, pzCH)	25,96 (ibnCH ₃), 60,09 (ibnCH ₂), 63,61 (ibnCH),	153,36 (pz)
$\{[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$	1,27-1,62 (m, dachCH ₂ , C4,C5), 1,76-2,08 (m, dachCH ₂ , C3,C6), 2,45-2,61 (m, dachCH,C1,C2),	9,00 (s, pzCH)	26,55 (dach, C4,C5), 34,56 (dach, C3,C6), 65,15 и 65,30 (dach, C1,C2)	153,31 (pz)

Реакције $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса са еквимоларном количином *Ac-L-Met-Gly* дипептида

У претходном делу овог рада на основу испитивања реакција динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса са пептидима, који у својој структури садрже L-метионин, закључили смо да су динуклеарни Pt(II) комплекси веома ефикасни каталитички реагенси за хидролизу пептидне везе у чију структуру улази карбоксилна група L-метионина. У овом делу дисертације, извршено је поређење брзине хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду у присуству различитих $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса који се разликују у бидентатно координаном диаминском лиганду L.



Слика 42. Шематски приказ реакције хидролизе Ac-L-Met-Gly дипептида у присуству еквимоларне количине динуклеарних $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса

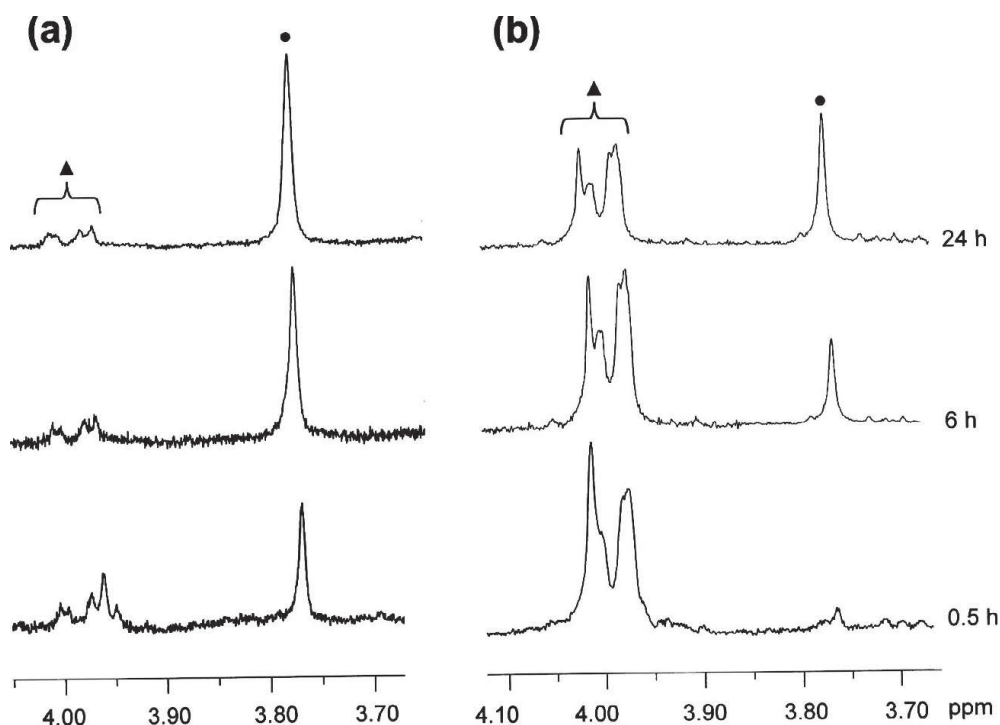
Реакције $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ са Ас-L-Met-Gly дипептидом испитиване су у pH области од 2,0 до 2,5 на 37 °C. Шематски приказ испитиваних реакција хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ас-L-Met-Gly у присуству $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса дат је на слици 42. Као што се из ове слике може видети, одмах након мешања Pt(II) комплекса са еквимоларном количином Ас-L-Met-Gly дипептида долази до спонтаног координовања атома сумпора из L-метионина за Pt(II) јон, при чему настају хидролитички активни платина(II)-пептид комплекси опште формуле $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$.

У свим испитиваним реакцијама хидролитички активни интермедијерни $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ комплекс катализује хидролизу пептидне везе у коју улази карбоксилна група L-метионина. Хидролиза пептидне везе праћена је применом ^1H NMR спектроскопије. Интензитет синглета на 3,99 ppm, који потиче од метилених протона глицина у дипептиду координованог за Pt(II) у $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ комплексу, опада у току реакције, док интензитет синглета на 3,77 ppm који одговара $-\text{CH}_2-$ протонима слободног глицина временом расте, видети слику 43.

Додатком глицина у реакциону смешу у NMR кивети у којој се налази платина(II) комплекс и дипептид интензитет синглета на 3,77 ppm се повећава, чиме је потврђено да овај сигнал потиче од метилених протона слободног глицина. Из односа интеграла синглета за $-\text{CH}_2-$ глицинске протоне слободног глицина и ових протона из дипептида који је координован за Pt(II) у интермедијерном $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ комплексу израчунат је проценат хидролизе Met-Gly пептидне везе.

Реакције хидролизе праћене су 24 сата, при чему је нађено да је у раствору, поред слободног глицина, присутан и $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ комплекс, на основу чега је закључено да бидентатно координовани диамински лиганд L представља стабилан део молекула и овај лиганд остаје координован за платину(II) у току времена. Такође, у ^1H NMR спектру нема промена у ароматичној области сигнала који потичу од метинских протона пиразина у динуклеарним комплексима (види Табелу 12). У току овог реакционог периода концентрација $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ комплекса и слободног глицина увек је једнака почетној концентрацији Ас-L-Met-Gly дипептида. Временска зависност реакција хидролизе Met-

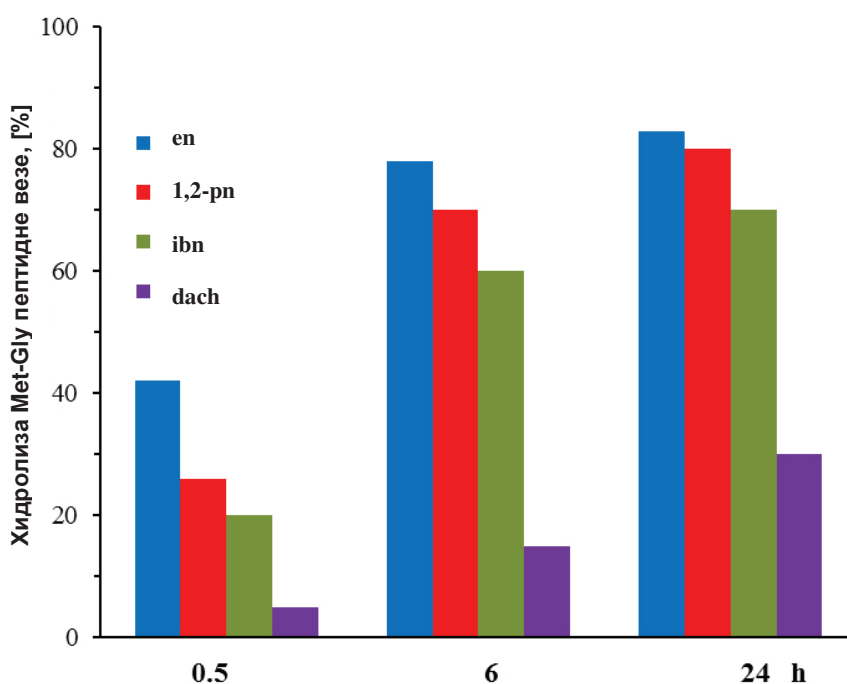
Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду у присуству различитих динуклеарних комплекса платине(II), опште формуле, $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, приказана је на слици 44. На основу података који су приказани на слици 44 може се закључити да се количина хидролизованог Ac-L-Met-Gly дипептида смањује са повећањем стерног ефекта платина(II) комплекса.



Слика 43. Временска зависност промене интензитета сигнала у ^1H NMR спектру у реакцији $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ (a) и $\{[Pt(dach)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ (b) комплекса са еквимоларном количином Ac-L-Met-Gly дипептида. Реакције су испитиване у pH области 2,0 – 2,5 на 37 °C у D_2O као растварачу. Сигнали обележени као (▲) одговарају метиленским протонима глицина у Ac-L-Met-Gly дипептиду монодентатно координаном за динуклеарни платина(II) комплекс, док сигнали обележени као (●) одговарају метиленским протонима слободног глицина

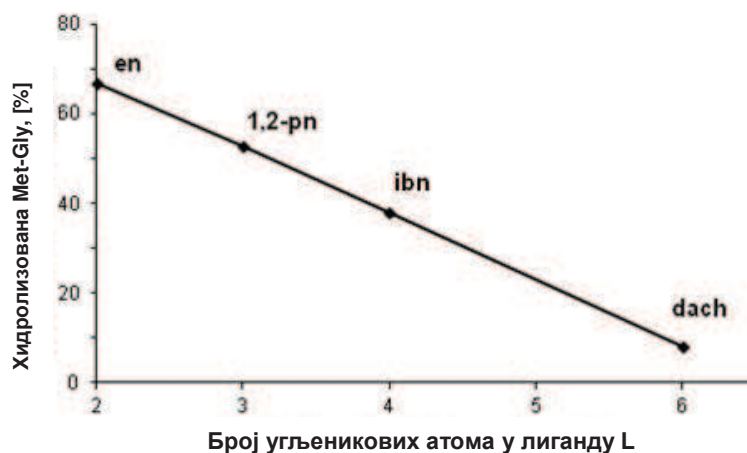
Јасно се види да променом бидентатно координаног диаминског лиганда у Pt(II) комплексу брзина хидролизе опада следећим редом: $en > 1,2\text{-pn} > ibn > dach$. Такође, из слике 44 може се закључити да је након 30 минута, реакција хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly у присуству $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса скоро

два пута бржа у односу на реакцију овог дипептида са $\{[\text{Pt}(\text{ibn})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексом, или 1,5 пута бржа у односу на $\{[\text{Pt}(1,2\text{-pn})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекс. Међутим, током истог времена количина хидролизованог дипептида у присуству $\{[\text{Pt}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса је осам пута мања у односу на $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекс. Нађено је да након 24 h у присуству $\{[\text{Pt}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса хидролизује само 30% Met-Gly пептидне везе, док у присуству $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса хидролизује преко 80% Met-Gly пептидне везе у Ас-L-Met-Gly дипептиду. Брзина хидролизе пептидне везе у Ас-L-Met-Gly дипептиду зависи од каталитичке способности испитиваних динуклеарних комплекса $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и може се приписати стерном ефекту бидентатно координованих диаминских лиганата L.



Слика 44. Временска зависност реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ас-L-Met-Gly дипептиду у реакцијама са различитим $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексима

Четири диаминска лиганда L (en, 1,2-pn, ibn и dach) координовањем за Pt(II) јон у $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексима формирају петочлане хелатне прстенове, а разликују се по броју угљеникових атома у својој структури (види Сliku 44). Нађено је да брзина хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду линеарно опада са повећањем броја атома угљеника у L лиганду (Слика 45). Ранији резултати испитивања реакција хидролизе пептидне везе у пептидима који садрже аминокиселину L-хистидин у присуству различитих мононуклеарних комплекса паладијума(II) показала су да се структурним модификацијама катализатора може смањити брзина хидролизе пептидне везе [120]. Према томе, поредећи наше резултате за хидролизу пептидне везе пептида који садрже L-метионин у присуству различитих динуклеарних комплекса $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ са раније добијеним резултатима хидролизе пептидне везе у пептидима који садрже L-хистидин у присуству различитих мононуклеарних комплекса $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (L је бидентатно координовани диамински лиганд) [120], можемо закључити да се инхибиција хидролитичких реакција може приписати стерном ефекту катализатора.



Слика 45. Зависност количине хидролизованог Ac-L-Met-Gly дипептида од броја атома угљеника у лиганду L у $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексу. Количина хидролизованог дипептида је одређена 2 сата након почетка реакције

Утицај стерног ефекта бидентатно координованог диаминског лиганда L на брзину хидролизе Met-Gly пептидне везе се може објаснити помоћу два механизма хидролитичког раскидања пептидне везе катализоване комплексима Pd(II) и Pt(II)

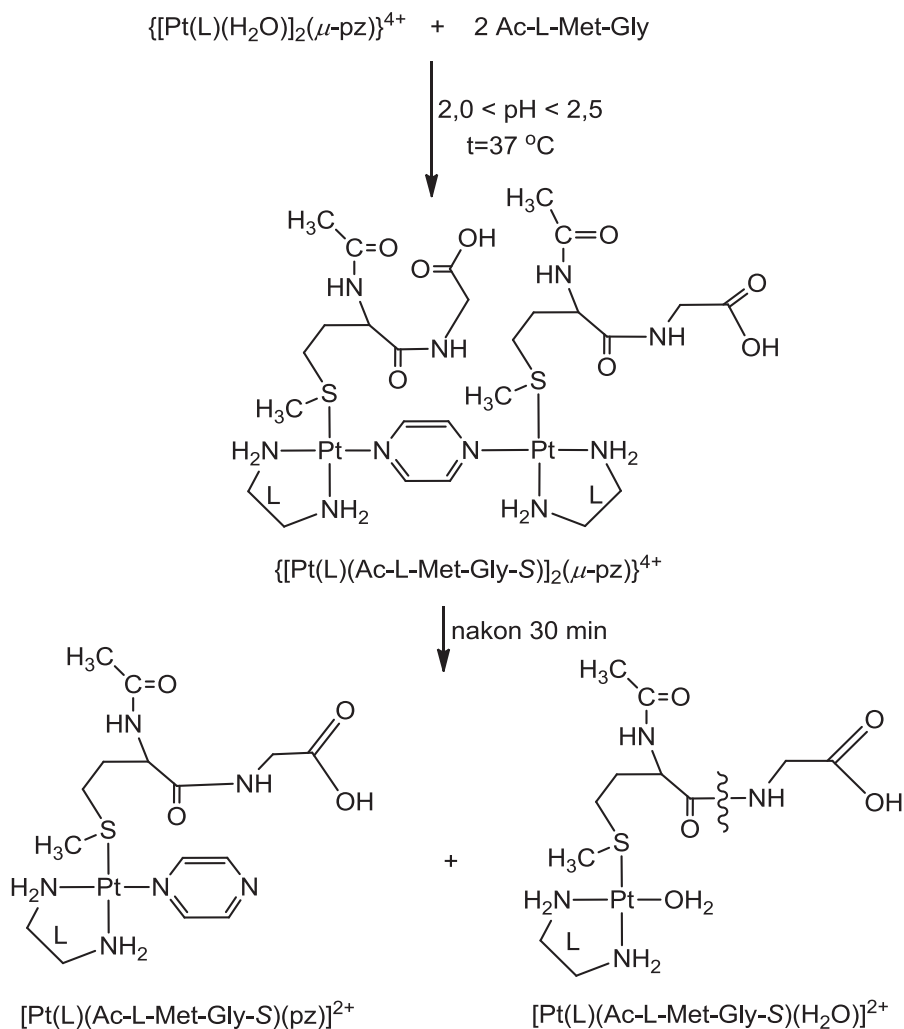
[116,117,194], видети слику 42. По првом механизму платина(II) јон у комплексу $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ (Слика 42) интерреагује са атомом кисеоника пептидне везе која хидролизује и поларизује карбонилну групу, при чему карбонилни угљеник постаје парцијално позитиван и погодан за нуклеофилни напад молекула воде из растварача (*екстернални механизам*). Друга могућност је да платина(II) јон за који је координован дипептид преко атома сумпора из метионинског остатака, поларизује карбонилну групу пептидне везе, при чему карбонилни угљеник постаје парцијално позитиван и погодан за нуклеофилни напад молекула воде. Вода неопходна за хидролизу, у овој реакцији, потиче са другог Pt(II) јона динуклеарног комплекса (*интернални механизам*). Према томе, да би дошло до раскидање пептидне везе по екстерналном или интерналном механизму, мора доћи до интеракције Pt(II) јона са пептидном везом. Интеракција, а самим тим и хидролиза пептидне везе, је спорија што је стерни ефекат бидентатно координованог диаминског лиганда L у $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексима већи.

Реакције $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса у присуству вишка Ac-L-Met-Gly дипептида

Реакције $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса са Ac-L-Met-Gly дипептидом испитиване су у молском односу 1:2 у pH области од 2,0 до 2,5 на 37 °C. Све реакције су праћене применом ^1H NMR спектроскопије. Шематски приказ испитиваних реакција дат је на слици 46.

Платина(II)-пептид комплекс, $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, који настаје у реакцији Ac-L-Met-Gly са $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ је нестабилан и након 30 минута реакционог времена, долази до раскидања једне Pt(II)-N(pz) везе. Раскидање Pt(II)-N(pz) везе може се пратити на основу померања сигнала у ароматичној области који потичу од метинских протона пиразина. Интензитет синглета у области 9,00 – 9,13 ppm који потиче од мостног пиразинског лиганда у $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексу (хемијска померања овог синглета зависе од врсте Pt(II) комплекса) са временом опада, док интензитет симетричног мултиплета у области од 8,75 - 9,00 ppm, који потиче од монодентатно координованог pz лиганда за Pt(II) јон у $[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{pz})]^{2+}$ комплексу (Слика 46) временом расте. Појава симетричног мултиплета у области од 8,75 до 9,00 ppm указује на раскидање једне Pt(II)-N(pz) везе у $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексу.

$S)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексу, при чему четири пиразинска протона постају нееквивалентна и у ^1H NMR спектру појављује се симетрични мултиплета због вициналног купловања.



Слика 46. Шематски приказ реакције динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса са Ac-L-Met-Gly дипептидом у 1:2 молском односу. Све реакције су издођене у pH области од 2,0 до 2,5 на 37 °C

Симетрични мултиплет који потиче од монодентатно координованог пиразина нађен је и код сличних комплекса *cis*- и *trans*-[Pt(NH₃)₂(pz)₂](NO₃)₂ као и за [Pt(tmda)(pz)₂](NO₃)₂ (tmda је *N,N,N',N'*-тетраметилендиамин) комплексе [159]. Раскидање једне Pt(II)-N(pz) везе комплетно је завршено за време од 4 h и коначни производи ове реакције су мононуклеарни Pt(II) комплекси са монодентатно координованим pz лигандом. Мононуклеарни комплекс [Pt(L)(Ac-L-Met-Gly-S)(pz)]²⁺

комплекс је стабилан и у ^1H NMR спектру не појављује се сигнал на 8,66 ppm који одговара слободном пиразину ни након два дана. Међутим, уочена је веома спора хидролиза Met-Gly пептидне везе у Ac-L-Met-Gly дипептиду. Хидролиза пептидне везе у овим реакцијама катализована је мононуклеарним $[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{pz})]^{2+}$ комплексом. Према томе, у реакцијама $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ са Ac-L-Met-Gly у 1:2 молском односу брзину хидролизе Met-Gly пептидне везе не можемо повезати са природом хелатног диаминског лиганда L у динуклеарном $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплексу. На основу добијених резултата може се закључити, да се модификацијом динуклеарног $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса, односно увођењем стерно великог диаминског лиганда L, може постићи инхибиција хидролитичког раскидања пептидне везе у која улази карбоксилна група L-метионина из Ac-L-Met-Gly дипептида. Добијени резултати су од значаја код синтезе нових полинуклеарних комплекса платине(II) који могу бити врло ефикасни катализатори селективне хидролизе пептида који садрже аминокиселину L-метионин у бочном низу.

5. ЗАКЉУЧАК

У реакцијама Ас-L-Met-Gly дипептида са $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-}O,O')]$ и $\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-}O,O')$ комплексима при физиолошким условима рН и температуре, долази до веома споре хидролизе Met-Gly пептидне везе, док у реакцијама ових Pt(II) комплекса са Ас-L-Met-L-His, Ас-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ и Ас-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly пептидима не долази до хидролизе пептидне везе. У овим реакцијама настају стабилни макрохелатни платина(II)-пептид комплекси. Нађено је да брзина хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ас-L-Met-Gly дипептиду у присуству три Pt(II)-малонато комплекса, који се разликују по броју метил група везаних за α-угљеников атом, директно зависи од броја метил група у малонато лиганду и опада у следећем низу: mal > Me-mal > Me₂-mal

Добијени резултати су показали да је у односу на мононуклеарни $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс, одговарајући динуклеарни $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекс знатно ефикаснији катализатор селективне хидролизе Met-Gly пептидне везе у Ас-L-Met-Gly дипептиду. Разлике у каталитичким својствима мононуклеарног и динуклеарног платина(II) комплекса су објашњене чињеницом да ови комплекси у реакцији са Ас-L-Met-Gly дипептидом формирају различите интермедијерне платина(II)-пептид комплексе.

У реакцијама динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ и $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекса са Ас-L-His-Gly и Ас-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂, нађено је да динуклеарни пиразински комплекс, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, показује знатно већу каталитичку способност хидролизе пептидне везе, у односу на аналогни

пиридазински $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекс. Нађено је да $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекс, селективно хидролизује His-Gly пептидну везу у Ac-L-His-Gly дипептиду. Атом сумпора метионинског остатка из Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептида се координује за $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекс при чему хидролизује само пептидну везу која укључује карбоксилну групу метионина. Међутим, за аналогни $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекс се координује атом сумпора метионина, као и атом азота хистидина из Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ тетрапептида, при чему хидролизују пептидне везе које укључују карбоксилну групу L-метионина и L-хистидина. Закључено је да се у полипептидима који садрже L-метионин и L-хистидин може постићи региоселективно раскидање пептидне везе која укључује карбоксилну групу L-метионина, уколико се као катализатор користи $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ комплекс.

У реакцијама $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ комплекса (L је бидентатно координован en, 1,2-pn, ibn, dach, pz је мостни пиразински лиганд) са N-ацетилованим L-метионилглицином (Ac-L-Met-Gly), нађено је да брзина хидролизе Met-Gly пептидне везе опада са повећањем стерног ефекта лиганда координованог за Pt(II) јон (en > 1,2-pn > ibn > dach).

Добијени резултати у оквиру ове докторске дисертације представљају оригинални научни допринос изучавању механизма селективне хидролизе пептида који у бочном низу садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин помоћу динуклеарних комплекса Pt(II). Резултати из ове дисертације су од значаја за синтезу нових динуклеарних комплекса прелазних метала који се потенцијално могу применити као синтетичке металопептидазе за селективну хидролизу пептида и протеина у циљу одређивања њихове сложене структуре. Поред тога, резултати доприносе бољем разумевању механизма токсичног деловања антитуморских комплекса платине, и у будућности могу бити од значаја за синтезу нових антитуморских комплекса платине који ће имати већу антитуморску активност и мање токсично деловање.

ЛІТЕРАТУРА

- [1] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, **205** (1965) 698
- [2] P.A. Sutton, D.A. Buckingham, *Acc. Chem. Res.* **20** (1987) 357
- [3] J. Chin, *Acc. Chem. Res.* **24** (1991) 145
- [4] M.L. Tobe, J. Burgess, *Inorganic Reaction Mechanisms*, Addison Wasley Logmam Lit, Essex (1999) 70
- [5] A.S. Abu-Surrah, M. Kettunen, *Curr. Med. Chem.*, **13** (2006) 1337
- [6] Y.P. Ho, S.C.F. Au-Yeung, K.K.W. To, *Med. Res. Rev.* **23** (2003) 633
- [7] J. Reedijk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (2003) 3611
- [8] T. Boulikas, M. Vougiouka, *Oncol. Rep.*, **11** (2004) 559
- [9] F. Muggia, *Gynecol. Oncol.*, **112** (2009) 275
- [10] K.R. Bames, S.J. Lippard, *Metal Ions Biol. Syst.*, **42** (2004) 143
- [11] A.A. Argyriou, P. Polychronopoulos, G. Iconomou, E. Chroni, H.P. Kalofonos, *Cancer Treat. Rev.*, **34** (2008) 368
- [12] K. Barabas, R. Milner, D. Lurie, C. Adin, *Vet. Comp. Oncol.*, **6** (2008) 1
- [13] S.R. McWhinney, R.M. Goldberg, H.L. McLeod, *Mol. Cancer Ther.*, **8** (2009) 10
- [14] C.A. Rabik, M.E. Dolan, *Cancer Treat. Rev.*, **33** (2007) 9
- [15] M. Galanski, M.A. Jakupiec, B.K. Keppler, *Curr. Med. Chem.*, **12** (2005) 2075
- [16] D. Wang, S.J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4** (2005) 307
- [17] C.X. Zhang, S.J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7** (2003) 481
- [18] M.A. Fuertes, C. Alonso, J.M. Pérez, *Chem. Rev.*, **103** (2003) 645
- [19] A.M. Montana, C. Batalla, *Curr. Med. Chem.*, **16** (2009) 2235
- [20] R. Canetta, M. Rozenzweig, S.K. Carter, *Cancer Treat. Rev.*, (Suppl. A) **12** (1985) 125
- [21] J.H. Ahn, Y.K. Kang, T.W. Kim, H. Bahng, H.M. Chang, W.C. Kang, W.K. Kim, J.S. Lee, J.S. Park, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **50** (2002) 104
- [22] W.S. Lee, G.W. Lee, H.W. Kim, O.J. Lee, Y.J. Lee, G.H. Ko, J.S. Lee, J.S. Jang, W.S. Ha, *Cancer Res. Treat.*, **37** (2005) 208
- [23] R. Voegeli, W. Schumacher, J. Engel, J. Respondek, P. Hilgard, J. *Cancer Res. Clin. Oncol.*, **116** (1990) 439
- [24] M. Koshiyama, M. Kinezaki, T. Uchida, M. Sumitomo, *Anticancer Res.*, **25** (2005) 4499

- [25] K. Hanada, K. Asano, T. Nishimura, T. Chimata, Y. Matsuo, M. Tsuchiya, H. Ogata, J. *Pharm. Pharmacol.*, **60** (2008) 317
- [26] A.P. Kudelka, Z.H. Siddik, D. Tresukosol, C.L. Edwards, R.S. Freedman, T.L. Madden, R. Rastogi, M. Hord, E.E. Kim, C. Tomos, R. Mante, J.J. Kavanagh, *Anticancer Drugs*, **8** (1997) 649
- [27] C. Manzotti, G. Pratesi, E. Menta, R. Di Domenico, E. Cavalletti, H. H. Fiebig, L.R. Kelland, N. Farrell, D. Polizzi, R. Supino, G. Pezzoni, F. Zunino, *Clin. Cancer Res.*, **6** (2000) 2626
- [28] T. Dragovich, D. Mendelson, S. Kurtin, K. Richardson, D. Von Hoff, A. Hoos, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **58** (2006) 759
- [29] A. Bhargava, U.N. Vaishampayan, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **18** (2009) 1787
- [30] T. Boulikas, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **18** (2009) 1197
- [31] M. Drees, W.M. Dengler, H.R. Hendriks, L.R. Kelland, H.H. Fiebig, *Eur. J. Cancer*, **31A** (1995) 356
- [32] S.C. White, P. Lorigan, G.P. Margison, J.M. Margison, F. Martin, N. Thatcher, H. Anderson, M. Ranson, *Br. J. Cancer*, **95** (2006) 822
- [33] B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature*, **222** (1969) 385
- [34] E.R. Guggenheim, D. Xu, C.X. Zhang, P.V. Chang, S.J. Lippard, *ChemBioChem.*, **10** (2009) 141
- [35] B. Lippert, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, John Wiley & Sons Inc., New York, (1999)
- [36] Y. Sedletska, M.J. Giraud-Panis, J.M. Malinge, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **5** (2005) 251
- [37] W. Sttroyens, P. Dodion, M. Rozenzweig, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **116** (1990) 392
- [38] G. Cossa, L. Gatti, F. Zunino, P. Perego, *Curr. Med. Chem.*, **16** (2009) 2355
- [39] P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12** (2008) 197
- [40] K.S. Lovejoy, S.J. Lippard, *Dalton Trans.*, **48** (2009) 10651
- [41] D.P. Gately, S.B. Howell, *Br. J. Cancer*, **67** (1993) 1171
- [42] E. Alessio, *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, (2011)
- [43] D. Wang, S.J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4** (2005) 307
- [44] E.R. Jamieson, S.J. Lippard, *Chem. Rev.*, **99** (1999) 2467

- [45] A. Kraker, J. Schmidt, S. Krezoski, D.H. Petering, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130** (1985) 786
- [46] T. Ishikawa, F. Ali-Osman, *J. Biol. Chem.*, **268** (1993) 20116
- [47] R.J. Schilder, L. Hall, A. Monks, L.M. Handel, A.J. Jr Fornace, R.F. Ozols, A.T. Fojo, T.C. Hamilton, *Int. J. Cancer*, **45** (1990) 416
- [48] T. Ishikawa, C.D. Wrightand, H. Ishizuka, *J. Biol. Chem.*, **269** (1994) 29085
- [49] B.P. Esposito, R. Najjar, *Coord. Chem. Rev.*, **232** (2002) 137
- [50] S. Komeda, M. Lutz, A.L. Spek, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Inorg. Chem.* **39** (2000) 4230
- [51] N.J. Wheate, C. Cullinane, L.K. Webster , J.G. Collins, *Anti-Cancer Drug Des.*, **16** (2001) 91
- [52] B.A.J. Jansen, J. Van Der Zwan, H. Den Dulk, J. Brouwer, J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, **44** (2001) 245
- [53] S. Komeda, M. Lutz, A.L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2002) 4738
- [54] N.A. Kas'yanenko, E.E.F. Aia, A.A. Bogdanov, Y.V. Kosmotynsaya, K.I. Yakovlev, *Mol. Biol.*, **36** (2002) 745
- [55] N.J. Wheate, J.G. Collins, *Coord. Chem. Rev.*, **241** (2003) 133
- [56] N.J. Wheate, J.G. Collins, *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, **5** (2005) 267
- [57] S. Komeda, G.V. Kalayda, M. Lutz, A.L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, **46** (2003) 1210
- [58] G.V. Kalayda, S. Komeda, K. Ikeda, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **24** (2003) 4347
- [59] G.V. Kalayda, B.A.J. Jansen, P. Wielard, H.J. Tanke, J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **10** (2005) 305
- [60] I. Kostova, *Recent Pat. Anti-Canc.*, **1** (2006) 1
- [61] Q. Liu, Y. Qu, R. Van Antwerpen, N. Farrell, *Biochemistry*, **45** (2006) 4248
- [62] N. Farrell, *Metal Ions Biol. Syst.*, **42** (2004) 251
- [63] Y. Qu, M.-C. Tran, N.P. Farrell, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **14** (2009) 969
- [64] D.J. Jodrell, T.R.J. Evans, W. Steward, D. Cameron, J. Prendiville, C. Aschele, C. Noberasco, M. Lind, J. Carmichael, N. Dobbs, G. Gamboni, B. Gatti, F. De Braud, *Eur.*

- J. Cancer*, **40** (2004) 1872
- [65] C. Billecke, S. Finniss, L. Tahash, C. Miller, T. Mikkelsen, N.P. Farrell, O. Bögl, *Neuro-Oncol.*, **8** (2006) 215
- [66] A. Hegmans, A. Kasparkova, O. Vrana, L.R. Kelland, V. Brabec, N.P. Farrell, *J. Med. Chem.*, **51** (2008) 2254
- [67] E.I. Montero, B.T. Benedetti, J.B. Mangrum, M.J. Oehlsen, Y. Qu, N.P. Farrell, *Dalton Trans.*, **36** (2007) 4938
- [68] M.E. Oehlsen, Y. Qu, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, **42** (2003) 5498
- [69] M.E. Oehlsen, A. Hegmans, Y. Qu, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, **44** (2005) 3004
- [70] M.E. Oehlsen, A. Hegmans, Y. Qu, N. Farrell, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **10** (2005) 433
- [71] J.W. Williams, Y. Qu, G.H. Bulluss, E. Alvarado, N.P. Farrell, *Inorg. Chem.*, **46** (2007) 5820
- [72] J.F. Mao, Y.M. Zhang, J.H. Zhu, C.L. Zhang, Z.J. Guo, *Chem. Commun.*, (2009) 908
- [73] E.T. Cesar, M.V. de Almeida, A.P.S. Fontes, E.C.P. Maia, A. Gamier-Suillerot, M.R.C. Couri, E.de C.A. Felicio, *J. Inorg. Biochem.*, **95** (2003) 297
- [74] L.J. Teixeira, M. Seabra, E. Reis, M.T.G. da Cruz, M.C.P. de Lima, E. Pereira, M.A. Miranda, M.P.M. Marques, *J. Med. Chem.*, **47** (2004) 2917
- [75] M. Willermann, C. Mulcahy, R.K.O. Sigel, M.M. Cerda, E. Freisinger, P.J.S. Miguel, M. Roitzsch, B. Lippert, *Inorg. Chem.*, **45** (2006) 2093
- [76] G.V. Kalayda, S. Komeda, K. Ikeda, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **24** (2003) 4347-4355.
- [77] S. Komeda, G.V. Kalayda, M. Lutz, A.L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, **46** (2003) 1210
- [78] S. Komeda, S. Bombard, S. Perrier, J. Reedijk, J. Kozelka, *J. Inorg. Biochem.*, **96** (2003) 357
- [79] S. Teletchéa, S. Komeda, J.M. Teuben, M.A. Elizondo-Riojas, J. Reedijk, J. Kozelka, *Chem. Eur. J.*, **12** (2006) 3741
- [80] Y.M. Zhao, W.J. He, P.F. Shi, J. H. Zhu, L. Qiu, L.P. Lin, Z.J. Guo, *Dalton Trans.*, **22** (2006) 2617
- [81] H. Cheng, F. Huq, P. Beale, K. Fisher, *Eur. J. Med. Chem.*, **41** (2006) 896
- [82] H. Tayyem, F. Huq, J.Q. Yu, P. Beale, K. Fisher, *ChemMedChem*, **3** (2008) 145

- [83] F. Huq, H. Tayyem, J.Q. Yu, P. Beale, K. Fisher, *Med. Chem.*, **5** (2009) 372
- [84] M.J. Hannon, *Chem. Soc. Rev.*, **36** (2007) 280
- [85] A.L. Harris, J.J. Ryan, N. Farrell, *Mol. Pharmacol.*, **69** (2006) 666
- [86] A.L. Harris, X. Yang, A. Hegmans, L. Povirk, J.J. Ryan, L. Kelland, N.P. Farrell, *Inorg. Chem.*, **44** (2005) 9598
- [87] E. Gao, M. Zhu, H. Yin, L. Liu, Q. Wu, Y. Sun, *J. Inorg. Biochem.*, **102** (2008) 1958
- [88] J.C. Zhang, L. Liu, Y.Q. Gong, X.M. Zheng, M.S. Yang, J.R. Cui, S.G. Shen, *Bur. J. Med. Chem.*, **44** (2009) 2322
- [89] A. Radzicka, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.*, **118** (1996) 6105
- [90] L.R. Croft, *Handbook of Protein Sequence Analysis*, 2nd ed.; Wiley: Chichester, U. K., (1980)
- [91] J.M. Walker, *The Protein Protocol Handbook*, Humana Press, Totowa, NJ, (1996)
- [92] P.A. Sutton, D.A. Buckingham, *Acc. Chem. Res.* **20** (1987) 357
- [93] N.V. Kaminskaia, T.W. Johnson, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 8663
- [94] I.E. Burgenson, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.*, **30** (1991) 4299
- [95] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.*, **118** (1996) 51
- [96] G. Mehal, R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, **24** (1985) 4165
- [97] D.D. Gummin, E.M.A. Ratila, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.*, **25** (1986) 24
- [98] T.G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.*, **166** (1997) 313
- [99] H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, **82** (1982) 385
- [100] E. Wong, C.M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, **99** (1999) 2451
- [101] H. Kozłowski, L.D. Pettit, *Stud. Inorg. Chem.*, **11** (1991) 530
- [102] D.L. Rabenstein, A.A. Isab, M.M. Shoukry, *Inorg. Chem.*, **21** (1982) 3234
- [103] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.*, **31** (1992) 3994
- [104] L. Zhu, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1993) 4566
- [105] D.P. Ašanin, S. Rajković, D. Molnar-Gabor, M.I. Djuran, *Monatsh Chem.* **135** (2004) 1445
- [106] X. Chen, X. Luo, Z. Song, S. Zhou, L. Zhu, *Polyhedron*, **17** (1998) 2271
- [107] D.E. Wilcox, *Chem. Rev.*, **96** (1996) 2435
- [108] G.B. Kater, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.*, **37** (1998) 1021
- [109] E.W. Wilson, Jr., R.B. Martin, *Inorg. Chem.*, **9** (1970) 528; *ibid*, **10** (1971) 1197

- [110] H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, **74** (1974) 471
- [111] I. Sovago, R.B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **43** (1981) 425
- [112] L. Menabue, M. Saladini, M. Sola, *Inorg. Chem.*, **29** (1990) 1293
- [113] S. Kasselaoui, A. Garoufis, M. Hadjiliadis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.*, **104** (1990) 1
- [114] J.P. Laussac, R. Haran, N. Hadjiliadis, *C. R. Acad. Sci. Ser. 2*, **300** (1985) 137
- [115] S.L. Best, T.K. Chattopadhyay, M.I. Djuran, R.A. Palmer, P.J. Sadler, I. Sovago, K. Varnagy, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **54** (1997) 2587
- [116] S.U. Milinković, T.N. Parac, M.I. Djuran, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1997) 2771
- [117] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.*, **118** (1996) 5946
- [118] P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.*, **190-191** (1999) 171
- [119] T.G. Appleton, F.J. Pesch, M. Wienken, S. Menzer, B. Lippert, *Inorg. Chem.*, **31** (1992) 4410
- [120] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron*, **19** (2000) 959
- [121] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron*, **18** (1999) 3611
- [122] N.M. Milović, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.*, **41** (2002) 7053
- [123] A.F.M. Siebert, W.S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1997) 385
- [124] M. Hahn, M. Kleine, W.S. Sheldrick, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6** (2001) 556
- [125] S. Manka, F. Becker, O. Hohage, W.S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.*, **98** (2004) 1947
- [126] O. Hohage, S. Manka, W.S. Sheldrick, *Inorg. Chim. Acta*, **362** (2009) 953
- [127] M. Kleine, D. Wolters, W.S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.*, **97** (2003) 354
- [128] M.D. Živković, D.P. Ašanin, S. Rajković, M.I. Djuran, *Polyhedron*, **30** (2011) 947
- [129] S.G. Murray, F.R. Hartley, *Chem. Rev.*, **81** (1981) 365
- [130] T.N. Parac, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.*, **37** (1998) 2141
- [131] M.R. Ghadiri, C.J. Choi, *J. Am. Chem. Soc.*, **112** (1990) 1630
- [132] L. Zhu, L. Qin, T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.*, **116** (1994) 5218
- [133] G.R. Moore, G.W. Pettigrew, *Cytochromes c-Evolutionary Structural and Physicochemical Aspects*, Springer-Verlag, Berlin (1990)
- [134] N.M. Milović, L.M. Dutcă, N.M. Kostić, *Chem.Eur. J.*, **9** (2003) 5097
- [135] L.M. Dutcă, K.S. Ko, N.L. Pohl, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.*, **44** (2005) 5141

- [136] L. Zhu, R. Bakhtiar, N.M. Kostić, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **3** (1998) 383
- [137] N.M. Milović, L.M. Dutcă, N.M. Kostić *Inorg. Chem.*, **42** (2003) 4036
- [138] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta*, **339** (2002) 104
- [139] R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85** (1963) 2149
- [140] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C.J. Logan, R.C. Sheppard and B.J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1978) 537
- [141] H. Hohmann, R. van Eldik, *Inorg. Chim. Acta*, **174** (1990) 87
- [142] A. Caubet, V. Moreno, E. Molins, C. Miravittles, *J. Inorg. Biochem.* **48** (1992) 135
- [143] R.C. Warren, J.F. McConnell, N.C. Stephenson, *Acta Crystallogr. Sect. B*, **26** (1970) 1402
- [144] A. Pasini, C. Caldirola, *Inorg. Chim. Acta*, **151** (1988) 19
- [145] N. Summa, T. Soldatović, L. Dahlenburg, Ž.D. Bugarčić, R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12** (2007) 461
- [146] F.D. Rochon, G. Massarweh, *Inorg. Chim. Acta*, **359** (2006) 4095
- [147] K.J. Laidler, *Chemical Kinetics*, third ed., Harper & Row, New York (1987) 22
- [148] CrysAlis Pro, *Agilent Technologies*, Yarnton, Oxfordshire, England, (2011)
- [149] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A* **64** (2008) 112
- [150] *Stereochemical Workstation Operation Manual*, Release 3.4, Siemens Analytical X-Ray Instruments, Inc., Madison, WI, USA, (1989)
- [151] I.J. Bruno, J.C. Cole, P.R. Edgington, M. Kessler, C.F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, *Acta Crystallogr. Sect. B*, **58** (2002) 389
- [152] N.M. Milović, N.M. Kostić, A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems, Palladium(II) and Platinum(II) Complexes as Synthetic Peptidases*, vol. XXXVIII, Marcel Dekker Inc., (2001) 145
- [153] Z. Guo, T.W. Hambley, P. del Socorro Murdoch, P.J. Sadler, U. Frey, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1997) 469
- [154] E. Monti, M. Gariboldi, A. Maiocchi, E. Marengo, C. Cassino, E. Gabano, D. Osella, *J. Med. Chem.*, **48** (2005) 857
- [155] A. Pasini, G. D'Alfonso, C. Manzotti, M. Moret, S. Spinelli, M. Valsecchi, *Inorg. Chem.*, **33** (1994) 4140
- [156] Z.D. Petrović, M.I. Djuran, F.W. Heinemann, S. Rajković, S.R. Trifunović, *Bioorg.*

- Chem.*, **34** (2006) 225
- [157] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Aust. J. Chem.*, **53** (2000) 645
- [158] M.D. Živković, S. Rajković, M.I. Djuran, *Bioorg. Chem.*, **36** (2008) 161
- [159] M. Willermann, C. Mulcahy, R.K.O. Sigel, M. Morell Cerda, E. Freisinger, P.J.S. Miguel, M. Roitzsch, B. Lippert, *Inorg. Chem.*, **45** (2006) 2093
- [160] S. Derossi, M. Casanova, E. Iengo, E. Zangrando, M. Stener, E. Alessio, *Inorg. Chem.* **46** (2007) 11243
- [161] K. Kumazawa, K. Biradha, T. Kusakawa, T. Okano, M. Fujita, *Angew. Chem.* **115** (2003) 4039
- [162] L.D. Slep, S. Pollak, J.A. Olabe, *Inorg. Chem.*, **38** (1999) 4369
- [163] T. Sawada, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **132** (2010) 7194
- [164] C.A. Black, L.R. Hanton, M.D. Spicer, *Inorg. Chem.*, **46** (2007) 3669
- [165] D. Quinonero, C. Garau, C. Rotger, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P.M. Deya, *Angew. Chem., Int. Ed.* **41** (2002) 3389
- [166] M. Mascal, A. Armstrong, M.D. Bartberger, *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2002) 6274
- [167] C. Garau, D. Quinonero, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P.M. Deya, *New J. Chem.*, **27** (2003) 211
- [168] P. de Hoog, P. Gamez, I. Mutikainen, U. Turpeinen, J. Reedijk, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **43** (2004) 5815
- [169] D. Quinonero, A. Frontera, P.M. Deya, *ChemPhysChem.*, **9** (2008) 397
- [170] I.A. Gural'skiy, D. Escudero, A. Frontera, P.V. Solntsev, E.B. Rusanov, A.N. Chernega, H. Krautscheid, K.V. Domasevitch, *Dalton Trans.*, (2009) 2856
- [171] J. Mareda, S. Matile, *Chem. Eur. J.*, **15** (2009) 28
- [172] A. Perez-Velasco, V. Gortea, S. Matile, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47** (2008) 921
- [173] A. Frontera, P. Gamez, M. Mascal, T.J. Mooibroek, J. Reedijk, *Angew. Chem.*, **50** (2011) 9564
- [174] S. Demeshko, S. Dechert, F. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (2004) 4508
- [175] P. Ballester, E.R.T. Tiekink, J. Zukermna-Schpector John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, (2012) 79
- [176] N. Strater, W.N. Lipscomb, T. Kabunde, B. Krebs, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35** (1996) 2024

- [177] N. Strater, T. Kabunde, P. Tucker, H. Witzel, B. Krebs, *Science*, **268** (1995) 1489
- [178] M. Deitrich, D. Munstermann, H. Suerbaum, H. Witzel, *Eur. J. Biochem.* **199** (1991) 105
- [179] M.A. Aquino, J. Lim, A.G. Sykes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1992) 2135
- [180] E. Hough, L.K. Hansen, B. Birknes, K. Jynge, S. Hansen, A. Hordvik, C. Little, E. Dodson, Z. Derewenda, *Nature*, **338** (1989) 357
- [181] A. Volbeda, A. Lahm, F. Sakiyama, D. Suck, *EMBO J.* **10** (1991) 1607
- [182] E.E. Kim, H.W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.*, **218** (1991) 449
- [183] M.D. Živković, S. Rajković, U. Rychlewska, B. Warzajtis, M.I. Djuran, *Polyhedron*, **26** (2007) 1541
- [184] S. Rajković, B.Đ. Glišić, M.D. Živković, M.I. Djuran, *Bioorg. Chem.*, **37** (2009) 173
- [185] F.H. Allen, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, **58** (2002) 380
- [186] L.J. Farrugia, *J. Appl. Cryst.*, **32** (1999) 837
- [187] J. Sanchez Costa, A. Gonzalez Castro, R. Pievo, O. Roubeau, B. Modéc, B.Kozlevcar, S.J. Teat, P. Gamez, J. Reedijk, *CrystEngComm.*, **12** (2010) 3057
- [188] P.A. Kozmin, T.B. Larina, M.D. Surazhskaya, A.N. Zhilyaev, G.N. Kuznetsova, *Zh. Neorg. Khim. Russ. J. Inorg. Chem.*, **38** (1993) 859
- [189] E.W. Abel, E.S. Blackwall, P.J. Heard, K.G. Orrell, V. Sik, M.B. Hursthouse, M.A. Mazid, K.M.A. Malik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1994) 445
- [190] E.W. Abel, P.J. Heard, K.G. Orrell, M.B. Hursthouse, K.M.A. Malik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1995) 3165
- [191] E.W. Abel, P.J. Heard, K.G. Orrell, M.B. Hursthouse, K.M.A. Malik, *Polyhedron*, **13** (1994) 2501
- [192] S. Rajković, M.D. Živković, C. Kállay, I. Sóvágó, M.I. Djuran, *Dalton Trans.*, (2009) 8370
- [193] K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. Del, S. Murdoch, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1994) 721
- [194] X. Chen, L. Zhu, H. Yan, X. You, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton. Trans.*, (1996) 2653
- [195] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Monatsh. Chem.*, **130** (1999) 613

БИОГРАФИЈА

Дарко П. Ашанин је рођен 09. 12. 1976. године у Крагујевцу. Основно и средњешколско образовање (Техничка школа – хемијско-технолошки смер) стекао је у Крагујевцу. На Природно-математички факултет у Крагујевцу, група Хемија (смер истраживање и развој) уписао се школске 1997/98. године, где је и дипломирао, маја 2003. године, са просечном оценом 8,32. Докторске студије уписао је школске 2006/07. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, смер Неорганска хемија. Од марта 2006. године је у сталном радном односу на Природно-математичком факултету у Крагујевцу у својству хемијског аналитичара у Институту за хемију.

ПРИЛОГ



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Inorganica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ica

¹H NMR study of the reactions between carboplatin analogues [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] and various methionine- and histidine-containing peptides under physiologically relevant conditions

Snežana Rajković, Darko P. Ašanin, Marija D. Živković, Miloš I. Djuran *

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2012

Received in revised form 30 October 2012

Accepted 9 November 2012

Available online 20 November 2012

Keywords:

Proton NMR spectroscopy

Malonate Pt(II) complexes

L-Methionine- and L-histidine-containing peptides

Ring-opened Pt(II)–peptide complexes

ABSTRACT

¹H NMR spectroscopy was applied to the study the reactions of [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] complexes (en is ethylenediamine, Me-mal and Me₂-mal are bidentate coordinated anions of 2-methylmalonic and 2,2-dimethylmalonic acids, respectively) with *N*-acetylated Ac-L-Met-Gly and Ac-L-Met-L-His-type peptides (Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ and Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly). The use of Me-mal and Me₂-mal Pt(II) complexes in the above reactions allows convenient monitoring of their biscarboxylate group via methyl peaks by ¹H NMR measurements. All reactions were realized at 37 °C with equimolar amounts of the Pt(II) complex and the dipeptide at pH 7.40 in 50 mM phosphate buffer in D₂O. In all these reactions the ring-opened Me-mal and Me₂-mal Pt(II) adducts as an intermediate products were detected in solution for more than 48 h. We found that during this time in the reaction with Ac-L-Met-Gly these monodentate bound malonate ligands have been replaced by water molecule leading to the formation of the corresponding aqua Pt(II)–peptide complex which further promotes the regioselective cleavage of the peptide. However, in the reaction with Ac-L-Met-L-His-type peptides a selective intramolecular replacement of these malonate anions by the N3 imidazole nitrogen atom from histidine residue was occurred. This replacement reaction leads to the formation of the S,N3-macrocyclate Pt(II)–peptide complex which was shown as very stable and hydrolytically inactive for more than two weeks.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recent years have witnessed an increasing interest in the study of the interactions of platinum(II) and palladium(II) complexes with sulfur- and histidine-containing peptides and proteins [1–4]. This interest was induced through the facts that interactions of platinum(II) complexes with methionine or cysteine residues in peptides and proteins are thought to be responsible for a variety of biological effects, such as deactivation of platinum(II) antitumor complexes, development of cellular resistance to platinum drugs and to toxic side effects, such as nephrotoxicity [5]. The presence of histidine has also been established in a large number of enzyme active centers [6] and the histidyl residue is probably the most important metal-binding site in biological systems [7,8]. Moreover, interest in the study of the interactions of platinum(II) [9–11] and palladium(II) [10–24] complexes with methionine- and histidine-containing peptides and proteins also become of cardinal importance after the discovery that their aqua complexes can be promising reagents for the hydrolytic cleavage of the above-mentioned

peptides. In general, it was shown that these complexes bind to the heteroatom in the side chain of methionine [9–16] or histidine [10,11,17–25] and promote cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of the anchoring amino acid. The influence of different factors, such as pH, temperature, solvent and steric effects of the substrate or catalyst, on this hydrolytic reaction has been extensively investigated in the past two decades. Up to now, most of these investigations were performed in strong acidic media, whereas only a few reports concerning this hydrolytic reaction between methionine- and histidine-containing peptides and platinum(II) antitumor complexes under physiologically relevant conditions have been reported [26–30]. The findings that Pt(II) complexes can cleave peptides and proteins under physiologically relevant conditions of the pH and temperature can have importance for a better understanding of the toxic side effects of Pt(II) antitumor drugs. Our recent studies of the reactions between various Pt(II) complexes of the type [Pt(L)Cl₂] and [Pt(L)(cbdca-O,O')] (L is ethylenediamine, en; (±)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane, dach; (±)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn and cbdca is cyclobutane-1,1-dicarboxylate) and Ac-L-Met-Gly dipeptide showed that hydrolysis of the Met-Gly amide bond in this peptide occurred under physiological conditions of pH and temperature (pH 7.40 and 37 °C) [31].

* Corresponding author. Tel.: +381 34 300 251; fax: +381 34 335 040.

E-mail address: djuran@kg.ac.rs (M.I. Djuran).

The cleavage of this peptide was much slower in the reaction with $[\text{Pt}(\text{L})(\text{cbdca-O},\text{O}')]^-$ than with $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ complexes. Difference in the catalytic abilities between these two type of Pt(II) complexes was attributed to the different stability of their intermediate $[\text{Pt}(\text{L})(\text{cbdca-O})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]^-$ and $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]$ complexes, respectively. The higher stability of the initially formed $[\text{Pt}(\text{L})(\text{cbdca-O})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]^-$ complex with respect to the analogue $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]$ intermediate product is in accordance with the slow replacement of its cbdca ligand by a water molecule, finally resulting in the formation of the hydrolytically active $[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]^+$ complex. These findings are in accordance with those previously reported that very stable ring-opened $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{cbdca-O})(\text{L-HMet-S})]$ complex was detected during the reaction of carboplatin with L-HMet and that similar ring-opened species was also found in the urine of animals treated with carboplatin (carboplatin, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{cbdca-O},\text{O}')]^-$), is a widely used second generation anticancer drug [32]. Malonate complexes of Pt(II)-am(m)ine exhibited antitumor activity without the nephrotoxic effects of cisplatin, *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ [33,34].

We report here reactions of peptides with methionine (Ac-L-Met-Gly) and both methionine and histidine in the side chains (Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ and Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly) with carboplatin analogues, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]^-$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]^-$. Our use of 2-methylmalonate (Me-mal) and 2,2-dimethylmalonate (Me₂-mal) in the place of cyclobutane-1,1-dicarboxylate (cbdca) allows convenient monitoring the biscarboxylate group via methyl peaks by ¹H NMR measurements. Also, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]^-$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]^-$ complexes showed better solubility in comparison with analogue $[\text{Pt}(\text{L})(\text{cbdca-O},\text{O}')]^-$ (L is en, dach and 1,2-pn).

2. Experimental

2.1. Materials

Distilled water was demineralized and purified to a resistance greater than 10 MΩ cm⁻¹. The compounds D₂O, ethylenediamine (en), malonic acid (H₂mal), 2-methylmalonic acid (Me-H₂mal), 2,2-dimethylmalonic acid (Me₂-H₂mal) and K₂[PtCl₄] were obtained from the Aldrich Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The dipeptide L-methionylglycine (L-Met-Gly) was obtained from the Sigma Chemical Co. The dipeptide L-methionyl-L-histidine (L-Met-L-His) and pentapeptide L-methionylglycyl-L-histidylglycine (L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly) were obtained from the Bachem A.G. The tetrapeptide N-acetylated-L-methionylglycyl-L-histidylglycineamide (Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂) was synthesized by manual solid phase peptide synthesis using Fmoc-chemistry [35,36]. The peptide was purified using semi-preparative RP-HPLC, and analyzed by analytical HPLC and electrospray ionization mass spectrometry. The terminal amino group in this peptide was acetylated by a standard method [12]. The $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ complex was synthesized according to a procedure published in the literature [37–39]. The purity of the complex was checked by elemental microanalyses. *Anal.* Calc. for $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2] = \text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$ (FW = 326.08): C, 7.37; H, 2.47; N, 8.59. Found: C, 7.32; H, 2.50; N, 8.52%.

2.2. Syntheses of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]^-$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal})]$ complexes

The $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]^-$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]^-$ complexes were synthesized by modification of the procedure published in the literature [40].

The chlorido complex $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ was converted into the corresponding diaqua complex by treatment with 1.95 equivalents of

AgNO₃ at pH 2.00, according to a published method [41]. The solid AgCl was removed by filtration in the dark. To the clear solution of the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex, equimolar amounts of the solid Me-H₂mal (or Me₂-H₂mal) acid and two equivalents of NaHCO₃ were added. The mixture was stirred at 60 °C for 3 h. All the complexes were crystallized from water by cooling in a refrigerator. The pure complexes were obtained by recrystallization from small amount of water. The yield was between 50% and 60%. *Anal.* Calc. for $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]^- = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$ (FW = 371.25): C, 19.41; H, 3.26; N, 7.55. Found: C, 19.50; H, 3.22; N, 7.48%. *Anal.* Calc. for $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]^- = \text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$ (FW = 385.28): C, 21.82; H, 3.66; N, 7.27. Found: C, 21.54; H, 3.42; N, 7.43%.

2.3. NMR (¹H and ¹³C) characterization (D₂O, 200 MHz)

$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]^-$: ¹H NMR, δ (ppm) 2.57 (s, 4H, 2CH₂ from en), 4.16 (q, H, α-CH from Me-mal), 1.37 (d, 3H, CH₃ from Me-mal); ¹³C NMR, δ (ppm) 16.54 (CH₃ from Me-mal), 50.79 (CH₂ from en), 53.68 (CH from Me-mal), 183.30 (C=O from Me-mal).

$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]^-$: ¹H NMR, δ (ppm) 2.59 (s, 4H, 2CH₂ from en), 1.77 (s, 6H, 2CH₃ from Me₂-mal); ¹³C NMR, δ (ppm) 27.87 (CH₃ from Me₂-mal), 50.68 (CH₂ from en), 55.32 (C from Me₂-mal), 185.63 (C=O from Me₂-mal).

These data are in accordance with those reported previously for the corresponding Pt(II) complexes [39,42].

2.4. Measurements

All pH measurements were realized at ambient temperature using an Iskra MA 5704 pH meter calibrated with Fischer certified buffer solutions of pH 4.00 and 7.00. The results were not corrected for the deuterium isotope effect.

The reactions of Ac-L-Met-Gly, Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ and Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly with the platinum(II) complexes in 50 mM phosphate buffer at pH 7.40 in D₂O were followed by ¹H NMR spectroscopy using a Varian Gemini 2000 spectrometer (200 MHz). Sodium trimethylsilylpropane-3-sulfonate (TSP) was used as an internal reference. The final solution was 10 mM in each reactant. All reactions were performed at 37 °C.

Equimolar amounts of the platinum(II) complex and the peptide were mixed in an 5 mm NMR tube and the rate constants were determined from the proton NMR data recorded at appropriate time intervals. The formation of the ring-opened complexes **1a** and **1b** (Fig. 1) in the reactions of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]^-$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]^-$ complexes with Ac-L-Met-Gly and Ac-L-Met-L-His dipeptides, respectively, was fitted to a second-order process [43] by plotting $x/a_0(a_0 - x)$ against t (a_0 is the initial concentration of the Pt(II) complex and x is the concentration of the corresponding ring-opened complex at time t). The concentrations of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]^-$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]^-$ complexes were determined by integration of the resonances for the CH₃ protons of bidentately coordinated Me-mal at 1.37 and Me₂-mal at 1.77 ppm and those for these protons at 1.24 for Me-mal and 1.27 ppm for Me₂-mal both coordinated in monotopic fashion of the corresponding ring-opened Pt(II)-peptide complex.

The detachment of Me-mal and Me₂-mal ligands from the ring-opened Pt(II)-peptide complexes **1a** and **1b** leading to the formation of the aqua Pt(II)-peptide complex **2** and macrochelate complex **4** (Fig. 1), respectively, was fitted to a first-order process [43] by plotting $\ln(a_0/a_t)$ against t (a_0 is the concentration of the corresponding ring-opened Pt(II)-peptide complex and a_t is the concentration of this complex at time t). The concentrations of the ring-opened complexes **1a** and **1b** were determined by integration of the resonances for the CH₃ protons of the Me-mal at 1.24 and Me₂-mal at 1.27 ppm coordinated in monotopic fashion to

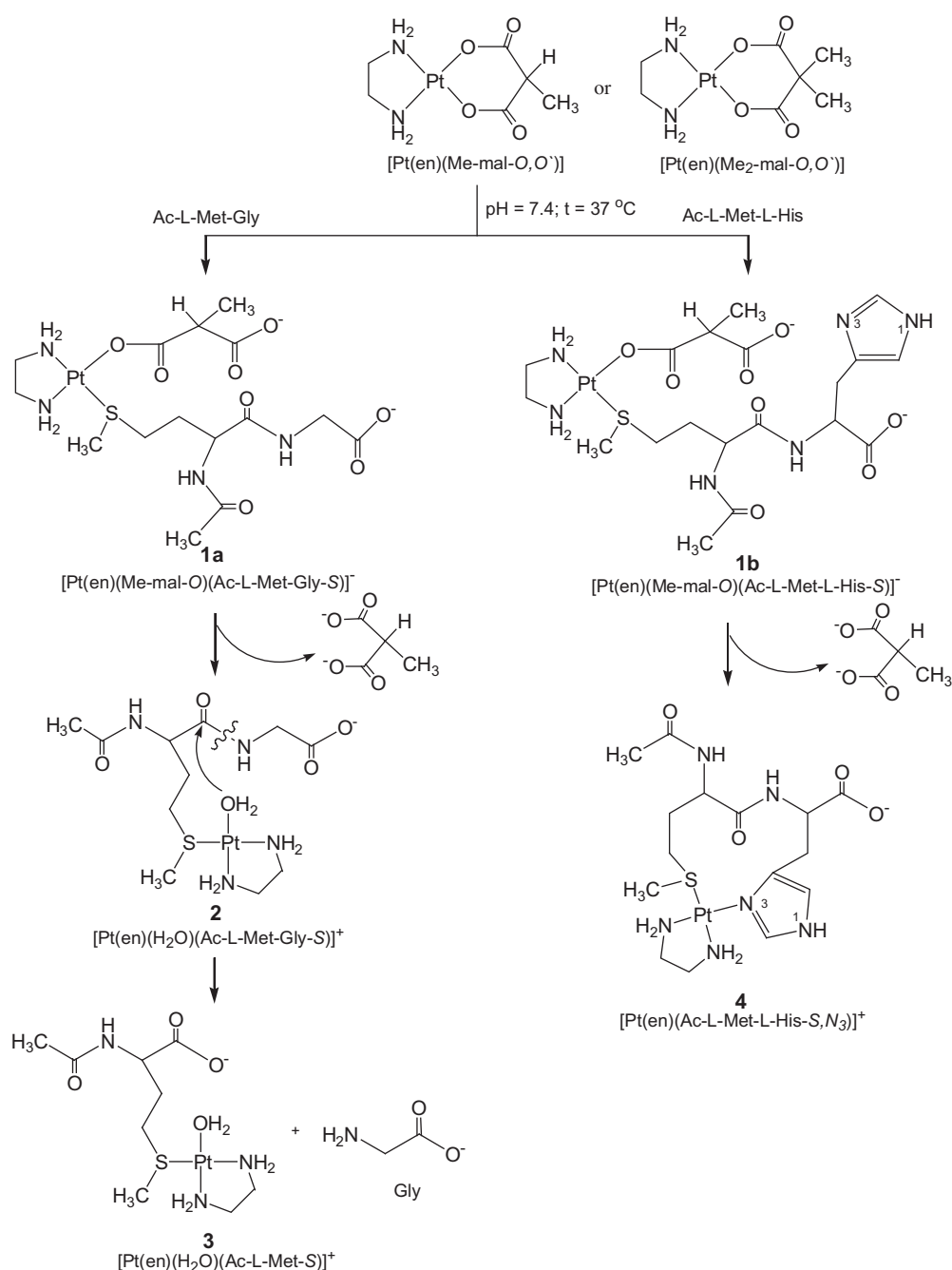


Fig. 1. Different pathways of the reaction of the Ac-L-Met-Gly and Ac-L-Met-L-His-type peptides with [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] complexes. The corresponding Pt(II) complex and peptide were mixed in a 1:1 M ratio and all reactions performed at pH 7.40 and at 37 °C in 50 mM phosphate buffer in D₂O.

the platinum(II) and those for these protons of the free Me-mal and Me₂-mal ligands at 1.31 and 1.34 ppm, respectively.

3. Results and discussion

The reactions of [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] complexes (en is ethylenediamine, Me-mal and Me₂-mal are bidentate coordinated anions of 2-methylmalonic and 2,2-dimethylmalonic acids, respectively, with *N*-acetylated Ac-L-Met-Gly and Ac-L-Met-L-His-type peptides (Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ and Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly) were studied by ¹H NMR spectroscopy. All reactions were performed with equimolar

amounts of the platinum(II) complex and peptide at the pH 7.40 in 50 mM phosphate buffer in D₂O and at 37 °C. Under these experimental conditions ethylenediamine ligand remains bound to the Pt(II) [33], while bidentate coordinated Me-mal and Me₂-mal ligands in the platinum(II) complexes undergo substitution during their reactions with peptides. In the reactions of [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] complexes with Ac-L-Met-Gly very slow hydrolytic cleavage of the Met-Gly amide bond was observed, while in the reactions between these Pt(II) complexes and peptides containing both L-methionine and L-histidine amino acids in the side chains no hydrolysis of these peptides was observed and only macrochelaate platinum(II)–peptide complexes formed as a final products. In all these reactions an intermediate Pt(II)–peptide

Table 1
Characteristic proton NMR chemical shifts for the reactions of [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] with Ac-L-Met-Gly dipeptide at pH 7.40 in 50 mM phosphate buffer in D₂O and at 37 °C.

Reactants/products	Characteristic ¹ H NMR chemical shifts (δ, ppm; J, Hz) ^a				
	α-CH-mal	CH ₃ -mal	(CH ₃) ₂ -mal	CH ₃ -Met	Gly-CH ₂
Ac-L-Met-Gly				2.11(s)	3.78 (s)
[Pt(en)(Me-mal-O,O')]	4.16 (q, J = 6.92)	1.37 (d, J = 6.96)			
[Pt(en)(Me ₂ -mal-O,O')]			1.77 (s)		
[Pt(en)(Me-mal-O)(Ac-L-Met-Gly-S)] [−] (1a)	3.29 (q, J = 7.02)	1.24 (d, J = 7.14)		2.38 (s)	3.78 (s)
[Pt(en)(Me ₂ -mal-O)(Ac-L-Met-Gly-S)] [−] (1a)			1.27 (s)	2.38 (s)	3.78 (s)
[Pt(en)(H ₂ O)(Ac-L-Met-Gly-S)] ⁺ (2)				2.38 (s)	3.78 (s)
Free Me-mal		1.31(d)			
Free Me ₂ -mal			1.34 (s)		
Free Gly					3.56 (s)

^a In all complexes the multiplet for methylene protons of en is centered at 2.70 ppm.

Table 2
Observed rate constants for the reactions of [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] complexes with Ac-L-Met-Gly and Ac-L-Met-L-His dipeptides. All rate constants were obtained from ¹H NMR measurements at pH 7.40 in 50 mM phosphatate buffer in D₂O and at 37 °C.

Reactions	Second-order rate constants for formation of the ring-opened complexes 1a (Ac-L-Met-Gly) and 1b (Ac-L-Met-L-His) 10 ³ k ₂ /M ^{−1} s ^{−1}	First-order rate constants for conversion of 1a into 2 (Ac-L-Met-Gly) and 1b into 4 (Ac-L-Met-L-His) 10 ⁶ k/s ^{−1}
[Pt(en)(Me-mal-O,O')] + Ac-L-Met-Gly	(26.20 ± 0.62)	(3.02 ± 0.02)
[Pt(en)(Me ₂ -mal-O,O')] + Ac-L-Met-Gly	(4.05 ± 0.04)	(1.45 ± 0.02)
[Pt(en)(Me-mal-O,O')] + Ac-L-Met-L-His	(11.95 ± 0.31)	(5.22 ± 0.03)
[Pt(en)(Me ₂ -mal-O,O')] + Ac-L-Met-L-His	(6.19 ± 0.02)	(5.98 ± 0.03)

products containing ring-opened Me-mal and Me₂-mal rings were detected in solution.

3.1. Reactions of Pt(II) complexes with Ac-L-Met-Gly

The schematic presentation of the reactions of Ac-L-Met-Gly dipeptide with two platinum(II) complexes, [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')], is given in Fig. 1. When an equimolar amount of the Pt(II) complex was incubated with Ac-L-Met-Gly dipeptide under the above-mentioned experimental conditions, the first product observed in solution after 15 min of the reaction was an intermediate complex **1a** (Fig. 1). The formation of this intermediate product containing monodentate coordinated Me-mal (or Me₂-mal) ligand was evidenced in the ¹H NMR spectrum by the simultaneous decline of the resonances at 2.11 ppm, arising from the S-methyl protons of free Ac-L-Met-Gly, and growth of the resonance at 2.38 ppm, corresponding to these protons for the dipeptide coordinated to Pt(II) through the sulfur atom (Table 1). Additionally, formation of the intermediate complex **1a** for the reaction of Ac-L-Met-Gly dipeptide with [Pt(en)(Me-mal-O,O')] was followed from difference in the chemical shifts of the resonances for α-CH at 4.16 (q, J = 6.92) and CH₃ malonate protons at 1.37 ppm (d, J = 6.96 Hz) for [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and those for these protons of **1a** at 3.29 (q, J = 7.02) and 1.24 ppm (d, J = 7.14 Hz), respectively (Fig. 1 and Table 1). These chemical shifts are in accordance with those previously reported for the ring-opened Me-mal-O adducts containing monodentate coordinated thioethers in the reactions of the [Pt(en)(Me-mal-O,O')] complex with Ac-L-Met and Met-Gly [33]. Formation of **1a** in the reaction

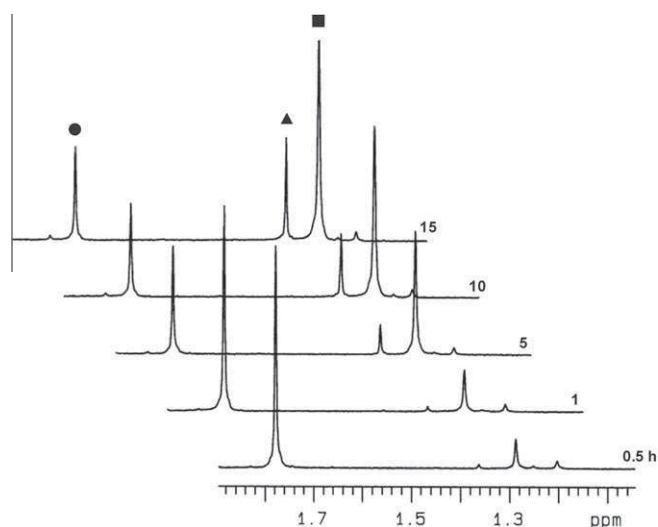


Fig. 2. Parts of the ¹H NMR spectra recorded during the reaction of [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] with an equimolar amount of Ac-L-Met-Gly dipeptide as a function of time at pH 7.40 and at 37 °C in 50 mM phosphate buffer in D₂O with TSP as the internal standard. The resonances assigned as (■), (▲) and (●) correspond to the methyl malonate protons of the [Pt(en)(Me₂-mal-O)(Ac-L-Met-Gly-S)][−], free Me₂-mal and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')], respectively.

of Ac-L-Met-Gly with [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] was observed in ¹H NMR spectrum from difference in the chemical shifts of the singlet for the methyl Me₂-mal protons at 1.77 ppm for [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] and that for these protons at 1.27 ppm due to the complex **1a** (Fig. 1 and Table 1). However, in the present study the formation of the ring-opened complex in the reaction of [Pt(en)(mal-O,O')] (mal is bidentate coordinated anion of malonic acid) with Ac-L-Met-Gly could not be followed by ¹H NMR spectroscopy based on the α-CH₂ protons of malonate anion because of the rapid exchange of its methylene protons with deuterium from D₂O solvent. Also, this exchange occurred when pure malonic acid was dissolved in D₂O. The coordination of malonic acid to Pt(II) complex additionally activates H/D exchange [44,45].

The formation of the ring-opened adducts **1a** in the above investigated reactions was followed during time and second-order rate constant for the reaction of [Pt(en)(Me-mal-O,O')] with Ac-L-Met-Gly, k₂ = (26.20 ± 0.62) × 10^{−3} M^{−1} s^{−1}, was six times larger from that for the reaction of this peptide with analogue [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] complex, k₂ = (4.05 ± 0.04) × 10^{−3} M^{−1} s^{−1} (Table 2).

It was found that complex **1a** under the above mentioned experimental conditions was converted into the hydrolytically active complex **2** (Fig. 1). This conversion proceeds through the

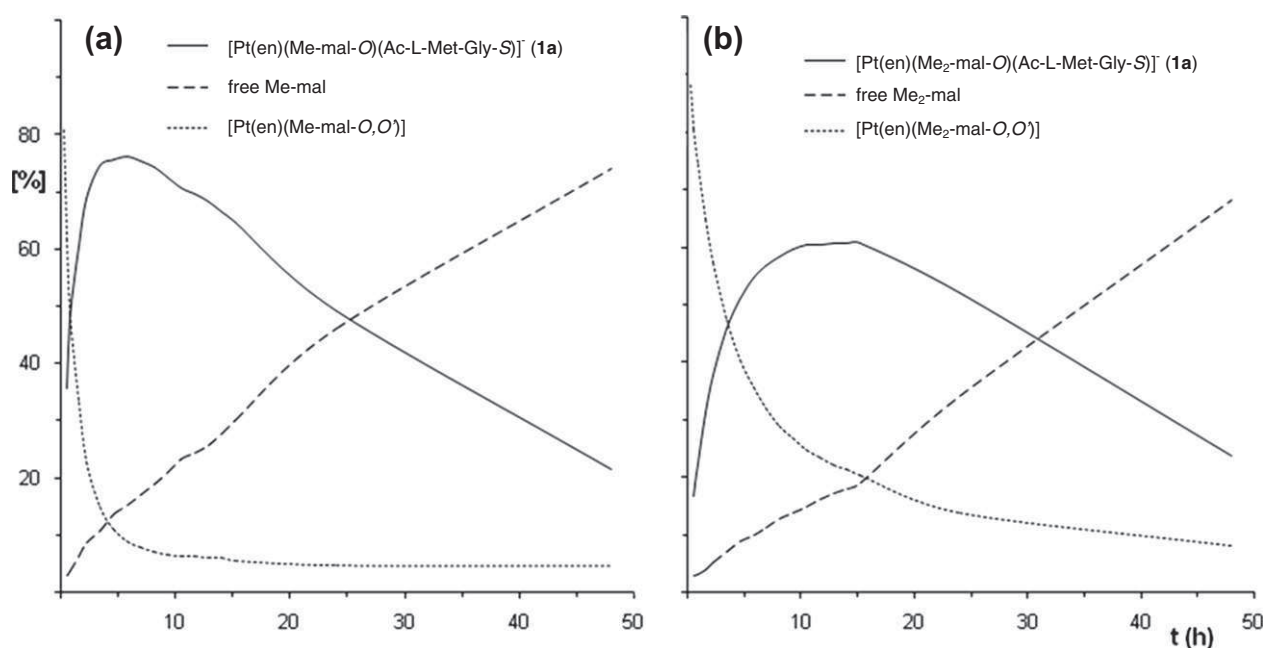


Fig. 3. Time dependence of relative percentages of Me-mal and Me₂-mal species (based on the CH₃ malonate protons) for the reactions of [Pt(en)(Me-mal-O,O')] (a) and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] (b) complexes with an equimolar amount of Ac-L-Met-Gly dipeptide at pH 7.40 in 50 mM phosphate buffer in D₂O and at 37 °C.

detachment of the monodentate coordinated Me-mal and Me₂-mal ligands from Pt(II) and their replacement by water molecules. The conversion of **1a** into **2** is evident in the ¹H NMR spectrum by the simultaneous decline of the doublet at 1.24 and singlet at 1.27 ppm due to the methyl protons of monodentate coordinated Me-mal and Me₂-mal ligands, respectively, and the growth of these resonances at 1.31 and 1.34 ppm for the free Me-mal and Me₂-mal ligands, respectively (Table 1). The parts of ¹H NMR spectra measured during time for the reaction between [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] and Ac-L-Met-Gly are presented in Fig. 2. The plots illustrating the changes in concentration [%] of **1a** and free Me-mal and Me₂-mal ligands during 48 h are presented in Fig. 3. From this figure it can be seen that concentration of **1a** was increased in the first 5 h for the Me-mal and 15 h for the Me₂-mal ring opened complex. After this time the concentrations of these ring-opened adducts were decreased finally being about 25% after 48 h. The first-order rate constants for the conversion of **1a** into **2** were determined by ¹H NMR measurements, $k = (3.02 \pm 0.02) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ for Me-mal and $k = (1.45 \pm 0.02) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ for Me₂-mal (see Section 2 and Table 2).

We found that complex **2**, obtained after displacement of monodentate coordinated Me-mal and Me₂-mal ligands from complex **1a** by water molecule, promote the regioselective cleavage of the Met-Gly amide bond in the Ac-L-Met-Gly dipeptide (Fig. 1). This hydrolytic reaction is very slow and it could be followed successfully by ¹H NMR spectroscopy. The resonance at 3.78 ppm corresponding to the glycine protons of the non-hydrolyzed peptide decreased while that at 3.56 ppm for free glycine increased (Table 1). Upon addition of glycine to the reaction mixture, its resonance was enhanced. The amount of hydrolyzed Met-Gly amide bond in the complex **2** was determined by integration of the resonance for the glycine protons in the non-hydrolyzed peptide and that for the free glycine. In this study we compared the catalytic abilities in the cleavage of the Ac-L-Met-Gly dipeptide for Pt(II) complexes with malonate-type ligands, [Pt(en)(mal-O,O')], [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')], with those for previously investigated [Pt(en)Cl₂] and [Pt(en)(cbdca-O,O')] complexes [31] (Fig. 4). From this figure it can be concluded that the catalytic abilities of these Pt(II) complexes increase in the

following order: [Pt(en)(cbdca-O,O')] < [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] < [Pt(en)(Me-mal-O,O')] < [Pt(en)(mal-O,O')] < [Pt(en)Cl₂]. This finding can be attributed to the steric influence of the leaving ligands on the catalytic properties of the Pt(II) complexes indicating that cbdca ligand is more sterically demanding in comparison with bidentate malonate-type or monodentate chlorido ligands. This is clearly demonstrated in the reaction of Ac-L-Met-Gly dipeptide with three malonate Pt(II) complexes which differ in the number of the methyl groups attached on the α-malonate carbon atom. The rate of the cleavage of this dipeptide was decreased in the following order: mal > Me-mal > Me₂-mal (see inserted chart in Fig. 4). This undoubtedly confirms that inhibition of the hydrolytic

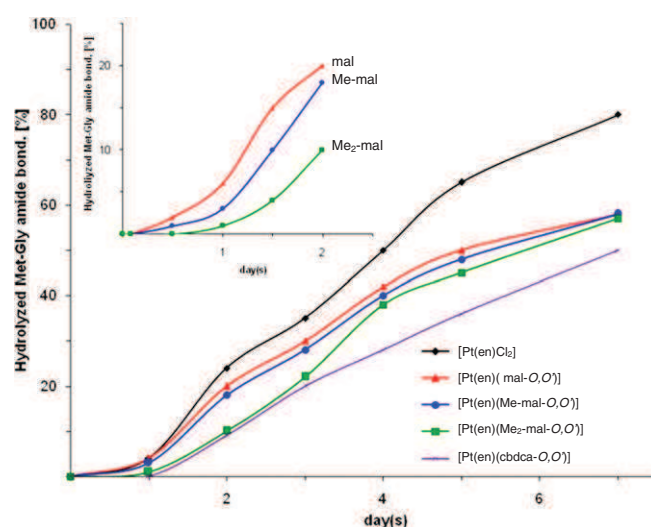


Fig. 4. The time dependence of the hydrolytic cleavage of the Met-Gly amide bond in the Ac-L-Met-Gly dipeptide with different Pt(II) complexes. All reactions were realized at 37 °C with equimolar amounts of the Pt(II) complex and the dipeptide at pH 7.40 in 50 mM phosphate buffer. The inserted figure shows the hydrolysis of the Met-Gly bond in the presence of three malonato-Pt(II)-type complexes during 2 days.

Table 3
Characteristic ^1H NMR chemical shifts (δ , ppm) for the Ac-L-Met-L-His-type peptides and corresponding macrochelate Pt(II)-peptide complexes **4** formed in the reaction with $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]]$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]]$ complexes at pH 7.40 and at 37 °C in D_2O . The chemical shifts of monodentate coordinated Me-mal and $\text{Me}_2\text{-mal}$ ligands of the ring-opened complexes **1b** are identical with those for complex **1a** shown in Table 1.

Peptide/macrochelate Pt(II)-peptide complex 4	Imidazole protons		S-CH ₃	Gly1CH ₂	Gly2CH ₂	Gly3CH ₂
	C2H	C5H				
Ac-L-Met-L-His	8.44	7.20	2.10			
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-L-His-S},\text{N3})]^+$	8.13	7.08	2.58,2.60			
Ac-L-Met-Gly1-L-His-Gly2-NH ₂	8.31	7.19	2.11	3.93	3.93	
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly1-L-His-Gly-NH}_2\text{-S},\text{N3})]^+$	8.09	7.02, 6.97	2.57	3.98	3.93	
Ac-L-Met-Gly1-Gly2-L-His-Gly3	8.61	7.34	2.11	4.04	3.96	3.80
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly1-Gly2-L-His-Gly-S},\text{N3})]^+$	8.07 7.09	7.09	2.59	4.00	3.94	3.81

reaction was effected by the methyl group in the leaving malonate ligand. The same conclusion can be drawn from our kinetic data presented in Table 2. From this table we can see that replacement of monodentate coordinated $\text{Me}_2\text{-mal}$ ligand by water molecule in the ring-opened complex **1a** (Fig. 1) was two times slower in respect to the corresponding Me-mal complex, both resulting in the formation of the hydrolytically active complex **2**. Difference in the replacement of these two ligands can be correlated with different stability of their ring-opened complexes.

3.2. Reactions of Pt(II) complexes with Ac-L-Met-L-His-type peptides

In the second part of this study we used ^1H NMR spectroscopy to investigate the reactions of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]]$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]]$ complexes with peptides containing both L-methionine and L-histidine amino acids in the side chains, namely Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ and Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly (Ac-L-Met-L-His-type peptides). When an equimolar amount of Pt(II) complex was incubated with the corresponding Ac-L-Met-L-His-type peptide under the above mentioned experimental conditions only one Pt(II)-peptide complex in these reactions was observed in solution as a final product after 48 h (see Fig. 1, complex **4**). As it was shown in Fig. 1 complex **4** has bidentate coordinated peptide via the N3 atom of the imidazole ring and methionine sulfur atom. The complex **4** was showed as very stable product during time and no hydrolysis of amide bonds in the above investigated peptides had been observed during two weeks. The formation of this macrochelate complex proceeds in two steps. The first step of this reaction is monodentate coordination of Ac-L-Met-L-His-type peptide to the Pt(II) through the methionine sulfur atom. This reaction yields to the formation of the ring-opened complex **1b** which was evidenced in the ^1H NMR spectrum from difference in the chemical shifts of the methyl protons for the free at 2.10–2.11 and these protons for the Pt(II)-sulfur bound peptide at 2.57–2.60 ppm after 15 min (Table 3). These chemical shifts are in accordance with those previously reported for the reactions of Pt(II) complexes with different methionine-containing peptides [10,30]. The monodentate coordination of Ac-L-Met-L-His-type peptides to the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]]$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]]$ caused the opening of the malonate rings in these complexes. This ring-opening process can be followed in the ^1H NMR spectrum from difference in the chemical shifts of the methyl malonate protons for bidentate and those for these protons of monodentate bound Me-mal and $\text{Me}_2\text{-mal}$ ligands. These chemical shifts are almost identical with those for the reactions of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]]$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]]$ complexes with Ac-L-Met-Gly dipeptide (see previous section and Table 1). The second-order rate constants for the formation of **1b** were determined from ^1H NMR measurements (Table 2). The doublet at 1.37 and singlet at 1.77 ppm due to the methyl malonate protons of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]]$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]]$ complexes, respectively, were decreased during time and new

resonances at 1.24 and at 1.27 ppm for these protons in the ring-opened $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O})(\text{Ac-L-Met-L-His-S})]$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O})(\text{Ac-L-Met-L-His-S})]$ complexes, respectively, had been appeared. The concentrations of the starting Pt(II) complex and corresponding ring-opened species were determined during time by integration of the above-mentioned resonances. The second-order rate constants for the reactions of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]]$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]]$ complexes with Ac-L-Met-L-His are similar with those for the reactions between these Pt(II) complexes and Ac-L-Met-Gly dipeptide, $k_2 = (11.95 \pm 0.31) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for Me-mal and $k_2 = (6.19 \pm 0.02) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for $\text{Me}_2\text{-mal}$ (Table 2).

The second step of the reaction between Pt(II) complexes and Ac-L-Met-L-His-type peptides is conversion of **1b** into **4** (Fig. 1). This conversion proceeds through the intramolecular replacement of monodentate coordinated Me-mal and $\text{Me}_2\text{-mal}$ ligands from **1b** with the N3 imidazole nitrogen atom of the histidine residue. The conversion of **1b** into **4** is evident in the ^1H NMR spectrum by the simultaneous decline of the resonances due to the methyl protons of the Me-mal and $\text{Me}_2\text{-mal}$ coordinated in monotopic fashion to the Pt(II) and growth of those for these protons of free Me-mal and $\text{Me}_2\text{-mal}$ ligands. The chemical shifts for these resonances are almost identical with those observed for the conversion of **1a** into **2** in the reaction of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]]$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]]$ complexes with Ac-L-Met-Gly dipeptide (Table 1). Additionally, the conversion of **1b** into **4** can be followed in the ^1H NMR spectrum from difference in the chemical shifts of the C2H and C5H imidazole protons for the free and N3-bound histidine side chain to Pt(II) (Table 3). From Table 3 it can be seen that the C2H and C5H resonances are upfield shifted after peptide coordination through the N3 nitrogen atom of the imidazole to Pt(II). The higher field chemical shifts for the C2H ($\Delta\delta = 0.22\text{--}0.31$ ppm) with respect to the C5H proton ($\Delta\delta = 0.12\text{--}0.17$ ppm) can be attributed to the fact that this proton is closer to the N3 binding center [46–48]. The first-order rate constants for conversion of **1b** into **4**, $k = (5.22 \pm 0.03) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ for Me-mal and $k = (5.98 \pm 0.03) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ for $\text{Me}_2\text{-mal}$, are larger from those for the conversion of **1a** into **2**, $k = (3.02 \pm 0.02) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ for Me-mal and $k = (1.45 \pm 0.02) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ for $\text{Me}_2\text{-mal}$ (Table 2). This can be attributed to the fact that N3 nitrogen atom of imidazole ring from Ac-L-Met-L-His dipeptide is better nucleophile than water molecule in the reaction with Ac-L-Met-Gly dipeptide. We found that the same S,N3-coordination mode of the Pt(II) occurred in the reactions with Ac-L-Met-L-His, Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ and Ac-L-Met-Gly-Gly-L-His-Gly peptides. Also, no influence of Gly residue (one or two) inserted between Met and His anchoring amino acids on the formation rate of complex **4** was observed.

4. Conclusions

From the present investigation, it can be stated that the reaction of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me-mal-O},\text{O}')]]$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Me}_2\text{-mal-O},\text{O}')]]$ complexes with N-acetylated Ac-L-Met-Gly and Ac-L-Met-L-His-type peptides

under physiological conditions (pH 7.40 and 37 °C) primarily proceeds with the formation of the ring-opened malonate adducts containing monodentate methionine bound peptide to the Pt(II). These ring-opened species are present in solution for more than 48 h and during that time the monodentate coordinated malonate ligand (Me-mal or Me₂-mal) has been slowly replaced intermolecularly by water for Ac-L-Met-Gly or intramolecularly by the N3 nitrogen atom from the histidine residue for Ac-L-Met-L-His-type peptides. Replacement of the Me-mal and Me₂-mal ligands by water molecules leads to the formation of the hydrolytically active aqua Pt(II)–peptide complex which further promotes slow hydrolysis of the Met-Gly amide bond in the Ac-L-Met-Gly dipeptide. However, intramolecular replacement of these malonate anions by the histidine residue of Ac-L-Met-L-His-type peptides leads to the formation of very stable and hydrolytically inactive macrochelate Pt(II)–peptide complex. The previous results confirming that the ring-opened carboplatin adducts containing monodentate thioethers were also observed in the reactions of the anticancer drug carboplatin with a variety of sulfur-containing amino acids [49,50] together with those for the presently investigated reactions of carboplatin analogues [Pt(en)(Me-mal-O,O')] and [Pt(en)(Me₂-mal-O,O')] with methionine-containing peptides contribute to the current hypothesis that the ring-opened adducts of chelated dicarboxylate platinum anticancer complexes with methionine derivatives could play important role in their mechanism of action.

Acknowledgements

This work was funded in part by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. 172036).

References

- [1] L.D. Pettit, M. Bezer, *Coord. Chem. Rev.* 61 (1985) 97.
- [2] T.G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.* 166 (1997) 313.
- [3] H. Kozłowski, L.D. Pettit, *Stud. Inorg. Chem.* 11 (1991) 530.
- [4] P. Tsvieriotis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* 190–192 (1999) 171.
- [5] E.L.M. Lempers, J. Reedijk, *Adv. Inorg. Chem.* 37 (1991) 175.
- [6] F. Schneider, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 17 (1978) 583.
- [7] R.J. Sundberg, R.B. Martin, *Chem. Rev.* 74 (1974) 471.
- [8] A.S. Brill, *Transition Metals in Biochemistry*, Springer-Verlag, New York, 1977 (Chapter 2).
- [9] I.E. Burgeson, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 4299.
- [10] N.M. Milović, N.M. Kostić, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems, Palladium(II) and Platinum(II) Complexes as Synthetic Peptidases*, vol. XXXVIII, Marcel Dekker Inc., 2001, p. 145.
- [11] S. Rajković, M.D. Živković, C. Kállay, I. Sóvágó, M.I. Djuran, *Dalton Trans.* (2009) 8370.
- [12] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 3994.
- [13] L. Zhu, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4566.
- [14] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta* 217 (1994) 21.
- [15] E.N. Korneeva, M.V. Ovchinnikov, N.M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta* 243 (1996) 9.
- [16] D.P. Ašanin, S. Rajković, D. Molnar-Gabor, M.I. Djuran, *Monatsh. Chem.* 135 (2004) 1445.
- [17] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 51.
- [18] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5946.
- [19] S.U. Milinković, T.N. Parac, M.I. Djuran, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 2771.
- [20] X. Chen, L. Zhu, H. Yan, X. You, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1996) 2653.
- [21] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Monatsh. Chem.* 130 (1999) 613.
- [22] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 18 (1999) 3611.
- [23] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 19 (2000) 959.
- [24] Z.D. Petrović, M.I. Djuran, F.W. Heinemann, S. Rajković, S.R. Trifunović, *Bioorg. Chem.* 34 (2006) 225.
- [25] M.D. Živković, S. Rajković, U. Rychlewska, B. Warzajtis, M.I. Djuran, *Polyhedron* 26 (2007) 1541.
- [26] A.F.M. Siebert, W.S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 385.
- [27] M. Hahn, M. Kleine, W.S. Sheldrick, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 556.
- [28] S. Manka, F. Becker, O. Hohage, W.S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1947.
- [29] O. Hohage, W.S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1506.
- [30] O. Hohage, S. Manka, W.S. Sheldrick, *Inorg. Chim. Acta* 362 (2009) 953.
- [31] M.D. Živković, D.P. Ašanin, S. Rajković, M.I. Djuran, *Polyhedron* 30 (2011) 947.
- [32] K.J. Barnham, U. Frey, P.deS. Murdoch, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 11175.
- [33] Z. Guo, T.W. Hambley, P. del Socorro Murdoch, P.J. Sadler, U. Frey, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 469.
- [34] (a) M.J. Cleare, *The Proceedings of the Third International Symposium on Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*, Leland Fikes Foundation Press, Dallas, 1977, p. 1;
(b) J.M. Hill, E. Loeb, A.S. Pardue, A. Khan, N.O. Hill, J.J. King, R.W. Hill, *The Proceedings of the Third International Symposium on Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*, Leland Fikes Foundation Press, Dallas, 1977, p. 681.
- [35] R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149.
- [36] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C.J. Logan, R.C. Sheppard, B.J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1978) 537.
- [37] H. Hohmann, R. van Eldik, *Inorg. Chim. Acta* 174 (1990) 87.
- [38] A. Caubet, V. Moreno, E. Molins, C. Miravittles, *J. Inorg. Biochem.* 48 (1992) 135.
- [39] N. Summa, T. Soldatović, L. Dahlenburg, Ž.D. Bugarčić, R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 461.
- [40] A. Pasini, C. Caldirola, *Inorg. Chim. Acta* 151 (1988) 19.
- [41] G. Mahal, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 4165.
- [42] F.D. Rochon, G. Massarweh, *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 4095.
- [43] K.J. Laidler, *Chemical Kinetics*, third ed., Harper & Row, New York, 1987, p. 22.
- [44] E. Monti, M. Gariboldi, A. Maiocchi, E. Marengo, C. Cassino, E. Gabano, D. Osella, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 857.
- [45] A. Pasini, G. D'Alfonso, C. Manzotti, M. Moret, S. Spinelli, M. Valsecchi, *Inorg. Chem.* 33 (1994) 4140.
- [46] T.G. Appleton, F.J. Pesch, M. Wienken, S. Menzer, B. Lippert, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 4410.
- [47] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Aust. J. Chem.* 53 (2000) 645.
- [48] M.D. Živković, S. Rajković, M.I. Djuran, *Bioorg. Chem.* 36 (2008) 161.
- [49] U. Frey, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* 32 (1993) 1333.
- [50] K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. del Socorro Murdoch, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1065.



Crystallographic evidence of anion $\cdots\pi$ interactions in the pyrazine bridged $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex and a comparative study of the catalytic ability of mononuclear and binuclear platinum(II) complexes in the hydrolysis of *N*-acetylated *L*-methionylglycine

Darko P. Ašanin^a, Marija D. Živković^a, Snežana Rajković^a, Beata Warżajtis^b, Urszula Rychlewska^{b,*}, Miloš I. Djuran^{a,*}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, P. O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 August 2012

Accepted 21 December 2012

Available online 11 January 2013

Keywords:

Binuclear platinum(II) complex

L-methionylglycine

Proton NMR spectroscopy

Hydrolysis

Anion $\cdots\pi$ interactions

ABSTRACT

This paper reports on the synthesis and the X-ray characteristics of the binuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex (en is ethylenediamine, acting as a bidentate ligand; pz is a bridging pyrazine ligand). This complex was converted into the corresponding aqua complex, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, and ^1H NMR spectroscopy was applied for a comparison of its catalytic activities in the hydrolysis of *N*-acetylated *L*-methionylglycine (Ac-*L*-Met-Gly) dipeptide with those for the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex. The peptide and the corresponding platinum(II) complex were reacted in different molar ratios and all reactions were performed at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ in D_2O solvent at 37°C . The course of these hydrolytic reactions is discussed and the difference in the catalytic ability between the mononuclear and binuclear Pt(II) complexes was correlated with the presence of the different hydrolytically active platinum(II)-peptide complexes formed during their reactions with the Ac-*L*-Met-Gly dipeptide.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pyrazine, a weak base, acts as a monodentate or bridging bidentate ligand in transition metal chemistry. As a bridging bidentate ligand it commonly exhibits a simple and controllable coordination mode and possesses small steric hindrance, therefore it has been recently utilized as a building unit for molecular architectures with transition metals [1–3]. Another interesting property of this ligand is modification of its basicity as a consequence of coordination to transition-metal fragments [4]. Combined together, the two properties make the pyrazine ligand a good alternative to triazine in studies on anion $\cdots\pi$ interactions in metal complexes and their utilization for building new molecular architectures. The involvement of pyrazine and oxo anions in anion $\cdots\pi$ interactions has already been reported [5,6]. In this paper we demonstrate the presence of such interactions between chloride and pyrazine units.

The term anion $\cdots\pi$ interaction to describe an attractive and non-covalent contact geometry, derived from quantum chemistry

calculations, in which an anion is placed above the center of an aromatic ring appeared in the literature ten years ago and initiated a continuous discussion concerning its presence and structure determining role [7,8]. On the basis of the results derived from theoretical calculations and searches of the Cambridge Crystallographic Database (CSD), the authors have demonstrated the existence of anion $\cdots\pi$ interactions involving mainly electron deficient aromatic systems, although the involvement of non-electron-deficient aromatic rings was also considered as possible whenever the aromatic ring was simultaneously interacting with a cation [9]. The existence of anion $\cdots\pi$ interactions in metal complexes stemming from encapsulation of a chloride anion by four pyridine rings has been noted in 2004 [10]. Notably, the authors pointed out that the observed chloride \cdots pyridine anion $\cdots\pi$ interactions were favored because the pyridine rings are coordinated to copper ions, which enhances their electron-poor character. Following this report, other papers demonstrating the enhancing role of metal coordination in anion $\cdots\pi$ interactions have appeared [6,11,12]. To date, there are many reports on this subject due to the various possible applications of these interactions in supramolecular chemistry, including design of anion receptors and transporters across bilayer membranes [13,14]. The most recent perspective on the subject has been published by Reedijk and co-workers [15]. Notably, anion $\cdots\pi$ interactions have been reported

* Corresponding authors. Tel.: +48 61 8291 268; fax: +48 61 865 8008 (U. Rychlewska), tel.: +381 34 300 251; fax: +381 34 335040 (M.I. Djuran).

E-mail addresses: urszular@amu.edu.pl (U. Rychlewska), djuran@kg.ac.rs (M.I. Djuran).

as being persistent in solution and in the gas phase [16], and a review on the studies of these interactions in solution has appeared only very recently [17].

From the other side, recent studies showed that the thiolate-bridged $(\text{Me}_4\text{N})_2[\text{Pd}_2(\mu\text{-SPh})_2\text{Cl}_4]$ complex in the reactions with different methionine-containing peptides of the type Ac-L-Met-X (X is Gly, Val, Phe or Ala) was a very effective hydrolytic reagent in the cleavage of these dipeptides in non-aqueous solvents [18]. An important advantage of dimerization is the possibility of cooperation between the metals, as was shown for hydrolysis of DNA, RNA and their models catalyzed by polynuclear metal complexes and metalloenzymes [19–24]. The above mentioned findings suggested that polynuclear platinum(II) complexes could also be good reagents for amide bond hydrolysis in reactions with methionine-containing peptides.

In the present study we have synthesized and structurally characterized the new pz-bridged binuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex. This complex was converted into the corresponding aqua complex, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, and ^1H NMR spectroscopy was applied for comparison of its catalytic activity in the hydrolysis of *N*-acetylated L-methionylglycine (Ac-L-Met-Gly) dipeptide with that of the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex. All the reactions were investigated at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ and at 37°C in D_2O solution.

2. Experimental

2.1. Materials

Distilled water was demineralized and purified to a resistance greater than $10\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$. The compounds D_2O , DNO_3 , NaOD , ethylenediamine (en), pyrazine (or 1,4-diazine), pz and $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ were obtained from Aldrich Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The dipeptide L-methionylglycine (L-Met-Gly) was obtained from Sigma Chemical Co. The terminal amino group in this peptide was acetylated by a standard method [25]. The $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ complex was synthesized according to a procedure published in the literature [26]. The purity of the complex was checked by elemental microanalyses and NMR (^1H and ^{13}C) spectroscopy.

2.2. Preparation of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{dmf})\text{Cl}]\text{NO}_3$

The $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ complex was converted into the corresponding monodimethylformamide (dmf) complex $[\text{Pt}(\text{en})(\text{dmf})\text{Cl}]\text{NO}_3$ by treatment with 0.98 equivalents of AgNO_3 , according to a previously published method [27]. To a solution of 55.3 mg (0.325 mmol) of AgNO_3 in 5 cm^3 of dmf was added a suspension of 108.3 mg (0.332 mmol) of $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ in 10 cm^3 of dmf. The mixture was stirred overnight at room temperature in the dark. The precipitated AgCl was removed by filtration and the resulting pale yellow dmf solution of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{dmf})\text{Cl}]\text{NO}_3$ was used as the starting material for the preparation of the required pyrazine-bridged binuclear platinum(II) complex, $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$.

2.3. Preparation of the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex

A dmf solution of the pyrazine ligand (pz) (13.29 mg, 0.166 mmol) was added dropwise to a solution of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{dmf})\text{Cl}]\text{NO}_3$. The mixture was stirred at room temperature in the dark for 3 h. The solvent was then rotary evaporated and the residue was washed with ether. The crude product was dissolved in a minimal amount of 0.5 mol/dm^3 LiCl aqueous solution. The obtained solution was left overnight in the dark. The pale-yellow precipitate of $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ was removed by filtration, washed with methanol and then ether, and air-dried. Yield 48.61 mg (40%). *Anal.* Calc. for $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ (FW = 732.25): C,

13.12; H, 2.75; N, 11.48. Found: C, 13.16; H, 2.98; N, 11.19%. NMR (^1H and ^{13}C) characterization (D_2O , 200 MHz). ^1H NMR (δ , ppm): 2.68–2.79 (m, 4CH₂, en), 9.03 (s, 4CH, pz); ^{13}C NMR (δ , ppm): 52.34 (4CH₂, en), 153.46 (C2, C3, C4 and C5, pz).

2.4. Preparation of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$

The $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complexes were converted into the corresponding aqua complexes by treatment with 1.98 and 3.98 equivalents of AgNO_3 , respectively, according to a previously published method [28]. In each case, the formed solid AgCl was removed by filtration in the dark, and the fresh solutions of the aqua complexes were kept in a refrigerator and used in subsequent experiments.

2.5. Analyses

Elemental microanalyses for carbon, hydrogen and nitrogen were performed by the Microanalytical Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Belgrade.

2.6. pH Measurements

All pH measurements were realized at ambient temperature using an Iskra MA 5704 pH meter calibrated with Fischer certified buffer solutions of pH 4.00 and 7.00. The results were not corrected for the deuterium isotope effect.

2.7. ^1H NMR measurements

The ^1H NMR spectra of D_2O solutions containing TSP (sodium trimethylsilylpropane-3-sulfonate) as the internal reference were recorded with a Varian Gemini 2000 spectrometer (200 MHz). Fresh solutions of the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complexes and Ac-L-Met-Gly were prepared separately (the initial concentration of each reactant was 40 mM) and then mixed in an 5 mm NMR tube, and spectra were recorded at appropriate time intervals. All reactions were performed at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ and at 37°C . The reactions between the platinum(II) complexes and Ac-L-Met-Gly dipeptide were investigated in the following molar ratios: $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}:\text{Ac-L-Met-Gly} = 1:1$, $2:1$ and $1:2$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}:\text{Ac-L-Met-Gly} = 1:1$ and $1:2$. The ^1H NMR spectra were acquired using the WATERGATE sequence for water suppression. Typical acquisition conditions were as follows: 90° pulses, 24000 data number points, 4 s acquisition time, 1 s relaxation delay, collection of 16–128 transients and final digital resolution of 0.18 Hz per point. All proton NMR spectra were processed using the Varian V NMR software (version 6.1, revision C). The chemical shifts are reported in ppm.

2.8. X-ray analysis of the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex

Diffraction data for the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex were measured with a Xcalibur kappa-geometry diffractometer using CrysAlisPro software [29] and monochromated $\text{Mo K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.7173\text{ \AA}$). Crystal data and experimental details are summarized in Table 1. The structure was solved by direct methods using SHELXS-86 [30] and refined by full-matrix least-squares calculations on F^2 with SHELXL-97 [30]. The intensity data were corrected for absorption effects [29]. Anisotropic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atomic positions. Hydrogen atoms attached to the carbon and nitrogen atoms were placed in calculated positions (methylene C–H = 0.97, aromatic C–H = 0.93 and amine N–H = 0.90 \AA). During the refinement isotropic displacement parameters for H-atoms were assigned 20% higher than the isotropic equivalent for the atom to which the H-atom was bonded. All

Table 1Crystal data for $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$.

<i>Crystal data</i>	
Chemical formula	$\text{C}_8\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{Pt}_2 \cdot 2(\text{Cl})$
M_r	732.28
Crystal system, space group	monoclinic, $P2_1/n$
T (K)	295
a (Å)	5.07703(9)
b (Å)	12.6594(2)
c (Å)	14.1839(2)
β (°)	97.7545(16)
V (Å ³)	903.29(2)
Z	2
Radiation type	Mo K α
μ (mm ^{−1})	16.06
Crystal size (mm)	0.20 × 0.20 × 0.10
<i>Data collection</i>	
Diffractometer	Xcalibur
Absorption correction	Multi-scan
$T_{\text{min}}, T_{\text{max}}$	0.405, 1.000
No. of measured, independent and observed [$I > 2\sigma(I)$] reflections	20103, 1588, 1545
R_{int}	0.026
$(\sin \theta/\lambda)_{\text{max}}$ (Å ^{−1})	0.595
<i>Refinement</i>	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.014, 0.035, 1.20
No. of reflections	1588
No. of parameters	91
No. of restraints	0
H-atom treatment	H-atom parameters constrained
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ^{−3})	0.65, −0.35

Table 2Selected geometrical parameters [Å] for $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$.

Pt1–N1	2.032(3)	Pt1–N3	2.018(3)
Pt1–N2	2.040(3)	Pt1–Cl1	2.2980(10)
N1–Pt1–N2	83.24(12)	N1–Pt1–Cl1	92.82(10)
N1–Pt1–N3	175.61(12)	N2–Pt1–Cl1	175.67(9)
N2–Pt1–N3	93.51(11)	N3–Pt1–Cl1	90.52(8)
Pt1–N1–C1–C2	−41.0(4)	C2–N2–Pt1–N1	13.2(2)
N1–C1–C2–N2	52.1(4)	N2–Pt1–N1–C1	15.7(3)
C1–C2–N2–Pt1	−38.5(4)		

H-atoms were refined as riding. SIEMENS [31] and MERCURY [32] computer graphics programs were used to prepare the drawings. Selected bond distances and angles are reported in Table 2. Hydrogen-bond parameters are listed in Table 3. Atomic coordinates, anisotropic displacement parameters and tables of all bond distances and angles have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre (Deposition No. CCDC 895153).

3. Results and discussion

3.1. X-ray structure of the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex

The molecular structure and labeling scheme are shown in Fig. 1 and selected bond distances and angles are listed in Table 2. X-ray analysis has unequivocally confirmed that the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex is a binuclear complex of Pt(II) bridged by the pyrazine ligand. In the crystal the complex is positioned on an inversion center and thus possesses C_i symmetry. Each platinum(II) atom exhibits an approximately square planar coordination, with one Pt–Cl bond, one Pt–N bond of pyrazine (pz), and two Pt–N bonds of the same chelating diamine (en) ligand. The Pt···Pt distance is 6.7890(3) Å, comparable with the mean value of 6.815(8) Å obtained from 17 observations for crystal structures

Table 3Hydrogen bond parameters for $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$.

$D\cdots H\cdots A$	$D\cdots H$ (Å)	$H\cdots A$ (Å)	$D\cdots A$ (Å)	$D\cdots H\cdots A$ (°)
N1–H1B···Cl2	0.90	2.44	3.291 (3)	156.9
N1–H1A···Cl2 ⁱ	0.90	2.41	3.230 (3)	150.9
N2–H2A···Cl2 ⁱⁱ	0.90	2.46	3.313 (3)	157.4
N2–H2B···Cl2 ⁱⁱⁱ	0.90	2.34	3.211 (3)	161.9

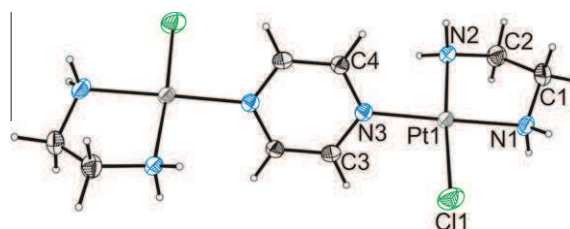


Fig. 1. Perspective view of the dinuclear complex cation $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}^{2+}$. Atomic displacement ellipsoids are drawn at the 40% probability level. The molecule possesses a center of symmetry, so only the asymmetric part of it has been labeled. The other half of the molecule is generated from the original coordinates by symmetry transformation $1 - x, 1 - y, -z$.

containing a discrete pyrazine-bridged Pt(II) dimer, deposited in the CSD [33]. The C_i molecular symmetry ensures the mutually *trans* orientation of the two Cl and (en) ligands. The atoms involved in the Pt(II) square coordination deviate less than 0.045 Å from the mean plane through the three nitrogens and Cl1. The Pt atom deviates from this plane by only 0.010(1) Å and from the pyrazine best plane by 0.084(6) Å. The Pt–N distances are in the expected range, with the Pt–N(diamine) distances only slightly longer (2.032(3) and 2.040(3) Å) than the Pt–N(pyrazine) distance of 2.018(3) Å, probably a consequence of the more negative charge on the pyrazine nitrogen as compared with the diamine nitrogens, and the Pt–Cl bond measures 2.298(3) Å. The N1–Pt–Cl(1), Cl1–Pt–N3 and N3–Pt–N2 angles are 92.8(1)°, 90.5(1)° and 93.5(1)°, respectively, while the N1–Pt–N2 angle in the five-membered chelate ring is only 83.2(1)°, a value similar to the mean N–Pt–N angle in other platinum complexes with ethylene diamine (mean value of 83.33(6)° for 207 observations in structures with $R < 5\%$ [33]). The coordinated pyrazine ring is oriented out of the Pt(II) square plane. The dihedral angle between the pyrazine-ring plane and the square plane around Pt(II) amounts to 58.4(1)°, and the Cl1–Pt–N3–C3 and Cl1–Pt–N3–C4 torsion angles are −60.6(3)° and 122.9(3)°, respectively. The diamine rings adopt the usual *twist* conformation (one λ and the other δ), with an approximate twofold axis passing through the C1–C2 bond (Cremer and Pople parameters calculated with PART included in the WinGX package [34] are 0.439(4) Å and −92.0(4)°).

3.2. Crystal packing of the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex

The complex cations form columns extending along the a -direction, with distances of 5.077(1) Å between Pt(II) ions and the pz rings (Fig. 2). The uncoordinated chloride anions (Cl2) are located above and below the pyrazine rings and are involved in anion– π interactions with these aromatic rings. Pyrazine rings are typically less electron poor than triazines, where the majority of anion– π interactions have been observed, but it has been demonstrated, both experimentally and theoretically, that coordination to the metal dramatically enhances the disposition of aromatic rings toward anion··· π binding [6,11,12,35]. Accordingly, in the investigated complex the pyrazine ring is activated by coordination to

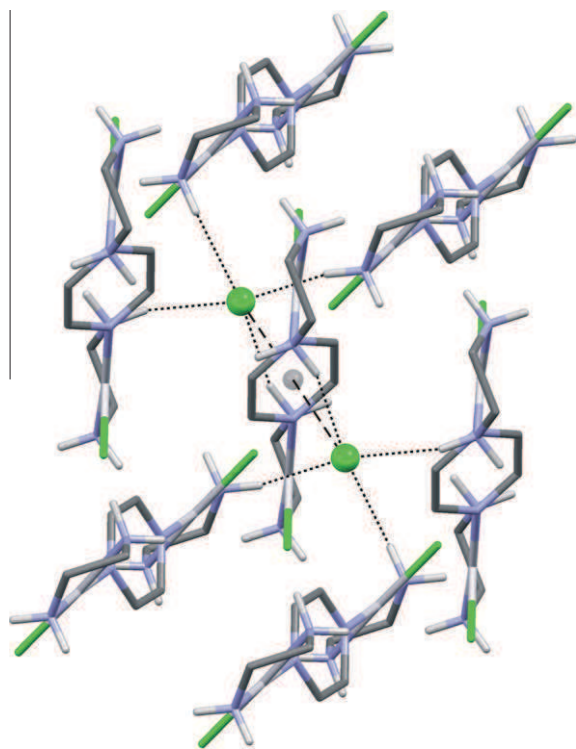


Fig. 2. Specific intermolecular interactions in the crystal structure of $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pz})]\text{Cl}_2$ involving complex cations and uncoordinated chloride anions. $\text{NH}\cdots\text{Cl}$ hydrogen bonds are marked by dotted lines while anion $\cdots\pi$ interactions are shown by broken lines joining the chloride anion (green ball) with the centre of gravity of the pyrazine ring (gray ball). For clarity, only H-atoms involved in hydrogen bonds are displayed. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

two Pt(II) metal centers. The $\text{Cl}2\cdots\text{C}_g$ distance (C_g stands for the center of gravity of the pyrazine ring) amounts to 3.410 Å, while the angle between the normal to the pz ring and the $\text{Cl}2\cdots\text{C}_g\cdots\text{Cl}2$ line is 12.9°. For comparison, Mascari et al. have calculated an equilibrium distance of 3.2 Å between chloride and the aryl centroid in the $\text{Cl}^-\cdots 1,3,5\text{-triazine}$ complex, with the anion positioned on the C3-axis above the triazine ring [8]. Moreover, the $\text{Cl}2$ anion acts as a hydrogen bond acceptor from N–H groups belonging to four different complex cations situated in its neighborhood. The hydrogen bond parameters are listed in Table 3. Notably, the coordinated chloride anion ($\text{Cl}1$) is not involved in hydrogen bonding or any other specific intermolecular interactions.

3.3. ^1H NMR investigation of the hydrolytic reactions of the N-acetylated dipeptide Ac-L-Met-Gly in the presence of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complexes

The hydrolytic cleavage of the Met-Gly amide bond in the Ac-L-Met-Gly dipeptide in the presence of two platinum(II) complexes, binuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ (en = bidentate coordinated ethylenediamine and pz = bridging pyrazine (or 1,4-diazine) ligand) and the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ was investigated by ^1H NMR spectroscopy. The corresponding peptide and platinum(II) complexes were reacted in 1:1 and 2:1 M ratios and all reactions were performed at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ in D_2O as the solvent and at 37 °C. Additionally, the reaction between $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and the Ac-L-Met-Gly dipeptide was realized with an excess of the platinum(II) complex (2:1 M ratio, respectively). As was shown in previous studies [36–39], acidic solutions are needed to suppress the

formation of hydroxo-bridged oligomeric Pt(II) complexes, which are catalytically inactive.

3.3.1. Reactions of platinum(II) complexes with an equimolar amount of Ac-L-Met-Gly

The mixing of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complexes with an equimolar amount of Ac-L-Met-Gly dipeptide under the above-mentioned conditions resulted in the spontaneous coordination of these two platinum(II) complexes to the methionine sulfur atom of the dipeptide. Different reaction pathways for the hydrolytic cleavage of this dipeptide in the reactions with the two Pt(II) complexes are presented in Fig. 3. The coordination of Ac-L-Met-Gly through the sulfur atom of methionine shifted the resonance for the methyl protons of free methionine at 2.11 ppm downfield to 2.54 ppm after its coordination to Pt(II) and this reaction was almost completed after 10 min (Table 4). These chemical shifts are in accordance with those previously reported for the reaction of platinum(II) complexes with different methionine-containing molecules [40–43]. The monodentate coordination of Ac-L-Met-Gly to the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complexes resulted in the formation of two platinum(II)–peptide complexes $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (**1**) and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\mu\text{-pz})][\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{4+}$ (**2**) (Fig. 3). Complexes **1** and **2** are intermediate products and they promote the regioselective cleavage of the Met-Gly amide bond in the Ac-L-Met-Gly dipeptide. This hydrolytic reaction can be followed successfully using ^1H NMR spectroscopy by observing the glycine protons in complexes **1** and **2** and these protons for free glycine. The resonance at 3.99 ppm, corresponding to the glycine protons of the dipeptide attached to platinum(II) in complexes **1** and **2**, decreased while that at 3.77 ppm for free glycine increased. Upon addition of glycine to the reaction mixture, the resonance at 3.77 ppm was enhanced. Due to the fact that after 10 min all the Ac-L-Met-Gly was bound to platinum(II) (no resonance at 2.11 ppm was observed in the ^1H NMR spectrum), it can be assumed that the concentrations of complexes **1** and **2** were equal to the initial concentration of the dipeptide. According to this, the hydrolytic cleavage of the Met-Gly amide bond in complexes **1** and **2** was determined by integration of the resonances for the glycine protons of the dipeptide attached to the platinum(II) (3.99 ppm) and for the protons of the free glycine (3.77 ppm) (Table 4). The changes in concentrations of free glycine and non-hydrolyzed complexes **1** and **2** were followed over time and the sum of their concentrations was always equal to the initial concentration of Ac-L-Met-Gly. The hydrolysis of the Met-Gly amide bond was followed over 24 h and no change in the chemical shifts of the resonances at 2.54 and 2.64 ppm for the methyl protons of the methionine and methylene protons of ethylenediamine, respectively, were observed, indicating that the ligands were bound to platinum(II) all the time (complexes **3** and **4**; Fig. 3 and Table 4). However, when the reaction between $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ and the Ac-L-Met-Gly dipeptide was followed for more than 24 h, some changes in the aromatic region of the ^1H NMR spectrum occurred. These changes were manifested through the fact that the singlet at 9.03 ppm for the bridging pyrazine ligand decreased while two symmetric multiplets in the range 8.75–9.00 ppm slowly increased (Table 4). The appearance of these two new multiplets indicates that one Pt(II)–N(pyrazine) bond in complex **2** was broken and that the four pyrazine protons of this ligand coordinated in a monotopic fashion to Pt(II) (complex **4**, Fig. 3) were split into two multiplets because of vicinal and long-range coupling. Symmetric multiplets for monodentate coordinated pyrazine were also observed for *cis*- and *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{pz})_2](\text{NO}_3)_2$ and for the $[\text{Pt}(\text{tmda})(\text{pz})_2](\text{NO}_3)_2$ (tmda is *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine) complex [1]. The platinum(II) complex **4** (Fig. 3), with a monodentate bound pyrazine ligand, was very stable and no resonance at

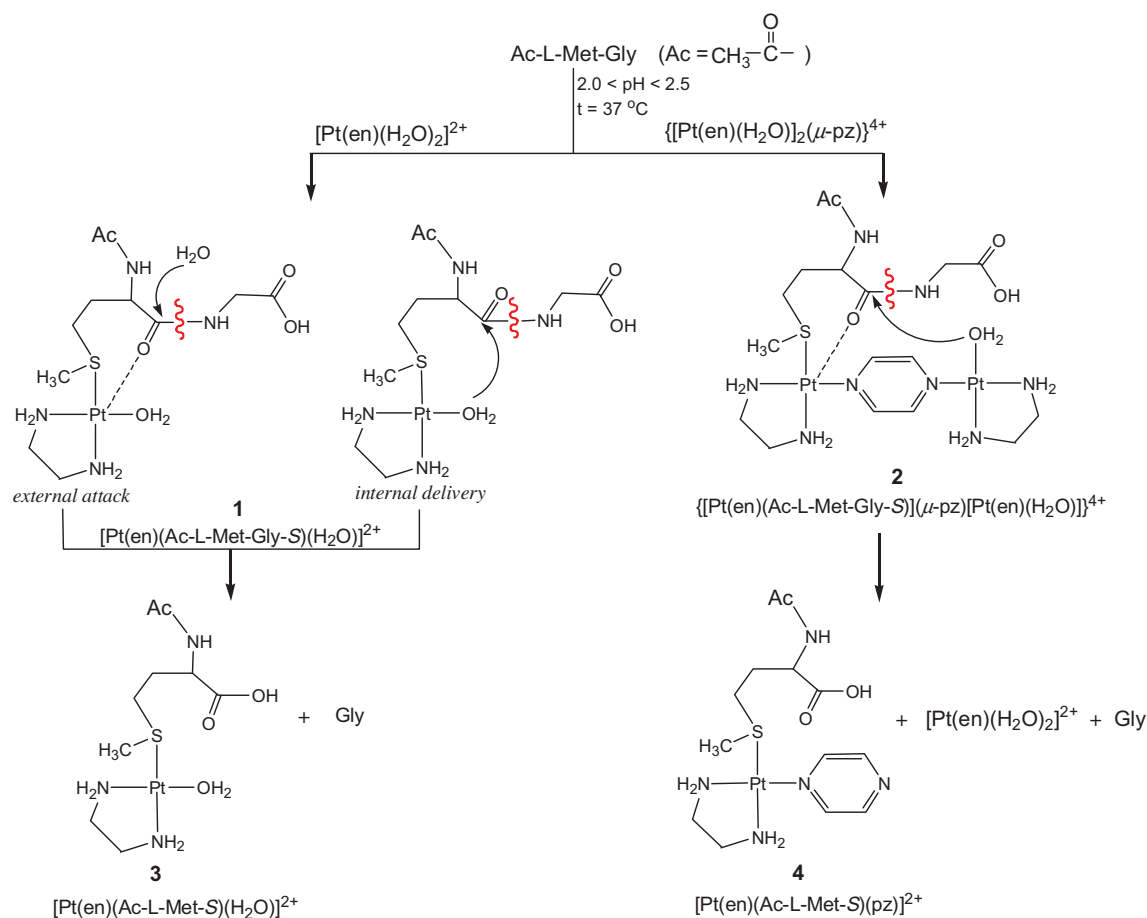


Fig. 3. Schematic presentation of the hydrolytic reactions of the Ac-L-Met-Gly dipeptide with an equimolar amount of the platinum(II) complex.

Table 4

Characteristic ^1H NMR chemical shifts observed in the reactions of the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complexes with Ac-L-Met-Gly at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ in D_2O and at 37°C . All spectra were recorded in D_2O solutions containing TSP (sodium trimethylsilylpropane-3-sulfonate) as the internal reference.

Dipeptide/Pt(II) complex/reaction product	Characteristic ^1H NMR resonances (δ , ppm)		
Ac-L-Met-Gly	2.11 (s, MetCH_3)	3.99 (s, GlyCH_2)	
$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$	2.64 (s, enCH_2)	9.03 (s, pzCH)	
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	2.64 (s, enCH_2)		
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (1 and 7)	2.54 (s, MetCH_3)	2.84 (s, enCH_2)	
$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]\}^{4+}$ (2)	2.54 (s, MetCH_3)	2.70, 2.84 (2s, enCH_2)	9.03 (s, pzCH)
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (3)	2.54 (s, MetCH_3)	2.84 (s, enCH_2)	
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-S})(\text{pz})]^{2+}$ (4)	2.53 (s, MetCH_3)	2.89 (s, enCH_2)	8.75–9.00 (m, pzCH)
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]^{2+}$ (5)	2.54 (s, MetCH_3)	2.89 (s, enCH_2)	
$\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ (6)	2.53 (s, MetCH_3)	2.89 (s, enCH_2)	9.03 (s, pzCH)
Free glycine (Gly)	3.77 (s, GlyCH_2)		
Free pyrazine (pz)	8.66 (s, pzCH)		

8.66 ppm for free pyrazine [1] was detected in the ^1H NMR spectrum, even after this reaction was prolonged to 10 days. The time dependences of the hydrolytic cleavage of the Met-Gly amide bond in the reactions between different molar ratios of the platinum(II) complex and Ac-L-Met-Gly dipeptide are given in Fig. 4. When an equimolar amount of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ was mixed with this dipeptide, only 35% of the Met-Gly amide bond was cleaved after 2 h. However, in the reaction with the binuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex, this cleavage was two times faster and about 70% of the Met-Gly amide bonds were cleaved in the same time. Finally, after 24 h in the presence of the binuclear Pt(II) complex, more than 83% of the Met-Gly amide bond hydrolyzed, while with the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex, about 56% of this bond had cleaved. However, when the reaction of the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex with Ac-L-Met-Gly dipeptide was per-

formed under the above-mentioned experimental conditions in an excess of the Pt(II) complex (2:1 M ratio), the cleavage of the peptide was faster than with equimolar amounts of these reactants. The hydrolysis of the dipeptide in the presence of two equivalents of the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex was still slower than that with an equimolar amount of the binuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex (see Fig. 4). The better catalytic ability of the binuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex in comparison with the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex can be attributed to the structural differences of their hydrolytically active platinum(II)-dipeptide complexes (complexes 1 and 2; Fig. 3). Hydrolysis of the Met-Gly amide bond in the presence of the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex can occur by two possible limiting mechanisms, both represented in complex 1 (Fig. 3) [44–46]. The first possibility is that the platinum(II) ion interacts

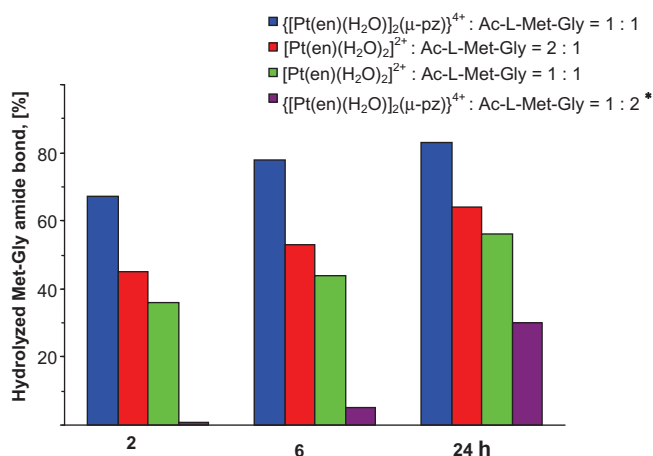


Fig. 4. Time dependence of the hydrolytic cleavage of the Met-Gly amide bond in the Ac-L-Met-Gly dipeptide with platinum(II) complexes at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ and at 37°C . *No hydrolysis of the amide bond was observed in the reaction of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ with an excess of dipeptide.

with the oxygen atom of the scissile amide bond. This interaction polarizes the carbonyl group and activates its carbon atom toward attack by a water molecule from the solvent (*external attack*). For the reaction to occur by this mechanism, the platinum(II) and carbonyl oxygen atoms should be proximate. The other possibility is that an aqua ligand on platinum(II) is delivered to the carbon atom in the amide bond (*internal attack*). For the cleavage of the amide

bond to occur by this mechanism, the aqua ligand on platinum(II) should be proximate to the carbonyl carbon of the scissile amide bond. Additionally, it was found that a coordinated aqua ligand in Pd(II) and Pt(II) complexes plays an important role in promoting the regioselective cleavage of the amide bond in histidine- and methionine-containing peptides [36,44–50]. Two platinum(II) centers bridged with one aromatic pyrazine ligand in the hydrolytically active complex **2** are more efficient in the hydrolysis of the scissile amide bond than even two equivalents of the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex (Fig. 4). The two platinum(II) centers in complex **2** can simultaneously participate in the cleavage of the scissile amide bond, one by polarizing the carbonyl oxygen atom and another by delivering a water molecule. Meanwhile the single Pt(II) ion in the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex is incapable in promoting these two interactions simultaneously. Our latest results for the good catalytic ability of the binuclear platinum(II) complex in the cleavage of the Ac-L-Met-Gly dipeptide are also in accordance with those previously reported for the reaction of a binuclear palladium(II) complex having thiolate bridging ligands with different methionine-containing peptides [19] and for different polynuclear complexes with nucleic acids and phosphate esters [20,51].

3.3.2. Reactions of platinum(II) complexes with an excess of Ac-L-Met-Gly

The hydrolytic cleavage of the Met-Gly amide bond in the presence of the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}(\mu\text{-pz})^{4+}$ complexes was studied with an excess of the Ac-L-Met-Gly dipeptide.

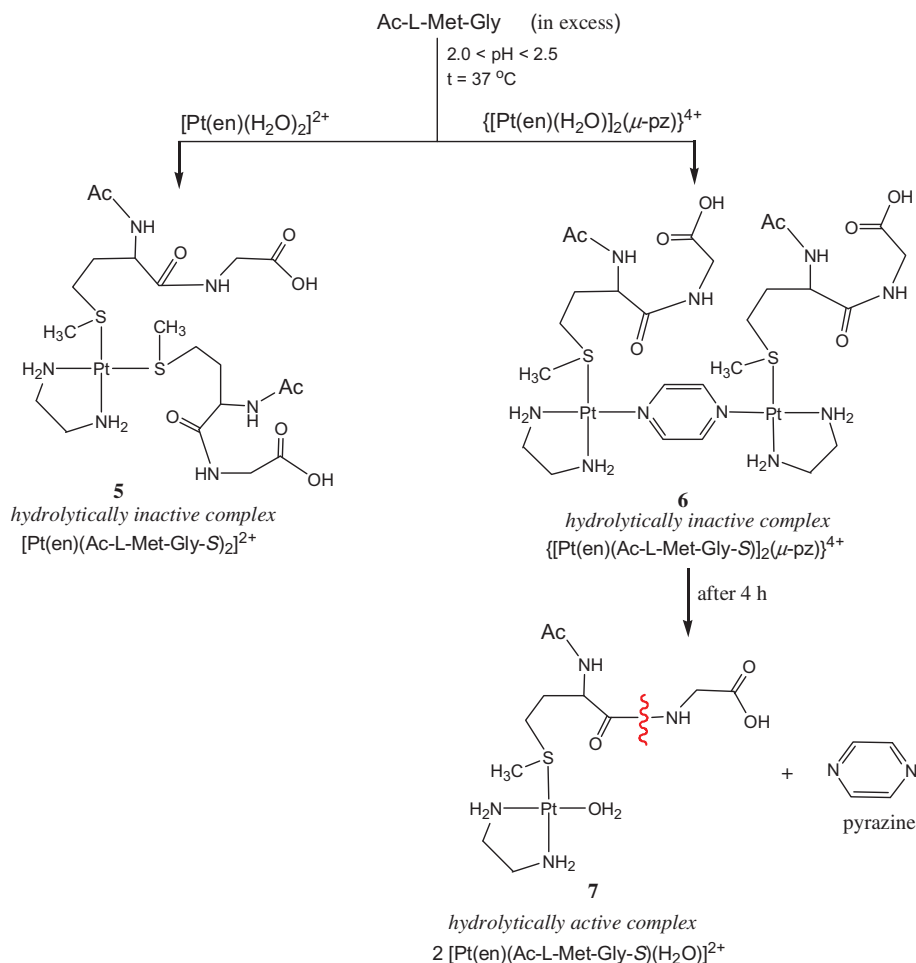


Fig. 5. Reaction pathways of the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}(\mu\text{-pz})^{4+}$ complexes with an excess of the Ac-L-Met-Gly dipeptide (1:2 M ratio, respectively) at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ and at 37°C .

The two platinum(II) complexes, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$, and the corresponding dipeptide were mixed in a 1:2 M ratio, respectively, and all reactions were performed at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ and at 37°C . The formation of the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})_2]^{2+}$ (**5**) and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ (**6**) complexes was evidenced by the simultaneous decline of the resonance at 2.11 ppm, arising from the S-methyl protons of free Ac-L-Met-Gly, and the growth of the resonance at 2.54 ppm, corresponding to the S-methyl protons of the peptide coordinated to Pt(II) through the sulfur atom (complexes **5** and **6**; Fig. 5 and Table 4). These reactions were followed over time and no resonance at 2.11 ppm for the free peptide was observed in the ^1H NMR spectra after 2 h. In addition, during this time, no cleavage of any amide bond in Ac-L-Met-Gly was observed, indicating that the platinum(II)–peptide complexes **5** and **6** are hydrolytically inactive. Moreover, in the reaction between $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and Ac-v-Met-Gly, the hydrolytic reaction was not observed, even when the reaction was prolonged to 4 days. Additionally, no changes in the ^1H NMR spectrum for this reaction were observed during this time, confirming that complex **5** is very stable under the employed experimental conditions. However, the hydrolytically inactive complex **6**, formed in the reaction between the $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complex and the Ac-L-Met-Gly dipeptide, was unstable under these experimental conditions and after 4 h of reaction, it was converted into the hydrolytically active $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex **7**. This complex is structurally identical with complex **1**, obtained in the reaction between equimolar amounts of the mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and Ac-L-Met-Gly dipeptide (see Fig. 3). The conversion of **6** into **7** was evident in the ^1H NMR spectrum by the simultaneous decline of the singlet at 9.03 ppm, due to protons of the bridging pyrazine ligand, and the growth at 8.66 ppm, due to the free pyrazine ligand (Table 4). This conversion was very slow and only 30% of free pyrazine was detected in the solution after 48 h. Along with the resonance for the free pyrazine ligand, a new resonance at 3.77 ppm was also detected in the ^1H NMR spectrum. This resonance was assigned to free glycine protons and its intensity increased upon addition of glycine to the reaction mixture. This undoubtedly confirmed that inactive complex **6** was converted into the hydrolytically active species **7**, which further promotes the cleavage of the Met-Gly amide bond. The amounts of the hydrolysis products in this reaction were determined from the known initial concentration of Ac-L-Met-Gly and from the integrated resonance of the free glycine. It was found that in the reaction of the $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complex with a two times bigger amount of the peptide, only 30% of the Met-Gly bond had hydrolyzed after 24 h (see Fig. 4). However, when this reaction was prolonged for a further 24 h, the amount of the hydrolyzed amide bond was about 50%.

4. Conclusions

The X-ray elucidation of the pyrazine-bridged $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ binuclear complex confirmed the *trans* configuration of its complex cation and the existence of anion $\cdots\pi$ interactions between the uncoordinated chloride and electron-deficient pyrazine ring. The reactions of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ with the Ac-L-Met-Gly dipeptide at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ and at 37°C are remarkably selective in the cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine. In comparison with the single Pt(II) ion in the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex, the two Pt(II) ions bridged with one aromatic pyrazine ligand in the $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complex are more efficient in the hydrolysis of the Ac-L-Met-Gly dipeptide, even when the hydrolytic reaction was performed with an excess of the mononuclear complex. Moreover, when the reaction of the platinum(II) complexes was investigated

with an excess of the dipeptide, only the binuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complex was shown to be a capable catalytic agent in the hydrolysis of the dipeptide. The better catalytic ability of the binuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complex than the corresponding mononuclear Pt(II) complex can be attributed to the presence of different hydrolytically active Pt(II)–peptide complexes formed during the reaction with the Ac-L-Met-Gly dipeptide. These results together with those previously reported for the reaction of a binuclear palladium(II) complex having thiolate bridging ligands [18] should be taken into consideration when designing new polynuclear platinum(II) and palladium(II) complexes as effective agents in the hydrolysis of methionine-containing peptides. Studies aimed at investigating these new possible synthetic metallopeptidases are in progress.

Acknowledgement

This work was funded in part by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (Project No. 172036).

Appendix A. Supplementary material

CCDC 895153 contains the supplementary crystallographic data for $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223 336 033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

References

- [1] M. Willermann, C. Mulcahy, R.K.O. Sigel, M. Morell Cerda, E. Freisinger, P.J.S. Miguel, M. Roitzsch, B. Lippert, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 2093.
- [2] S. Derossi, M. Casanova, E. Iengo, E. Zangrando, M. Stener, E. Alessio, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 11243.
- [3] K. Kumazawa, K. Biradha, T. Kusukawa, T. Okano, M. Fujita, *Angew. Chem.* 115 (2003) 4039.
- [4] L.D. Slep, S. Pollak, J.A. Olabe, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 4369.
- [5] T. Sawada, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 7194.
- [6] C.A. Black, L.R. Hanton, M.D. Spicer, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 3669.
- [7] D. Quinonero, C. Garau, C. Rotger, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P.M. Deya, *Angew. Chem., Int. Ed.* 41 (2002) 3389.
- [8] M. Mascal, A. Armstrong, M.D. Bartberger, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 6274.
- [9] C. Garau, D. Quinonero, A. Frontera, P. Ballester, A. Costa, P.M. Deya, *New J. Chem.* 27 (2003) 211.
- [10] P. de Hoog, P. Gamez, I. Mutikainen, U. Turpeinen, J. Reedijk, *Angew. Chem., Int. Ed.* 43 (2004) 5815.
- [11] D. Quinonero, A. Frontera, P.M. Deya, *ChemPhysChem* 9 (2008) 397.
- [12] I.A. Gural'skiy, D. Escudero, A. Frontera, P.V. Solntsev, E.B. Rusanov, A.N. Chernega, H. Krautscheid, K.V. Domasevitch, *Dalton Trans.* (2009) 2856.
- [13] J. Mareda, S. Matile, *Chem. Eur. J.* 15 (2009) 28.
- [14] A. Perez-Velasco, V. Gorteau, S. Matile, *Angew. Chem., Int. Ed.* 47 (2008) 921.
- [15] A. Frontera, P. Gamez, M. Mascal, T.J. Mooibroek, J. Reedijk, *Angew. Chem.* 50 (2011) 9564.
- [16] S. Demeshko, S. Dechert, F. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 4508.
- [17] P. Ballester, *Acc. Chem. Res.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1021/ar300080f>.
- [18] G.B. Karet, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 1021.
- [19] (a) N. Sträter, W.N. Lipscomb, T. Kabunde, B. Krebs, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 35 (1996) 2024 (and references therein);
(b) N. Sträter, T. Kabunde, P. Tucker, H. Witzel, B. Krebs, *Science* 268 (1995) 1489;
(c) M. Deitrich, D. Münstermann, H. Suerbaum, H. Witzel, *Eur. J. Biochem.* 199 (1991) 105.
- [20] D.E. Wilcox, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2435.
- [21] M.A. Aquino, J. Lim, A.G. Sykes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1992) 2135.
- [22] E.E. Kim, H.K. Hansen, B. Birknes, K. Jynge, S. Hansen, A. Hordvik, C. Little, E. Dodson, Z. Derewenda, *Nature* 338 (1989) 357.
- [23] A. Volbeda, A. Lahm, F. Sakiyama, D. Suck, *EMBO J.* 10 (1991) 1607.
- [24] E.E. Kim, H.W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* 218 (1991) 449.
- [25] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 3994.
- [26] N. Summa, T. Soldatović, L. Dahlenburg, Ž.D. Bugarčić, R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 461.
- [27] S. Komeda, G.V. Kalayda, M. Lutz, A.L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 1210.
- [28] G. Mahal, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 4165.
- [29] CrysAlis Pro, Agilent Technologies, Yarnton, Oxfordshire, England, 2011.

- [30] G.M. Sheldrick, Acta Crystallogr., Sect. A 64 (2008) 112.
- [31] Stereochemical Workstation Operation Manual, Release 3.4, Siemens Analytical X-Ray Instruments, Inc., Madison, WI, USA, 1989.
- [32] I.J. Bruno, J.C. Cole, P.R. Edgington, M. Kessler, C.F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, Acta Crystallogr., Sect. B 58 (2002) 389.
- [33] F.H. Allen, Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci. 58 (2002) 380.
- [34] L.J. Farrugia, J. Appl. Cryst. 32 (1999) 837.
- [35] J. Sanchez Costa, A. Gonzalez Castro, R. Pievo, O. Roubeau, B. Modéc, B. Kozlevcar, S.J. Teat, P. Gamez, J. Reedijk, CrystEngComm 12 (2010) 3057.
- [36] S. Rajković, B.Đ. Glišić, M.D. Živković, M.I. Djuran, Bioorg. Chem. 37 (2009) 173.
- [37] L. Zhu, N.M. Kostić, J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 4566.
- [38] L. Zhu, N.M. Kostić, Inorg. Chim. Acta 217 (1994) 21.
- [39] E.N. Korneeva, M.V. Ovchinnikov, N.M. Kostić, Inorg. Chim. Acta 243 (1996) 9.
- [40] S. Rajković, M.D. Živković, C. Kállay, I. Sóvágó, M.I. Djuran, Dalton Trans. (2009) 8370.
- [41] I.E. Burgeson, N.M. Kostić, Inorg. Chem. 30 (1991) 4299.
- [42] N.M. Milović, N.M. Kostić, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), Metal Ions in Biological Systems, Palladium(II) and Platinum(II) Complexes as Synthetic Peptidases, vol. XXXVIII, Marcel Dekker Inc., 2001, p. 145.
- [43] K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. Del S. Murdoch, P.J. Sadler, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1994) 721.
- [44] T.N. Parac, N.M. Kostić, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 5946.
- [45] S.U. Milinković, T.N. Parac, M.I. Djuran, N.M. Kostić, J. Chem. Soc., Dalton. Trans. (1997) 2771.
- [46] X. Chen, L. Zhu, H. Yan, X. You, N.M. Kostić, J. Chem. Soc., Dalton. Trans. (1996) 2653.
- [47] M.D. Živković, S. Rajković, U. Rychlewska, B. Warżajtis, M.I. Djuran, Polyhedron 26 (2007) 1541.
- [48] M.I. Djuran, S.U. Milinković, Polyhedron 18 (1999) 3611.
- [49] M.I. Djuran, S.U. Milinković, Polyhedron 19 (2000) 959.
- [50] Z.D. Petrović, M.I. Djuran, F.W. Heinemann, S. Rajković, S.R. Trifunović, Bioorg. Chem. 34 (2006) 225.
- [51] T.C. Bruice, A. Tsubouchi, R.O. Dempcy, L.P. Olson, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 9867.



Synthesis of different pyrazine-bridged platinum(II) complexes and ^1H NMR study of their catalytic abilities in the hydrolysis of the *N*-acetylated *L*-methionylglycine



Snežana Rajković*, Darko P. Ašanin, Marija D. Živković, Miloš I. Djuran

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, PO Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2013

Accepted 4 August 2013

Available online 14 August 2013

Keywords:

Binuclear platinum(II) complexes

L-Methionylglycine

^1H NMR spectroscopy

Hydrolysis

ABSTRACT

Four binuclear $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ -type complexes have been synthesized and characterized by elemental microanalyses and NMR (^1H and ^{13}C) spectroscopy (L is ethylenediamine, en; (\pm)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn; isobutylenediamine, ibn; *trans*-(\pm)-1,2-diaminocyclohexane, dach and pz is bridging pyrazine ligand). The chlorido complexes were converted into the corresponding aqua species, $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, and ^1H NMR spectroscopy was applied to study their reactions with the *N*-acetylated *L*-methionylglycine, Ac-L-Met-Gly. The $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex and dipeptide were reacted in 1:1 and 1:2 M ratios, respectively, and all reactions were performed in the pH range 2.0–2.5 and at 37 °C. In the reactions with equimolar amounts of the reactants all Pt(II) aqua complexes bind to the methionine side chain of Ac-L-Met-Gly dipeptide and promote the cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine. It was found that the amount of hydrolyzed dipeptide strongly depends from the steric bulk of bidentate coordinated diamine ligand L in $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex (en > 1,2-pn > ibn > dach). However, in the reaction with an excess of dipeptide the influence of the nature of diamine ligand L on this hydrolytic process could not be observed due to the fact that slow decomposition of $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex was occurred.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hydrolytic reactions of uncatalyzed peptide bonds are extremely slow. Enzymes are commonly used as cleavage agents for this reactions but investigation of the hydrolytic reactions promoted by metal complexes suggested that they can be applied for cleavage of unactivated amide bonds very efficiently. Recent years have witnessed an increasing interest in the study of the interactions of platinum(II) [1–3] and palladium(II) [2–16] complexes with sulfur- and histidine-containing peptides and proteins [17–20] as effective catalyst for the hydrolytic cleavage of the above mentioned peptides.

In general, it was shown that aqua complexes of these metal ions spontaneously bind to the heteroatom in the side chain of methionine [1–8] or histidine [2,3,9–16,21] and promote cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of the anchoring amino acid. The hydrolytic reactions of methionine-containing peptides with different palladium(II) complexes were investigated [3,8,9,21–23] and it was shown that different promoters produce different hydrolytically active palladium(II)-peptide complexes. Thus, in the reactions of methionine-containing peptides with

$[\text{PdCl}_4]^{2-}$, the active form was a mononuclear palladium(II)-peptide complex, while with $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ and $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complexes, binuclear hydrolytically active palladium(II)-peptide complexes bridged with two methionine side chains were formed. Moreover, it was shown that these binuclear palladium(II)-peptide complexes are more efficient than the corresponding mononuclear complex in promoting the hydrolysis of the scissile amide bond in methionine-containing peptides. In accordance to this, the reactions of the thiolate-bridged $(\text{Me}_4\text{N})_2[\text{Pd}_2(\mu\text{-SPh})_2\text{Cl}_4]$ complex with different methionine-containing peptides of the type Ac-L-Met-X (X is Gly, Val, Phe or Ala) showed that this complex was an effective catalyst for the rapid cleavage of methionine-containing dipeptides in non-aqueous solvents [24]. An important advantage of dimerization is the possibility of cooperation between the metals, as was shown for hydrolysis of DNA, RNA, and their models catalyzed by polynuclear metal complexes and metalloenzymes [25–30]. Very recently in one of our laboratories we compared hydrolytic abilities of two Pt(II) complexes, mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and binuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, in the reaction with Ac-L-Met-Gly dipeptide. It was shown that two Pt(II) ions bridged with one aromatic pyrazine ligand in the $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex are more efficient in the hydrolysis of the Ac-L-Met-Gly dipeptide, even when the hydrolytic reaction was performed with an excess of the mononuclear complex. Our

* Corresponding author. Tel.: +381 34 300 251; fax: +381 34 335 040.

E-mail address: snezana@kg.ac.rs (S. Rajković).

latest findings for $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complex [31] together with those for different binuclear Pd(II) complexes [24] showed that polynuclear Pt(II) and Pd(II) complexes can be perspective catalytic reagents for amide bond hydrolysis in the reactions with methionine-containing peptides.

In this work, an attempt was made to gain further insight into selective hydrolysis of the methionine-containing peptides in the presence of different binuclear platinum(II) complexes. For these purposes, the 1H NMR spectroscopy was applied to study the influence of the chelating diamine ligand L in $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ -type complexes (L is ethylenediamine, en; (\pm)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn; isobutylenediamine, ibn; *trans*-(\pm)-1,2-diaminocyclohexane, dach and pz is bridging pyrazine ligand) on the hydrolytic cleavage of the Ac-L-Met-Gly dipeptide.

2. Experimental

2.1. Materials

Distilled water was demineralized and purified to a resistance greater than $10\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$. The compounds D_2O , DNO_3 , NaOD, ethylenediamine (en), (\pm)-1,2-propylenediamine (1,2-pn), isobutylenediamine (ibn), *trans*-(\pm)-1,2-diaminocyclohexane (dach), pyrazine (or 1,4-diazine), pz and $K_2[PtCl_4]$ were obtained from the Aldrich Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The dipeptide L-methionylglycine (L-Met-Gly) was obtained from the Sigma Chemical Co. The terminal amino group in this dipeptide was acetylated by a standard method [4].

2.2. Preparation of $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$ -type complexes (L is en, 1,2-pn, ibn or dach)

The binuclear platinum(II) complexes of the type $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$ were synthesized from the corresponding mononuclear $[Pt(L)Cl_2]$ complexes by modification of the procedure published in the literature [31,32].

Preparation of $[Pt(L)Cl_2]$: All mononuclear Pt(II) complexes were prepared with minor modification of a method previously used in our laboratory for the preparation of a series of $[M(L)Cl_2]$ complexes (M is Pt(II) or Pd(II); L is bidentate coordinated diamine or amino acid) [15,23,33]. K_2PtCl_4 was dissolved in water and mixed with an equimolar amount of diamine ligand (L). The pH of the solution was adjusted to ca. 3 by addition of 1 M HCl and mixture was stirred at 80°C for 2 h. All complexes were crystallized from water at room temperature. The pure complexes were obtained by recrystallization from warm water and then cooling at room temperature. The experimental results of the elemental analyses for C, H and N parameters for all investigated Pt(II) complexes are in accordance with theoretical values calculated for $[Pt(L)Cl_2]$ complexes.

Preparation of $[Pt(L)(dmf)Cl]NO_3$: The solid $[Pt(L)Cl_2]$ complex was converted into the corresponding monodimethylformamide (dmf) $[Pt(L)(dmf)Cl]NO_3$ complex by treatment with 0.98 equivalents of $AgNO_3$ on the following manner. To a solution of 55.3 mg (0.325 mmol) of $AgNO_3$ in 5 cm^3 of dmf was added a suspension of 0.332 mmol of $[Pt(L)Cl_2]$ in 10 cm^3 of dmf. The mixture was stirred overnight at room temperature in the dark. The precipitated AgCl was removed by filtration and resulting pale yellow dmf solution of $[Pt(L)(dmf)Cl]NO_3$ was used as the starting material for the preparation of the required pyrazine-bridged platinum(II) complexes, $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$.

Preparation of $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$: The dmf solution of the pyrazine ligand (pz) (13.29 mg, 0.166 mmol) was added dropwise to the solution of $[Pt(L)(dmf)Cl]NO_3$. The mixture was stirred at room temperature in the dark for 12 h. The solvent was then rotary

evaporated and the residue washed with ether. The crude product was dissolved in a minimal amount of 0.5 mol/dm^3 LiCl aqueous solution. The obtained solution was left overnight in the dark. The pale-yellow precipitate of $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$ was removed by filtration, washed with methanol and then ether, and air-dried. Depending of the type diamine ligand L the yield of $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$ complex was between 30–40%. *Anal. Calc.* for $\{[Pt(1,2-pn)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\} = C_{10}H_{24}N_6Cl_4Pt_2$ (FW = 760.31): C, 15.80; H, 3.18; N, 11.05. *Found:* C, 15.45; H, 3.19; N, 10.82%. *Anal. Calc.* for $\{[Pt(ibn)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\} = C_{12}H_{28}N_6Cl_4Pt_2$ (FW = 788.36): C, 18.28; H, 3.58; N, 10.66. *Found:* C, 17.84; H, 3.63; N, 10.47%. *Anal. Calc.* for $\{[Pt(dach)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\} = C_{16}H_{32}N_6Cl_4Pt_2$ (FW = 840.43): C, 22.87; H, 3.84; N, 10.00. *Found:* C, 22.56; H, 3.94; N, 9.56%.

2.3. Preparation of $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$

The $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$ complexes were converted into the corresponding aqua complexes by treatment with 3.98 equivalents of $AgNO_3$, according to a previously published method [34]. In each case, the formed solid AgCl was removed by filtration in the dark, and the fresh solutions of the aqua complexes were kept in a refrigerator and used in the further experiments.

2.4. Measurements

All pH measurements were realized at ambient temperature using an Iskra MA 5704 pH meter calibrated with Fischer certified buffer solutions of pH 4.00 and 7.00. The results were not corrected for the deuterium isotope effect.

The NMR spectra of D_2O solution containing TSP (sodium trimethylsilylpropane-3-sulfonate) as the internal reference were recorded with a Varian Gemini 2000 spectrometer (200 MHz). Fresh solutions of aqua complexes and dipeptide were prepared separately and then mixed in 1:1 and 1:2 M ratios, respectively. The initial concentration of dipeptide and aqua complexes solutions were 40 mM. All reactions were performed in the pH range 2.0–2.5 and at 37°C . Elemental microanalyses for carbon, hydrogen and nitrogen were performed by the Microanalytical Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Belgrade.

3. Results and discussion

Four binuclear $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$ -type complexes have been synthesized and characterized by elemental microanalyses and NMR (1H and ^{13}C) spectroscopy (L is (\pm)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn; isobutylenediamine, ibn and *trans*-(\pm)-1,2-diaminocyclohexane, dach; see Fig. 1). The schematic presentation of the reaction for the syntheses of these complexes is given in Fig. 2. The spectroscopic results of these complexes are in accordance with those for similar complexes in literature [15,23,32] and with proposed formula $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$ (Table 1). As it was shown in Fig. 1, all investigated Pt(II) complexes have the same bridging pyrazine ligand but different chelating diamine ligand L. In the present study we investigated the influence of this chelating ligand L on the hydrolysis of the amide bond in the N-acetylated L-methionylglycine dipeptide (Ac-L-Met-Gly). The terminal amino group in this peptide was acetylated to protect its binding to the Pt(II) atom. In order to investigate the influence of structural changes in the chelating diamine ligand L on the hydrolysis of Ac-L-Met-Gly dipeptide, all chlorido Pt(II) complexes were converted into the corresponding aqua species, $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$. The platinum(II) aqua complex and dipeptide were reacted in 1:1 and 1:2 M ratios, respectively, and all reactions were performed in the pH range 2.0–2.5 and at 37°C . As was shown in our previous

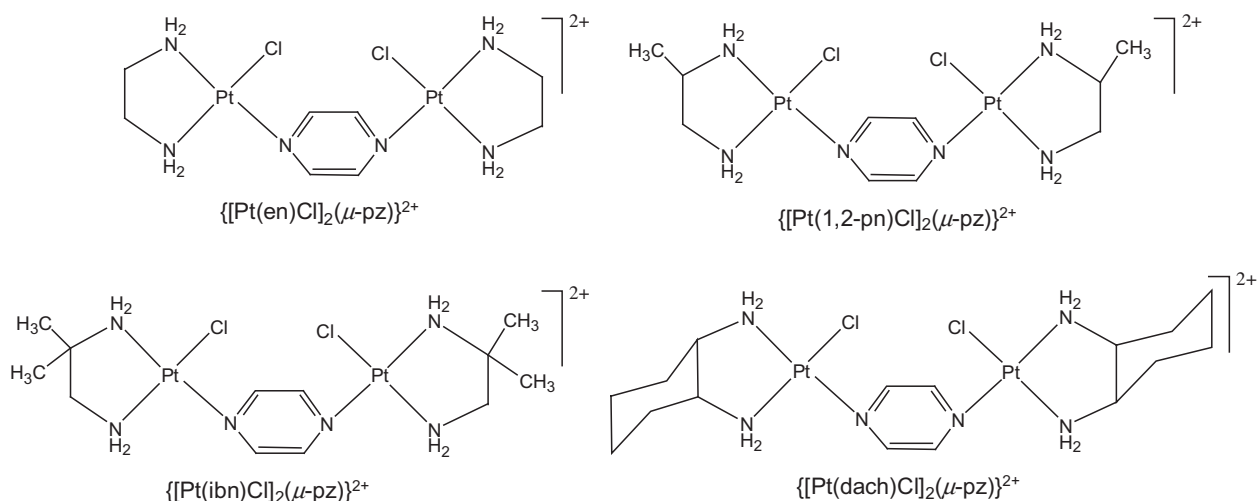


Fig. 1. Schematic drawing of the binuclear $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$ complexes. These complexes were converted into the corresponding aqua species, $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, and used in the reactions with the *N*-acetylated L-methionylglycine.

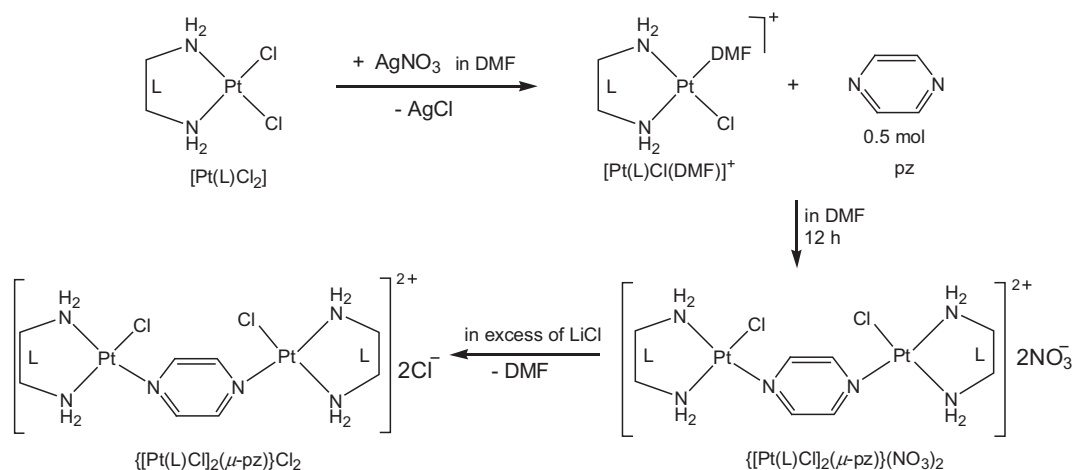


Fig. 2. The schematic presentation of the reaction for the synthesis of binuclear $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$ -type complexes (L is ethylenediamine, en; (±)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn; isobutylenediamine, ibn; *trans*-(±)-1,2-diaminocyclohexane, dach and pz is bridging pyrazine ligand).

Table 1
Characteristic NMR (1H and ^{13}C) chemical shifts for the $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$ -type complexes. These chemical shifts are in accordance with those previously reported for similar complexes [15,23,32].

Platinum(II) complex	Characteristic 1H NMR resonances (δ , ppm)	Characteristic ^{13}C NMR resonances (δ , ppm)
$\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$	2.64 (s, enCH ₂)	52.34 (enCH ₂)
$\{[Pt(1,2\text{-pn})Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$	1.34 (d, 1,2-pnCH ₃), 2.45–2.98 (m, 1,2-pnCH ₂), 3.11–3.32 (m, 1,2-pnCH)	17.83 (1,2-pnCH ₃), 54.52 (1,2-pnCH ₂), 59.86 (1,2-pnCH)
$\{[Pt(ibn)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$	1.42–1.48 (m, ibnCH ₃), 2.66 (s, ibnCH ₂)	25.96 (ibnCH ₃), 60.09 (ibnCH ₂), 63.61 (ibnCH)
$\{[Pt(dach)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$	1.27–1.62 (m, dachCH ₂ , C4,C5), 1.76–2.08 (m, dachCH ₂ ,C3,C6), 2.45–2.61 (m, dachCH,C1,C2)	26.55 (dach, C4,C5), 34.56 (dach, C3,C6), 65.15 and 65.30 (dach, C1,C2)

studies [11,21,22], acidic solutions are needed to suppress the formation of hydroxo-bridged oligomeric Pt(II) complexes, which are catalytically inactive. All chelate diamine ligands L in $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complexes are inert to substitution and

expected to remain bound to the platinum(II) atom during the reactions with Ac-L-Met-Gly dipeptide. The reactions of $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complexes with Ac-L-Met-Gly were followed by applying 1H NMR spectroscopy.

3.1. The reactions of $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complexes with an equimolar amount of Ac-L-Met-Gly dipeptide

Recently we investigated the reactions of binuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex with methionine-containing peptides [31]. This pyrazine-bridged Pt(II) complex was shown as very effective hydrolytic reagent in the cleavage of these peptides. As continuation of this study, here we compared the rate of hydrolysis of the Ac-L-Met-Gly dipeptide in the presence of $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex with those for three new binuclear $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complexes having different bidentate diamine ligand L. When an equimolar amount of $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex was incubated with Ac-L-Met-Gly, under the above mentioned experimental conditions, all reactions resulted in formation of platinum(II)–dipeptide complex $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ in a yield of 95% for less than 30 min (Fig. 3). The monodentate binding of the platinum(II) to the methionine side

chain was registered from the simultaneous decline of the resonance at 2.11 ppm due to the S-methyl protons of the free dipeptide and the growth of a resonance at 2.54 ppm corresponding to these protons for the dipeptide coordinated to platinum(II) through the sulfur atom. These chemical shifts are in accordance with those previously reported for the reactions of platinum(II) complexes with different methionine-containing molecules [1–3,35]. In all investigated reactions the intermediate $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ complex is hydrolytically active species and promotes the regioselective cleavage of the Met-Gly amide bond in the Ac-L-Met-Gly dipeptide. These hydrolytic reactions can be followed successfully using ^1H NMR spectroscopy by observing the methylene glycine protons in $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ complex and these protons for the free glycine, see Fig. 4. As can be seen from this figure, the resonance at 3.99 ppm corresponding to the methylene glycine protons of the dipeptide attached to platinum(II) in

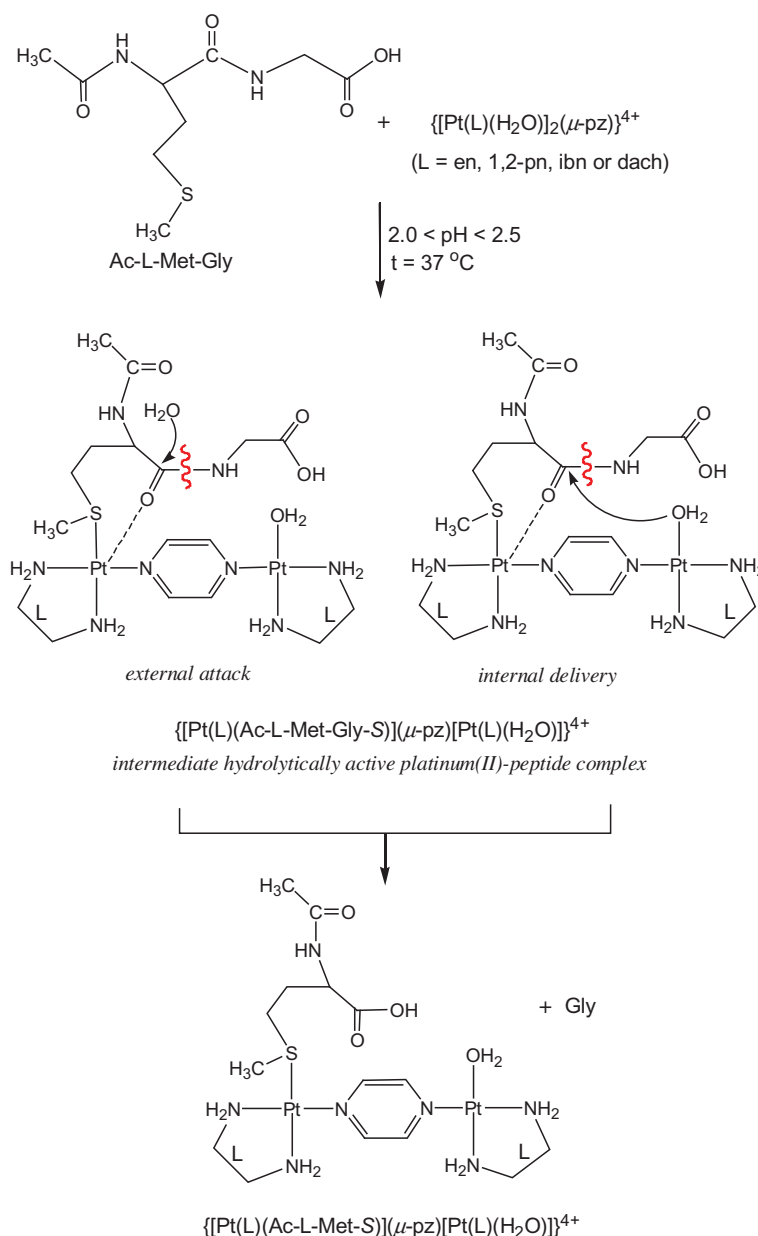


Fig. 3. The reaction scheme of the hydrolytic reaction of the Ac-L-Met-Gly dipeptide with binuclear $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ -type complexes. The corresponding Pt(II)-aqua complex and dipeptide were mixed in a 1:1 M ratio and all reactions were performed at 2.0 < pH < 2.5 and at 37 °C.

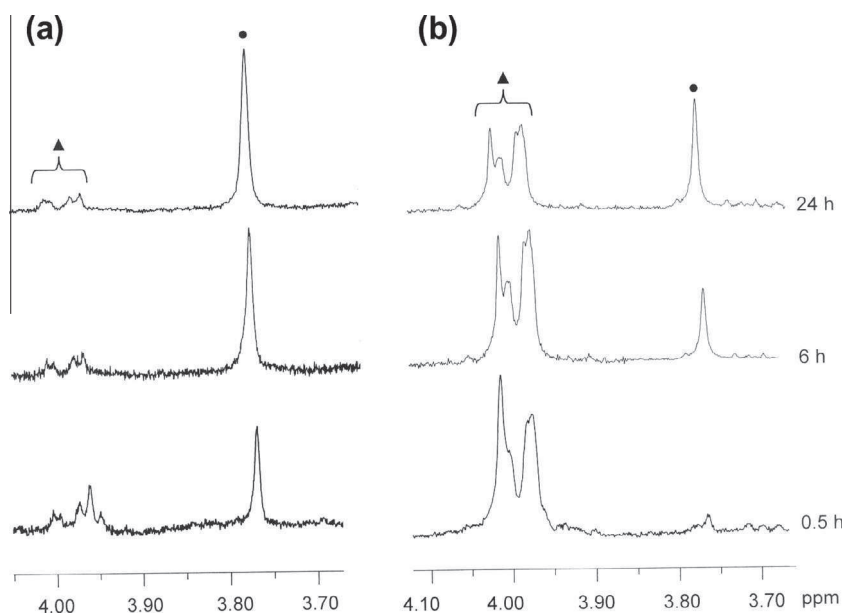


Fig. 4. Parts of the ^1H NMR spectra recorded during the reaction of $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ (a) and $\{[\text{Pt}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ (b) complexes with an equimolar amount of Ac-L-Met-Gly dipeptide as a function of time in the pH range 2.0–2.5 and at 37 °C. The resonances assigned as (▲) and (●) correspond to the methylene glycine protons of Ac-L-Met-Gly dipeptide monodentate bound to the binuclear platinum(II) complex and these protons for the free glycine, respectively.

$\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ complex decreased, while that at 3.77 ppm for these protons in the free glycine increased. Upon addition of amino acid glycine to the reaction mixture, the resonance at 3.77 ppm was enhanced. The amounts of the non-hydrolyzed dipeptide coordinated to platinum(II) complex and hydrolysis products were determined from the known initial concentration of Ac-L-Met-Gly and from the integrated resonance for the methylene protons of the free glycine. The changes in concentrations of the free glycine and non-hydrolyzed dipeptide in $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ complex were determined every 30 min during 24 h. During this time the total amounts of $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{Ac-L-Met-Gly-S})](\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ complex and free glycine was always equal to the initial concentration of Ac-L-Met-Gly dipeptide. The time dependence of the hydrolytic

cleavage of the Met-Gly amide bond in the reactions between different binuclear $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complexes and Ac-L-Met-Gly dipeptide is given in Fig. 5. From this figure it can be concluded that the amount of the hydrolyzed Ac-L-Met-Gly dipeptide decreased in the following order: $\text{en} > 1,2\text{-pn} > \text{ibn} > \text{dach}$. Therefore, the amount of hydrolyzed Ac-L-Met-Gly dipeptide in the reaction with $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex after 30 min is almost two or one and a half times larger than with $\{[\text{Pt}(\text{ibn})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ and $\{[\text{Pt}(1,2\text{-pn})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex, respectively. However, during the same time the amount of hydrolyzed Ac-L-Met-Gly dipeptide in the presence of $\{[\text{Pt}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ was eight times smaller than with $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex. Finally, after 24 h in the presence of the $\{[\text{Pt}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex only 30% of the Met-Gly amide bond hydrolyzed, while with the $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex more than 80% of this bond had cleaved. Difference in the hydrolytic abilities of the investigated binuclear $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complexes can be attributed to the steric bulk of their bidentate coordinated diamine ligand L. In Fig. 6 we compared the catalytic abilities of en, 1,2-pn,

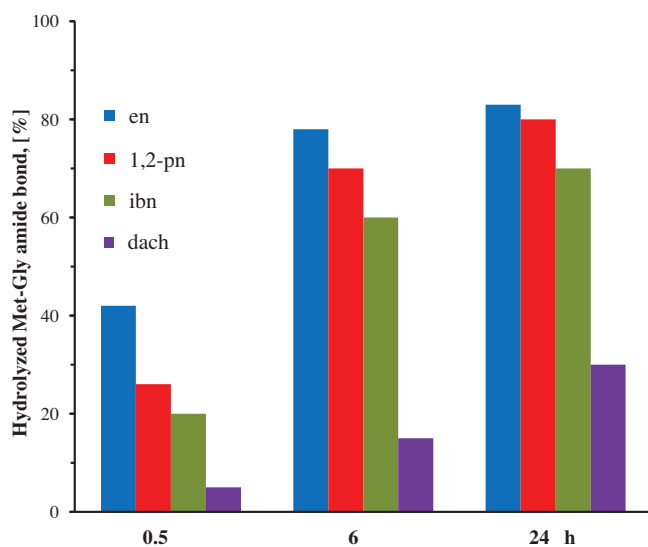


Fig. 5. Time dependence of the hydrolytic cleavage of the Met-Gly amide bond in the Ac-L-Met-Gly dipeptide with an equimolar amount of $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ -type complex.

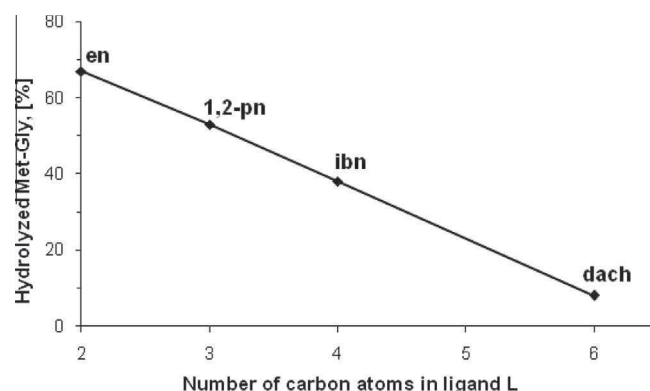


Fig. 6. Dependence of the amount of hydrolyzed Ac-L-Met-Gly dipeptide on the number of carbon atom in the structural skeleton of ligand L of $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex. The amount of the hydrolyzed dipeptide was determined after 2 h of reaction.

ibn and dach Pt(II) binuclear complexes in the cleavage of the Met-Gly amide bond of Ac-L-Met-Gly dipeptide after 2 h of reaction. In spite of the fact that all diamine ligands L in the investigated $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complexes form five-membered chelate ring, it is obvious that the amount of hydrolyzed peptide was decreased by increasing the number of carbon atom in the structural skeleton of ligand L. Our latest findings that inhibition of the hydrolytic reaction can be achieved by structural modification of the catalyst are in accordance with those for different mononuclear Pd(II) complexes and histidine-containing peptides [15]. Summing up together our results related to the hydrolytic cleavage of methionine-containing peptides in the presence of different binuclear $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complexes with previous results with histidine-containing peptides and different mononuclear $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ complexes (L is bidentate coordinated diamine ligand) [15], we can conclude that inhibition of the hydrolytic reaction can be attributed to the steric bulk of the catalyst. These findings can be explained in terms of two possible limiting mechanisms for hydrolytic cleavage of the peptide bond promoted by Pd(II) and Pt(II) complexes [10–12], see Fig 3. First possibility is that the platinum(II) atom coordinated to the methionine side chain polarizes the carbonyl group in the scissile peptide bond and activates its carbon atom toward attack by water molecule from the solvent (*external attack*). For the reaction to occur by this mechanism the Pt(II) and carbonyl oxygen atoms should be proximate. Another possibility is that an aqua ligand from the second Pt(II) atom in the binuclear $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complex is delivered to the carbon atom in the amide bond (*internal delivery*). For the cleavage of the amide bond to occur by this mechanism an aqua ligand at Pt(II) should be proximate to the carbonyl carbon of the scissile amide bond. As can be seen, any of these proposed mechanism requires a close approach of the pendant catalyst to the adjacent peptide bond and this interaction can be hindered by the steric bulk of diamine ligand L in $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complex.

3.2. The reactions of $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complexes with an excess of Ac-L-Met-Gly dipeptide

The reaction between $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ -type complexes and the Ac-L-Met-Gly was followed in an excess dipeptide. The corresponding Pt(II) complex and dipeptide were mixed in 1:2 M ratio, respectively, and all reactions were performed under the above mentioned experimental conditions. The first 1H NMR spectrum ran after 30 min of reaction indicated that the decomposition of the corresponding binuclear $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complex occurred. The singlet appeared in the region at 9.00–9.13 ppm for the bridging pyrazine ligand of $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complex (chemical shifts of this singlet is dependent from the type of Pt(II) complex) decreased while two symmetric multiplets in the range 8.75–9.00 ppm increased. The appearance of these two new multiplets indicates that one Pt(II)–N(pyrazine) bond of Pt(II) complex was broken and that the four pyrazine protons of this ligand coordinated in a monotopic fashion to Pt(II) ion were split into two multiplets because of vicinal and long-range coupling [36]. The decomposition of the binuclear complex was finished after 4 h and final product in this reaction was mononuclear platinum(II) complex with a monodentate bound pyrazine ligand. This mononuclear complex was stable during time and no resonance at 8.66 ppm for free pyrazine ligand [31] was detected in the 1H NMR spectrum after 2 days. However, during this time slow hydrolysis of the Met-Gly amide bond in Ac-L-Met-Gly dipeptide was occurred. This hydrolytic reaction was promoted by the presence mononuclear Pt(II) complex resulted from decomposition of the corresponding binuclear complex. Considering this, we were not able to correlate the rate of hydrolysis of Ac-L-Met-Gly dipeptide

with the nature of the chelating diamine ligand L in $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complex.

4. Conclusions

In this paper, it was demonstrated that by modification of the binuclear $\{[Pt(L)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complex by the introduction of a sterically hindered diamine ligand L, inhibition of the hydrolytic cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine can be achieved. These results should be taken into consideration when designing new polynuclear platinum(II) complexes as effective agents in the hydrolysis of methionine-containing peptides. Studies aimed at investigating these new possible synthetic metallopeptidases are in progress.

Acknowledgements

This work was funded in part by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. 172036).

References

- [1] I.E. Burgeson, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 4299.
- [2] N.M. Milović, N.M. Kostić, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems, Palladium(II) and Platinum(II) Complexes as Synthetic Peptidases*, vol. XXXVIII, Marcel Dekker Inc, 2001, p. 145.
- [3] S. Rajković, M.D. Živković, C. Kallay, I. Sovago, M.I. Djuran, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2009) 8370.
- [4] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 3994.
- [5] L. Zhu, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4566.
- [6] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta* 217 (1994) 21.
- [7] E.N. Korneeva, M.V. Ovchinnikov, N.M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta* 243 (1996) 9.
- [8] D.P. Ašanin, S. Rajković, D. Molnar-Gabor, M.I. Djuran, *Monatsh. Chem.* 135 (2004) 1445.
- [9] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 51.
- [10] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5946.
- [11] S.U. Milinković, T.N. Parac, M.I. Djuran, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 2771.
- [12] X. Chen, L. Zhu, H. Yan, X. You, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1996) 2653.
- [13] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Monatsh. Chem.* 130 (1999) 613.
- [14] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 18 (1999) 3611.
- [15] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 19 (2000) 959.
- [16] Z.D. Petrović, M.I. Djuran, F.W. Heinemann, S. Rajković, S.R. Trifunović, *Bioorg. Chem.* 34 (2006) 225.
- [17] L.D. Pettit, M. Bezer, *Coord. Chem. Rev.* 61 (1985) 97.
- [18] T.G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.* 166 (1997) 313.
- [19] H. Kozłowski, L.D. Pettit, *Stud. Inorg. Chem.* 11 (1991) 530.
- [20] P. Tsieryiotis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* 190–192 (1999) 171.
- [21] M.D. Živković, S. Rajković, U. Rychlewska, B. Warzajtis, M.I. Djuran, *Polyhedron* 26 (2007) 1541.
- [22] S. Rajković, B.D. Glišić, M.D. Živković, M.I. Djuran, *Bioorg. Chem.* 37 (2009) 173.
- [23] M.D. Živković, D.P. Ašanin, S. Rajković, M.I. Djuran, *Polyhedron* 30 (2011) 947.
- [24] G.B. Karet, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 1021.
- [25] (a) N. Sträter, W.N. Lipscomb, T. Kabunde, B. Krebs, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 35 (1996) 2024, and references therein;
(b) N. Sträter, T. Kabunde, P. Tucker, H. Witzel, B. Krebs, *Science* 268 (1995) 1489;
(c) M. Deitrich, D. Münstermann, H. Suerbaum, H. Witzel, *Eur. J. Biochem.* 199 (1991) 105.
- [26] D.E. Wilcox, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2435.
- [27] M.A. Aquino, J. Lim, A.G. Sykes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1992) 2135.
- [28] E. Hough, L.K. Hansen, B. Birknes, K. Jynge, S. Hansen, A. Hordvik, C. Little, E. Dodson, Z. Derewenda, *Nature* 338 (1989) 357.
- [29] A. Volbeda, A. Lahm, F. Sakiyama, D. Suck, *EMBO J.* 10 (1991) 1607.
- [30] E.E. Kim, H.W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* 218 (1991) 449.
- [31] D.P. Ašanin, M.D. Živković, S. Rajković, B. Warzajtis, U. Rychlewska, M.I. Djuran, *Polyhedron* 51 (2013) 255.
- [32] S. Komeda, G.V. Kalayda, M. Lutz, A.L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 1210.
- [33] N. Summa, T. Soldatović, L. Dahlenburg, Ž.D. Bugarčić, R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 461.
- [34] G. Mahal, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 4165.
- [35] K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. del, S. Murdoch, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994) 721.
- [36] M. Willermann, C. Mulcahy, R.K.O. Sigel, M. Morell Cerda, E. Freisinger, P.J.S. Miguel, M. Roitzsch, B. Lippert, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 2093.



Disparate behavior of pyrazine and pyridazine platinum(II) dimers in the hydrolysis of histidine- and methionine-containing peptides and unique crystal structure of $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ with a pair of $\text{NH}\cdots\text{Cl}^-\cdots\text{HN}$ hydrogen bonds supporting the pyridazine bridge



Snežana Rajković^{a,*}, Urszula Rychlewska^{b,*}, Beata Warżajtis^b, Darko P. Ašanin^a, Marija D. Živković^a, Miloš I. Djuran^a

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2013

Accepted 11 September 2013

Available online 20 September 2013

Keywords:

Pyridazine-bridged platinum(II) complex

X-ray crystallography

Methionine- and histidine-containing peptides

Proton NMR spectroscopy

Hydrolysis

ABSTRACT

Treatment of $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ complex with pyridazine lead to the formation of new diplatinum(II) coordination compound $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$, which was characterized by NMR spectroscopy and single-crystal X-ray diffraction. X-ray analysis revealed that the needed support for the pyridazine bridge formation, which in other metal complexes has been mostly provided by additional bridging units coordinated to metal centers, might come from supramolecular interactions such as intermolecular hydrogen bonds. This complex was converted into the corresponding aqua complex, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$, and ^1H NMR spectroscopy was applied for comparison of its catalytic activity with that of the analogous pyrazine-bridged $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex in the hydrolysis of the *N*-acetylated *L*-histidylglycine (Ac-*L*-His-Gly) and *L*-methionyl-glycyl-*L*-histidyl-glycineamide (Ac-*L*-Met-Gly-*L*-His-GlyNH₂). All reactions were performed in the pH range 2.0–2.5 and at 37 °C. It was found that although dimerization, in general, improves significantly the hydrolytic potency of Pt(II) complexes, the pyridazine Pt(II) dimer is significantly less active than its pyrazine Pt(II) analog, which is probably due to an increased steric effect exerted in the former complex by the *ortho*-position of the two nitrogen atoms. Consequently, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ only binds to the methionine sulfur atom of the Ac-*L*-Met-Gly-*L*-His-GlyNH₂ peptide and promotes cleavage of amide bond that involves the carboxylic group of methionine. In contrast, the analogous pyrazine Pt(II) dimer reacts with both methionine and histidine residues of this tetrapeptide, promoting cleavage of amide bonds involving carboxylic groups of both of these anchoring amino acids. Considering these results it can be assumed that in the polypeptide containing both methionine and histidine residues the regioselective cleavage of the amide bond involving only the carboxylic group of methionine can be achieved successfully by using the presently investigated pyridazine-bridged Pt(II) complex.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The observed recent interest in the chemistry of binuclear platinum(II) complexes with bridging pyrazine (pz) ligand has several reasons. First, it was found that this ligand exhibits simple and controllable coordination mode and possesses small steric hindrance, therefore can be utilized as a building unit for molecular architectures with transition metals [1–3]. Another interesting property of this ligand is modification of its basicity as a conse-

quence of coordination to transition-metals [4]. Combined together, the two properties make the pyrazine ligand a good alternative to triazine in studies on anion $\cdots\pi$ interactions in metal complexes, and their utilization for building new molecular architectures. For example, in our recent X-ray investigations of the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ binuclear complex we have demonstrated the existence of anion $\cdots\pi$ interactions between the uncoordinated chloride and the electron-deficient pyrazine ring [5].

The second important reason for the investigation of the pyrazine-bridged Pt(II) complexes stems from our recent findings that the aqua form of the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex is a very effective catalytic reagent in the cleavage of the amide bond in methionine-containing peptides [5]. We have shown that two Pt(II) ions bridged with one aromatic pyrazine ligand are more efficient

* Corresponding authors. Tel.: +381 34 300 251; fax: +381 34 335040 (S. Rajković). Tel.: +48 61 8291 268; fax: +48 61 829 1555 (U. Rychlewska).

E-mail addresses: snezana@kg.ac.rs (S. Rajković), urszular@amu.edu.pl (U. Rychlewska).

in the hydrolysis of the Ac-L-Met-Gly dipeptide than a single Pt(II) ion in the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex. The better catalytic activity of $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complex in comparison with the corresponding mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex has been explained by possible cooperation between two pyrazine-bridged Pt(II) ions. Very recently, we have investigated the hydrolysis of the amide bond in methionine-containing peptides in the presence of various $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ -type complexes (L stands for bidentate-coordinated diamine ligands, such as ethylenediamine, (\pm)-1,2-propylenediamine, isobutylenediamine, *trans*-(\pm)-1,2-diaminocyclohexane) and demonstrated that inhibition of this hydrolytic reaction can be achieved by structural modification of the binuclear $\{[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complex [6].

In the course of the above investigations we now report the synthesis and X-ray structural characteristics of a new pyridazine-bridged $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$ complex. This complex was further converted into the corresponding aqua complex, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pydz})]^{4+}$, and ^1H NMR spectroscopy was applied for comparison of its catalytic activity with that of the analogous pyrazine-bridged $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complex in the hydrolysis of the *N*-acetylated L-histidylglycine (Ac-L-His-Gly) and L-methionyl-glycyl-L-histidyl-glycineamide (Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂). All reactions were performed in the pH range 2.0–2.5 and at 37 °C.

2. Experimental

2.1. Materials

Distilled water was demineralized and purified to a resistance greater than $10\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$. The compounds D₂O, DNO₃, NaOD, ethylenediamine (en), pyrazine (pz), pyridazine (pydz) and K₂[PtCl₄] were obtained from the Aldrich Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The dipeptide L-histidylglycine (L-His-Gly) was obtained from the Sigma Chemical Co. The tetrapeptide L-methionylglycyl-L-histidylglycineamide (L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂) was synthesized by manual solid phase peptide synthesis using Fmoc-chemistry [7,8]. The peptide was purified using semi-preparative RP-HPLC, and analyzed by analytical HPLC and electrospray ionization mass spectrometry. The terminal amino group in these peptides was acetylated by a standard method [9].

2.2. Preparation of the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pz})]\text{Cl}_2$ complexes

The $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pz})]\text{Cl}_2$ was prepared by a published procedure [5]. The purity of the complex was checked by elemental microanalyses and ^1H NMR spectroscopy.

The $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$ complex was synthesized by modification of the procedure published in the literature [5,10,11]. The mononuclear $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ complex was converted into the corresponding monodimethylformamide (dmf) complex $[\text{Pt}(\text{en})(\text{dmf})\text{Cl}]\text{NO}_3$ by treatment with 0.98 equivalents of AgNO₃. To a solution of 62.6 mg (0.368 mmol) of AgNO₃ in 5 cm³ of dmf was added a suspension of 122.6 mg (0.376 mmol) of $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ in 10 cm³ of dmf. The mixture was stirred overnight at room temperature in the dark. The precipitated AgCl was removed by filtration and resulting pale yellow dmf solution of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{dmf})\text{Cl}]\text{NO}_3$ was used as the starting material for the preparation of the required pyridazine-bridged platinum(II) complex, $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$.

The dmf solution of the pyridazine ligand (13.93 μL , 0.188 mmol) was added dropwise to the solution of $[\text{Pt}(\text{en})(\text{dmf})\text{Cl}]\text{NO}_3$. The mixture was stirred at room temperature in the dark for 12 h. The solvent was then rotary evaporated and the residue washed with ether. The crude product was dissolved

in a minimal amount of 0.5 mol/dm³ LiCl aqueous solution. The obtained solution was left overnight in the dark. The pale-yellow precipitate of $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$ was removed by filtration, washed with methanol and then ether, and air-dried. Yield 55.07 mg (40%). *Anal. Calc.* for $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2 = \text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ (FW = 732.25): C, 13.12; H, 2.75; N, 11.48. *Found*: C, 13.16; H, 2.98; N, 11.19%. NMR (^1H and ^{13}C) characterization (D₂O, 200 MHz). ^1H NMR (δ , ppm): 2.78–2.82 (m, 4CH₂, en), 8.14 (m, C4H and C5H pz), 9.58 (m, C3H and C6H, pz); ^{13}C NMR (δ , ppm): 51.10 (4CH₂, en), 137.33 (C4 and C5, pz), 164.36 (C3 and C6, pz).

2.3. Preparation of $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pydz})]^{4+}$ complexes

The $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pz})]\text{Cl}_2$ complexes were converted into the corresponding aqua complexes by treatment with 3.98 equivalents of AgNO₃, respectively, according to a previously published method [12]. In each case, the formed solid AgCl was removed by filtration in the dark, and the fresh solutions of the aqua complexes were kept in a refrigerator and used in the further experiments.

2.4. Measurements

All pH measurements were realized at ambient temperature using an Iskra MA 5704 pH meter calibrated with Fischer certified buffer solutions of pH 4.00 and 7.00. The results were not corrected for the deuterium isotope effect.

Elemental microanalyses for carbon, hydrogen and nitrogen were performed by the Microanalytical Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Belgrade.

The ^1H NMR spectra of D₂O solutions containing TSP (sodium trimethylsilylpropane-3-sulfonate) as the internal reference were recorded with a Varian Gemini 2000 spectrometer (200 MHz). Fresh solutions of the $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pydz})]^{4+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complexes, dipeptide Ac-L-His-Gly and tetrapeptide Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ were prepared separately (the initial concentration of each reactant was 40 mM) and then mixed in an 5 mm NMR tube and spectra were recorded at appropriate time intervals. All reactions were performed at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ and at 37 °C. The reactions between $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pydz})]^{4+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2(\mu\text{-pz})]^{4+}$ complexes and Ac-L-His-Gly dipeptide were investigated in 1:1 while with these complexes and Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ in 1:1 and 2:1 molar ratios, respectively.

2.5. X-ray analysis of the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$ complex

Diffraction data for $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$ complex were measured with a Xcalibur kappa-geometry diffractometer using CrysAlisPro software [13] and monochromated Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073\text{ \AA}$). Crystal data and experimental details are summarized in Table 1. The structure was solved by direct methods using SHELXS-86 [14] and refined by full-matrix least-squares calculations on F^2 with SHELXL-97 [14]. The intensity data were corrected for absorption effects [13]. Anisotropic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atomic positions. Hydrogen atoms attached to the carbon and nitrogen atoms were placed in calculated positions (methylene C–H = 0.97, aromatic C–H = 0.93 and amine N–H = 0.90 Å). During the refinement, isotropic displacement parameters for H-atoms were assigned 20% higher than the isotropic equivalent for the atom to which the H-atom was bonded. All H-atoms were refined as riding. SIEMENS [15] and MERCURY [16] computer graphics programs were used to prepare drawings. Selected bond distances and angles are reported in Table 2. Hydrogen-bond parameters are listed in Table 3. Atomic coordinates, anisotropic displacement parameters and tables of all bond distances and

Table 1
Crystal data for $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$.

Crystal data	
Chemical formula	$[\text{C}_8\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{Pt}_2]^{2+} \cdot 2(\text{Cl})^-$
M_r	732.28
Crystal system, space group	monoclinic, $C2/c$
T (K)	295
a, b, c (Å)	12.1865(2), 10.4368(2), 14.3753(3)
β (°)	103.721(2)
V (Å ³)	1776.19(6)
Z	4
Radiation type	Mo $K\alpha$
μ (mm ⁻¹)	16.34
Crystal size (mm)	$0.25 \times 0.20 \times 0.15$
<i>Data collection</i>	
Diffractometer	Xcalibur
Absorption correction	analytical
$T_{\text{min}}, T_{\text{max}}$	0.082, 0.185
No. of measured, independent and observed $[I > 2\sigma(I)]$ reflections	17632, 1570, 1428
R_{int}	0.030
$(\sin \theta/\lambda)_{\text{max}}$ (Å ⁻¹)	0.595
<i>Refinement</i>	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.019, 0.048, 1.21
No. of reflections	1570
No. of parameters	91
No. of restraints	0
H-atom treatment	H-atom parameters constrained
	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0169P)^2 + 12.551P]$
	where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0.49, -1.10

Table 2
Selected bond distances and angles for $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ (Å, °).

Pt1–N2	2.011 (4)	N3–C3	1.325 (7)
Pt1–N3	2.027 (4)	N3–N3 ⁱ	1.342 (9)
Pt1–N1	2.048 (4)	C2–C1	1.497 (8)
Pt1–Cl1	2.3036 (15)	C3–C4	1.368 (9)
N1–C1	1.471 (7)	C4–C4 ⁱ	1.340 (14)
N2–C2	1.482 (7)		
N2–Pt1–N3	179.55 (18)	C3–N3–N3 ⁱ	118.9 (3)
N2–Pt1–N1	82.77 (17)	C3–N3–Pt1	123.0 (4)
N3–Pt1–N1	97.67 (18)	N3 ⁱ –N3–Pt1	117.82 (13)
N2–Pt1–Cl1	90.68 (13)	N2–C2–C1	107.8 (4)
N3–Pt1–Cl1	88.88 (13)	N1–C1–C2	108.1 (4)
N1–Pt1–Cl1	173.34 (13)	N3–C3–C4	123.0 (6)
C1–N1–Pt1	107.7 (3)	C4 ⁱ –C4–C3	118.0 (4)
C2–N2–Pt1	111.9 (3)		

Symmetry code(s): (i) $-x + 2, y, -z + 1/2$.**Table 3**
N–H...Cl hydrogen-bond parameters for $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$.

$D\cdots H\cdots A$	$D\cdots H$ (Å)	$H\cdots A$ (Å)	$D\cdots A$ (Å)	$D\cdots H\cdots A$ (°)
<i>intramolecular hydrogen bond</i>				
N1–H1B...Cl1 ⁱ	0.90	3.02	3.645(5)	128
<i>intermolecular hydrogen bonds</i>				
N1–H1A...Cl2	0.90	2.28	3.154(5)	166
N1–H1B...Cl2 ⁱⁱ	0.90	2.67	3.425(5)	142
N2–H2A...Cl2 ⁱⁱⁱ	0.90	2.34	3.215(5)	162
N2–H2B...Cl2 ^{iv}	0.90	2.32	3.191(5)	162

Symmetry code(s): (i) $-x + 2, y, -z + 1/2$; (ii) $-x + 3/2, y + 1/2, -z + 1/2$; (iii) $x + 1/2, y + 1/2, z$; (iv) $-x + 3/2, -y + 1/2, -z$.

3. Results and discussion

New binuclear $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ (pydz is pyridazine), which is an analog of the previously reported $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex (pz is pyrazine), has been synthesized and characterized by elemental microanalysis, NMR (¹H and ¹³C) spectroscopy and X-ray crystallography. In the present study these two complexes were converted into the corresponding aqua complexes, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, and their catalytic activity in the hydrolysis of the amide bond of Ac-L-His-Gly and Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ peptides have been compared by using ¹H NMR spectroscopy (Fig. 1). The terminal amino group in these peptides was acetylated to protect its binding to Pt(II). All reactions were performed in the pH range 2.0–2.5 and at 37 °C. As was shown in many previous studies [17–22], acidic solutions are needed to suppress the formation of hydroxo-bridged oligomeric Pt(II) complexes, which are catalytically inactive. The chelate ethylenediamine, bridging pz and pydz ligands in these complexes are inert to substitution and are expected to remain bound to the platinum(II) atom during the reactions with Ac-L-His-Gly and Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ peptides.

3.1. Crystal structure of $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$

The $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ crystallizes in the centrosymmetric space group $C2/c$ with $Z = 4$. Details are given in Table 1. Drawing of the molecular structure of the cation is depicted in Fig. 2. In crystal, the cation $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}^{2+}$ possesses C_2 symmetry, one consequence of which is that the two ethylenediamine five-membered rings present in a molecule adopt conformation of the same helicity, which is δ for the molecule presented in Fig. 2.¹ This is contrasted with the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}^{2+}$ complex cation, in which the rings adopted antipodal conformations. Selected bond distances and angles are given in Table 2. The Pt–N and Pt–Cl bond lengths are in the expected ranges; similar distances were found in the crystal structures of other platinum complexes with an $[\text{N}_3\text{Cl}]$ environment. The tilt angle between the neighboring platinum coordination planes, defined by three nitrogen atoms and a chloride ion, is 52.0(1)°, while the interplanar angle between the Pt coordination plane and the pyridazine ring plane amounts to 76.5(2)°. In the analogous pyrazine complex the two values were markedly different, i.e. 0.0 and 58.4(1)°, respectively. The Pt atoms are square-planar coordinated (angle sum is 360.0°), and no significant deviation from the right angle is present within the $[\text{PtN}_3\text{Cl}]^+$ unit. As a result of the two *ortho*-arranged nitrogen donor atoms of pyridazine, the distance between intramolecular Pt atoms (3.2535(4) Å) is shorter than a double van der Waals radius for Pt [$1.72 \times 2 = 3.44$ Å], and much shorter than in the closely related $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}^{2+}$ cation (6.7890(3) Å) [5] but comparable to the Pt...Pt distances found in several multiply-bridged platinum(II) complexes. The pydz bridge is supported by a pair of intramolecular hydrogen bonds between the amine group of one platinum unit and the chlorido ligand of another platinum unit, which provides an additional stabilization of the dimeric structure and causes noticeable crowding around the Pt(II) centers and the chlorido ligands (Fig. 3). However, a key structural feature of the investigated bisplatinum(II) complex is a pair of $\text{NH}\cdots\text{Cl}^-\cdots\text{HN}$ hydrogen bond linkers (Cl2 and its two-fold equivalent) that play a role of supramolecular supporters of a bridge formed between the two Pt(II) metal centers by the coordinated pyridazine (Fig. 3). This is contrasted with the function of an uncoordinated chloride anion in a closely related $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ complex, in which the Cl^- anions, located above and below the

¹ It should be noted that in this centrosymmetric crystal there is an equal amount of molecules possessing the ethylenediamine rings in λ conformation.

angles have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre (Deposition No. CCDC 946083).

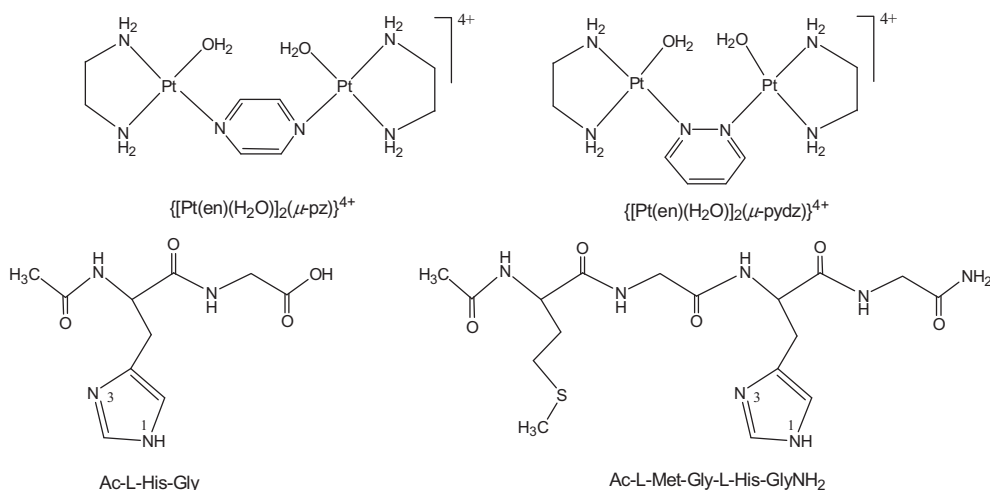


Fig. 1. The binuclear platinum(II) complexes and *N*-acetylated histidine- and methionine-containing peptides employed in this study.

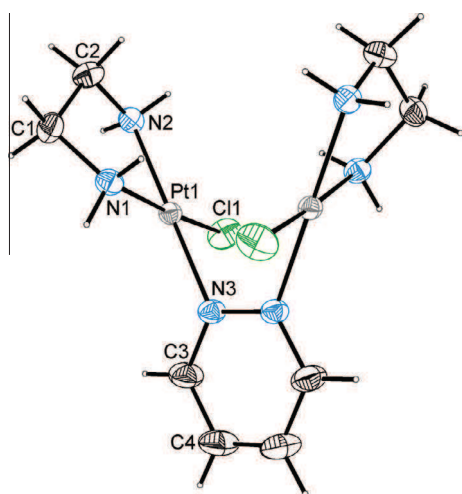


Fig. 2. Perspective view of the $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pydz})\}^{2+}$ complex cation. The molecular cation occupies two-fold symmetry site. The symmetry independent part of the complex is marked by labeled atoms. Displacement ellipsoids are drawn at 40% probability level and H-atoms are shown as spheres of arbitrary radii.

pyrazine rings, are involved in anion $\cdots \pi$ interactions with these aromatic rings, thus stabilizing crystal rather than molecular structure. Platinum(II) pydz complexes deposited in the Cambridge Structural Data Base (CSD ver. 5.34 + 2 updates) [23] contain solely monodentate pyridazine ligand (POSPIW & POSPOC [24]), while both monodentate and bidentate bridging coordination are seen in Pt(IV) complexes (PILMUS [25] and ZEWKOB [26] monodentate; HERCEM [27] bidentate bridging). Moreover, the CSD search has revealed that in 85 out of 86 structures, in which pyridazine ligand is coordinated to two metal centers, a single pyridazine bridge is either supported by other pyridazine bridges or by second bridging unit(s) such as metal–metal bond, coordinated sulfido, sulfato, oxido, hydroxido, chlorido, iodido, methyleno, azido, nitrato, carbonylo, perchlorato, thiocyanato groups, or other binucleating macrocycles and rings, the only exception being the presence of a single pyridazine bridge in infinite helical complexes with silver salts [28]. In this respect, the reported complex cation, containing a pair of $NH \cdots Cl \cdots HN$ hydrogen bond linkers that play a role of supramolecular supporters of a bridge formed between two metal centers by the coordinated pyridazine is unprecedented.

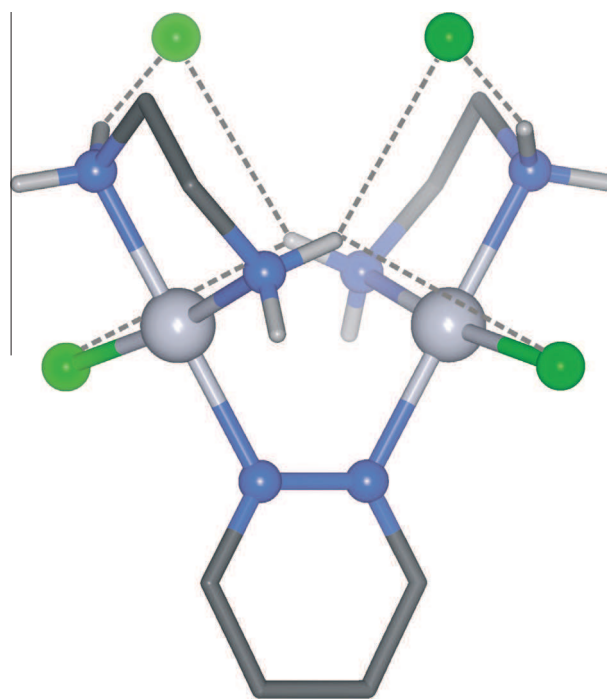


Fig. 3. View of the $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pydz})\}Cl_2$ complex showing a support provided by the hydrogen-bond bridges for the bidentate bridging function of the pyridazine ring.

3.2. Crystal packing of the $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pydz})\}Cl_2$ complex

In the crystal lattice the complex cations are arranged in (001) layers (Fig. 4). The molecules in the neighboring layers are related by the *c*-glide plane and are shifted with respect to the ones lying in the neighboring layers. The chloride anions are also located in these layers. The amine ligands are donors of hydrogen bonds toward the chloride atoms acting as fourfold acceptors (Fig. 4, Table 3). As in the crystal structure of $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pz})\}Cl_2$ complex, the coordinated chloride anion (Cl1) is not involved in hydrogen bonding or any other specific intermolecular interactions.

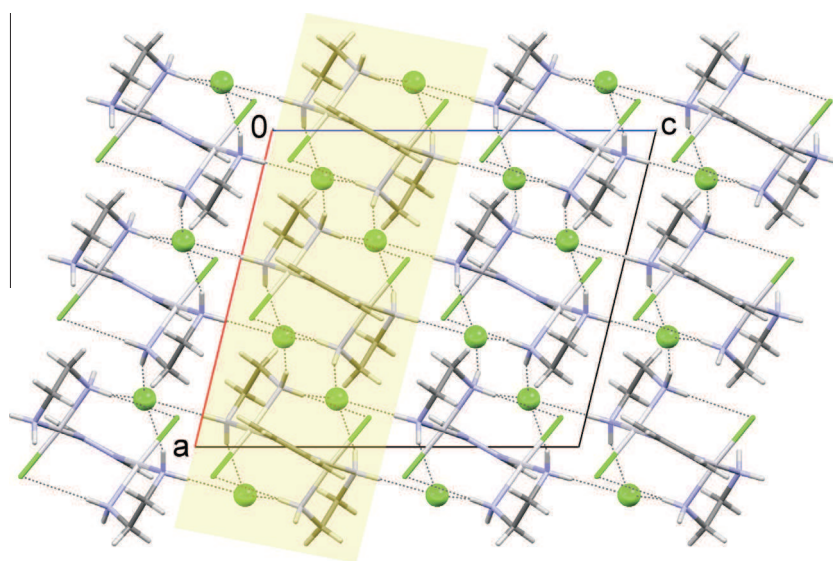


Fig. 4. Packing of the $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu\text{-pydz})\}Cl_2$ complex molecules viewed along the b -direction. Shaded area displays one of the (001) molecular layers.

3.3. 1H NMR comparative study of the hydrolysis of Ac-L-His-Gly and Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ peptides in the presence of $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ and $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ complexes

3.3.1. Ac-L-His-Gly

When an equimolar amount of $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ was incubated with Ac-L-His-Gly dipeptide at 37 °C and $2.0 < pH < 2.5$ only two NMR detectable $\{[Pt(en)(Ac\text{-}L\text{-}His\text{-}Gly\text{-}N3)](\mu\text{-pz})[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$ and $\{[Pt(en)(Ac\text{-}L\text{-}His\text{-}Gly\text{-}N1)](\mu\text{-pz})[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$ complexes were observed in the reaction mixture after 48 h (Fig. 5a and Table 4). These complexes, distinguished on the basis of the chemical shifts of imidazole protons, were linkage isomers of each other with a unidentate coordination of binuclear $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex via the N3 or N1 atom to the imidazole ring of Ac-L-His-Gly dipeptide. The chemical shifts of the C2H and C5H imidazole protons for these complexes were compared with those for the reaction of Ac-L-His-Gly dipeptide with mononuclear $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ [17,20–22] (en is bidentate coordinated ethylenediamine) and $[Pt(dien)Cl]^+$ complexes [29]. It follows from this comparison, that the Pt(II)–peptide complexes formed in the reaction of the binuclear $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex and Ac-L-His-Gly are identical to those formed in the reaction of this dipeptide with $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ and $[Pt(dien)Cl]^+$ complexes (Table 4). The previous experiments with various histidine-containing peptides and various mononuclear $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ type complexes (L stands for the bidentate coordinated diamine ligand) showed that only monodentate coordination of the peptide via the N3 atom of the imidazole to the Pd(II) ion effects hydrolytic cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of histidine [17,20–22,30–33]. This was explained by the fact that this coordination mode permits the necessary close approach of the Pd(II) ion and its aqua ligand to the scissile peptide bond. In the reaction between $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ and Ac-L-His-Gly, no release of either ethylenediamine or pyrazine ligands from Pt(II) was observed. During this reaction, the 1H NMR resonance at 3.89 ppm due to the Gly protons of Ac-L-His-Gly dipeptide decreased, while that at 3.77 ppm of free glycine increased. Upon addition of glycine to the reaction mixture, its resonance was enhanced. This undoubtedly confirmed that in the Ac-L-His-Gly dipeptide the hydrolysis of the amide bond involving the carboxylic group of histidine has occurred. The concentrations of Ac-L-His-Gly and the hydrolysis products were determined from the known initial concentration of the dipeptide and from the integrated resonance of the free glycine. The cleavage of Ac-L-His-Gly was regioselective

and about 50% of the His-Gly bond in this dipeptide has cleaved after 48 h.

In the reaction between $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ and Ac-L-His-Gly, under the above mentioned experimental conditions, no binding of the platinum(II) complex to either N3 or N1 nitrogen atoms of imidazole ring was observed during 48 h. As a consequence of the absence of Pt(II) coordination to the imidazole ring, no hydrolysis of any of the amide bonds has occurred. Difference in the reactivity of the two platinum(II) complexes, $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ and $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, with imidazole ring of the Ac-L-His-Gly can without doubt be attributed to the presence of different bridging ligand in these complexes.

3.3.2. Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂

Mixing of the $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ and $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ complexes with an equimolar amount of Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ at 37 °C and $2.0 < pH < 2.5$ resulted in the spontaneous coordination of these two platinum(II) complexes to the methionine sulfur atom of the tetrapeptide. The coordination of Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ through the sulfur atom of methionine shifted the resonance for the methyl protons of free methionine at 2.10 ppm downfield to 2.50 ppm and this reaction was completed after 10 min for the $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex and after 30 min for the $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ complex. These chemical shifts are in accordance with those previously reported for the reaction of platinum(II) complexes with different methionine-containing molecules [5,6,22,30,34,35]. With an equimolar amounts of the reactants, no coordination of the investigated binuclear Pt(II) complexes to the nitrogen atoms of the imidazole ring was observed. The monodentate coordination of Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ to the $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ and $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ complexes resulted in formation of two platinum(II)–peptide complexes $\{[Pt(en)(Ac\text{-}L\text{-}Met\text{-}Gly\text{-}L\text{-}His\text{-}GlyNH_2\text{-}S)](\mu\text{-pz})[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$ and $\{[Pt(en)(Ac\text{-}L\text{-}Met\text{-}Gly\text{-}L\text{-}His\text{-}GlyNH_2\text{-}S)](\mu\text{-pydz})[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$ both containing sulfur-coordinated methionine side chain (Fig. 5b). These complexes are intermediate products as they further promote the regioselective cleavage of the Met-Gly amide bond in the Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ tetrapeptide. This hydrolytic reaction can be monitored successfully using the 1H NMR spectroscopy by comparing the glycine protons (Gly next to Met) in the Pt(II)–tetrapeptide complexes with those in the Gly-L-His-GlyNH₂ hydrolytic product. The resonance at 3.94 ppm corresponding to the glycine protons of the tetrapeptide

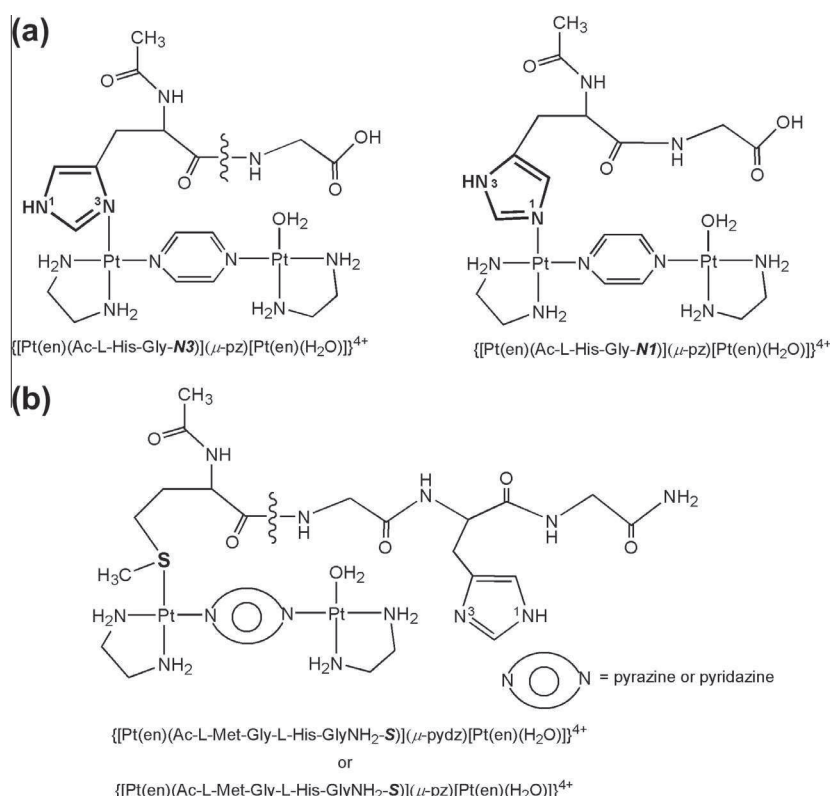


Fig. 5. (a) Two Pt(II)-peptide complexes formed in the reaction of Ac-L-His-Gly with $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$. The same mode of histidine coordination was observed in the reaction of Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ tetrapeptide with an excess of $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complex (1:2 molar ratio, respectively). No coordination of histidine side chain was observed in the reaction between these two peptides and analog $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pydz)\}^{4+}$ complex. (b) Schematic drawing of the hydrolytically active methionine bound Pt(II)-peptide complex formed in the reaction of $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ and $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pydz)\}^{4+}$ complexes with an equimolar amount of Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ tetrapeptide.

Table 4

Identification of the Pt(II)-peptide complexes according to the chemical shifts of the imidazole protons for the reactions of $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ complex with Ac-L-His-Gly and Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ peptides. All reactions were performed in the pH range 2.0 < pH < 2.5 and 37 °C. No coordination of $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pydz)\}^{4+}$ with histidine side chain was observed in the reaction with these peptides. These chemical shifts were compared with those for the reactions of $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ and $[Pt(dien)Cl]^+$ with Ac-L-His-Gly [20,29] and $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ with Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ [30].

Peptide/Pt(II)-peptide complex	Imidazole protons (δ , ppm)		Ref.
	C2H	C5H	
Ac-L-His-Gly	8.61	7.33	This work
$\{[Pt(en)(Ac-L-His-Gly-N3)](\mu-pz)[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$	8.09	7.10	This work
$\{[Pt(en)(Ac-L-His-Gly-N1)](\mu-pz)[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$	7.96	6.95	This work
$[Pd(en)(H_2O)(Ac-L-His-Gly-N3)]^{2+}$	8.03	7.11	[20]
$[Pd(en)(H_2O)(Ac-L-His-Gly-N1)]^{2+}$	7.87	6.89	[20]
$[Pt(dien)(Ac-L-His-Gly-N3)]^{2+}$	8.00	7.12	[29]
$[Pt(dien)(Ac-L-His-Gly-N1)]^{2+}$	7.88	6.85	[29]
Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH ₂	8.63	7.31	This work
$\{[Pt(en)(Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH_2-N3)](\mu-pz)[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$	8.07	7.09	This work
$\{[Pt(en)(Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH_2-N1)](\mu-pz)[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$	7.92	6.92	This work
$\{[Pt(dien)(\mu-Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH_2-N3)][Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$	8.14	7.10	[30]
$\{[Pt(dien)(\mu-Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH_2-N1)][Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$	7.88	6.89	[30]

^a pH 7.0.

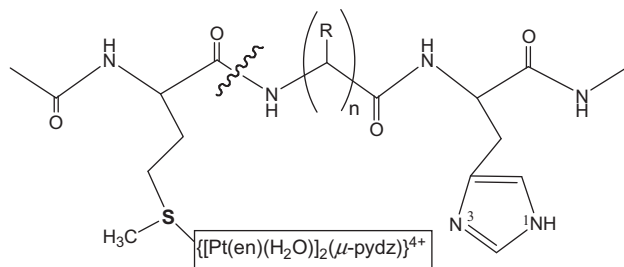


Fig. 6. Schematic presentation of the regioselective cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine in the theoretically proposed polypeptide containing both methionine and histidine residues, promoted by the binuclear $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pydz)\}^{4+}$ complex.

attached to platinum(II) in the $\{[Pt(en)(Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH_2-S)](\mu-pz)[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$ and $\{[Pt(en)(Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH_2-S)](\mu-pydz)[Pt(en)(H_2O)]\}^{4+}$ complexes has decreased while that at 3.85 ppm for Gly-L-His-GlyNH₂ has increased. Upon addition of Gly-L-His-GlyNH₂ tripeptide to the reaction mixture, the resonance at 3.85 ppm was enhanced. The amount of the hydrolyzed Met-Gly amide bond in the Pt(II)-tetrapeptide complexes was determined by integration of the above mentioned resonances. It was found that after 48 h, 80% of this amide bond was hydrolyzed with $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ and only 50% with $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pydz)\}^{4+}$.

The hydrolytic cleavage of the Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ tetrapeptide was studied in the presence of an excess of $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$ and $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pydz)\}^{4+}$ complexes. The Pt(II) complex and the peptide were mixed in 2:1 molar ratio, respectively, and all reactions were performed at 2.0 < pH < 2.5

and 37 °C. In the reaction of $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ with Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂, along with $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH}_2\text{-S})(\mu\text{-pz})[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]\}^{4+}$ complex, two new Pt(II)-tetrapeptide complexes were detected in solution. These new complexes resulted from coordination of $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex to either N3 or N1 nitrogen atom of the imidazole ring. The structures of these complexes were identical to those for the reaction of the $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex with Ac-L-His-Gly dipeptide (Fig. 5a and Table 4). In the reaction between $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ complex and Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ performed in an excess of the Pt(II) complex two amide bonds had been hydrolyzed. We found that along with the hydrolysis of the Met-Gly amide bond promoted by coordination of the Pt(II) to the methionine side chain, the other amide bond of this tetrapeptide, namely the one involving the carboxylic group of histidine, was also cleaved. As we discussed for Ac-L-His-Gly dipeptide, the cleavage of the latter bond in Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ resulted from the binding of Pt(II) to N3 imidazole nitrogen of the histidine side chain. During hydrolysis of this amide bond, the ¹H NMR resonance at 3.94 ppm due to the GlyNH₂ protons of Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ decreased, while that at 3.70 ppm of free GlyNH₂ increased. Upon addition of GlyNH₂ to the reaction mixture, its resonance was enhanced. The amount of the hydrolyzed His-GlyNH₂ amide bond was determined from the known initial concentration of tetrapeptide and from the integrated resonance of free GlyNH₂. We have found that in the presence of an excess of the $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$ more than 80% of the Met-Gly and 28% of His-GlyNH₂ amide bonds in the Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ tetrapeptide were cleaved after 48 h.

When Ac-L-Met-Gly-L-His-GlyNH₂ tetrapeptide was mixed with an excess of $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ complex (1:2 molar ratio, respectively), under the above mentioned experimental conditions, only hydrolysis of the amide bond involving the methionine carboxylic group of amino acid (Met-Gly amide bond) has occurred. As a consequence of the absence of the Pt(II) coordination to the imidazole ring no hydrolysis of the amide bond involving the histidine carboxylic group has occurred. This can be attributed to the large steric hindrance between this complex and the imidazole ring of the histidine side chain.

4. Conclusions and prospects

Our investigations aimed at the catalytic activity between two binuclear Pt(II)-aqua complexes, $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ and $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pz})\}^{4+}$, in the hydrolysis of the amide bond of methionine- and histidine-containing peptides point that the pyrazine-bridged Pt(II) complex is more reactive with these peptides than the analogous pyridazine complex. While the $\{[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]_2(\mu\text{-pydz})\}^{4+}$ complex only reacts with methionine sulfur atom and promotes the sole cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of this amino acid, the analogous pyrazine Pt(II) dimer reacts with both residues promoting cleavage of the amide bonds involving the carboxylic groups of both methionine and histidine. Such catalytic disparity might be explained by a hidden position of the Pt(II) centers in the $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ complex caused by their close proximity due to the *ortho*-substitution (the two Pt(II) centers are only 3.2535(4) Å apart), compared to the separation of 6.7890(3) Å in $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$, and an additional steric hindrance from the amine ligand, which in $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ is hydrogen bonded to the chlorido ligand belonging to the other Pt(II) center. Displacement of this chlorido ligand by a water molecule would make this hydrogen bond shorter

due to the shortening of the metal–ligand bond distance. Considering these results we can propose that the regioselective cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine in the polypeptide containing both methionine and histidine residues can be achieved successfully by using the presently investigated pyridazine-bridged Pt(II) complex (Fig. 6). This finding should be taken into consideration in designing new binuclear Pt(II) complexes for the regioselective cleavage of peptides and proteins. Studies aimed at investigating these new possible synthetic metalpeptidases are in progress.

Acknowledgment

This work was funded in part by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. 172036).

References

- [1] M. Willermann, C. Mulcahy, R.K.O. Sigel, M. Morell Cerda, E. Freisinger, P.J.S. Miguel, M. Roitzsch, B. Lippert, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 2093.
- [2] S. Derossi, M. Casanova, E. Iengo, E. Zangrando, M. Stener, E. Alessio, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 11243.
- [3] K. Kumazawa, K. Biradha, T. Kusakawa, T. Okano, M. Fujita, *Angew. Chem.* 115 (2003) 4039.
- [4] L.D. Slep, S. Pollak, J.A. Olabe, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 4369.
- [5] D.P. Ašanin, M.D. Živković, S. Rajković, B. Waržajtis, U. Rychlewska, M.I. Djuran, *Polyhedron* 51 (2013) 255.
- [6] S. Rajković, D.P. Ašanin, M.D. Živković, M.I. Djuran, *Polyhedron* 65 (2013) 42.
- [7] R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149.
- [8] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C.J. Logan, R.C. Sheppard, B.J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1978) 537.
- [9] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 3994.
- [10] H. Hohmann, R. van Eldik, *Inorg. Chim. Acta* 174 (1990) 87.
- [11] S. Komeda, G.V. Kalayda, M. Lutz, A.L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 1210.
- [12] G. Mahal, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 4165.
- [13] CrysAlis Pro, Agilent Technologies, Yarnton, Oxfordshire, England (2012).
- [14] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A* 64 (2008) 112.
- [15] Stereochemical Workstation Operation Manual, Release 3.4, Siemens Analytical X-Ray Instruments Inc., Madison, WI, USA (1989).
- [16] I.J. Bruno, J.C. Cole, P.R. Edgington, M. Kessler, C.F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, *Acta Crystallogr., Sect. B* 58 (2002) 389.
- [17] S.U. Milinković, T.N. Parac, M.I. Djuran, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 2771.
- [18] M.D. Živković, S. Rajković, U. Rychlewska, B. Waržajtis, M.I. Djuran, *Polyhedron* 26 (2007) 1541.
- [19] S. Rajković, B.D. Glišić, M.D. Živković, M.I. Djuran, *Bioorg. Chem.* 37 (2009) 173.
- [20] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 51.
- [21] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5946.
- [22] N.M. Milović, N.M. Kostić, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems, Palladium(II) and Platinum(II) Complexes as Synthetic Peptidases*, Marcel Dekker Inc., 2001. Vol. XXXVIII, p. 145.
- [23] F.H. Allen, *Acta Crystallogr., Sect. B* 58 (2002) 380.
- [24] P.A. Kozmin, T.B. Larina, M.D. Surazhskaya, A.N. Zhilyaev, G.N. Kuznetsova, *Zh. Neorg. Khim. (Russ.)* 38 (1993) 859 (*Russ. J. Inorg. Chem.*).
- [25] E.W. Abel, E.S. Blackwell, P.J. Heard, K.G. Orrell, V. Sik, M.B. Hursthouse, M.A. Mazid, K.M.A. Malik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1994) 445.
- [26] E.W. Abel, P.J. Heard, K.G. Orrell, M.B. Hursthouse, K.M.A. Malik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1995) 3165.
- [27] E.W. Abel, P.J. Heard, K.G. Orrell, M.B. Hursthouse, K.M.A. Malik, *Polyhedron* 13 (1994) 2501.
- [28] L. Carlucci, G. Ciani, D.M. Proserpio, A. Sironi, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 5941.
- [29] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Aust. J. Chem.* 53 (2000) 645.
- [30] S. Rajković, M.D. Živković, C. Kállay, I. Sóvágó, M.I. Djuran, *Dalton Trans.* (2009) 8370.
- [31] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Monatsh. Chem.* 130 (1999) 613.
- [32] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 19 (2000) 959.
- [33] Z.D. Petrović, M.I. Djuran, F.W. Heinemann, S. Rajković, S.R. Trifunović, *Bioorg. Chem.* 34 (2006) 225.
- [34] I.E. Burgeson, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 4299.
- [35] K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. del. S. Murdoch, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994) 721.

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а ДАРКО П. АЦАНИН
број уписа 14/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ И ДИНУКЛЕАРНИХ
КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ИСПИТИВАЊЕ ЊИХОВИХ РЕАКЦИЈА СА ПЕПТИДИМА

- 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.

Потпис аутора

У Крагујевцу, 31.03.2015

Дарко Ацанин

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора ДАРКО П. АШАНИН
Број уписа 14/06
Студијски програм ДОКТОРСKE АКАДЕМСKE СТУДИЈЕ
Наслов рада СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПОНОМОНУКЛЕАРНИХ И ДИМУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА МАТРИКСА(II) И ИСПИТИВАЊЕ НИХОВИХ РЕАКЦИЈА СА ПЕРИТИМА
Ментор Др Снежана Рајковић

Потписани ДАРКО П. АШАНИН

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, 31.03.2015.

Дарко Ашанин

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ И ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ИСПИТИВАЊЕ ВИДОВИХ РЕАКЦИЈА СА ПЕПТИДИМА
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, 31. 03. 2015.

