



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Јелена М. Вујић

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПОТЕНЦИЈАЛНА
ЦИТОТОКСИЧНОСТ *O,O'*-ДИАЛКИЛ-(*S,S*)-
-ЕТИЛЕНДИАМИН-*N,N'*-ДИ-2-(4-МЕТИЛ)-
ПЕНТАНОАТА И ОДГОВАРАЈУЋИХ ПАЛАДИЈУМ(II),
ПЛАТИНА(II) И ПЛАТИНА(IV) КОМПЛЕКСА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2012.

I. Аутор

Име и презиме: **Јелена М. Вујић**
Датум и место рођења: **11.08.1983. Крагујевац**
Садашње запослење: **Агрономски факултет, Чачак**

II. Докторска дисертација

Наслов: **Синтеза, карактеризација и потенцијална цитотоксичност *O,O'*-диалкил-*(S,S)*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентаноата и одговарајућих палладијум(II), платина(II) и платна(IV) комплекса**

Број страница: **118+10**

Број слика: **36**

Број библиографских јединица: **120**

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

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

Ментор: **Проф. др Срећко Р. Трифуновић**

III. Оцена и одбрана

Датум пријаве тезе: 12.05.2011.

Комисија за оцену теме и подобности кандидата:

1. **Др Срећко Р. Трифуновић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, Неорганска хемија**
2. **Др Горан Н. Калуђеровић, научни сарадник, Institut für Chemie Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Немачка, Неорганска хемија**
3. **Др Тибор Ј. Сабо, редовни професор Хемијског факултета у Београду, Неорганска хемија**
4. **Др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу, Микробиологија и имунологија; Онкологија**

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за преглед, оцену и одбрану дисертације:

1. **Др Срећко Р. Трифуновић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, Неорганска хемија**
2. **Др Горан Н. Калуђеровић, научни сарадник, Institut für Anorganische Chemie, Fakultät für Chemie und Mineralogie, Universität Leipzig, Немачка, Неорганска хемија**
3. **Др Тибор Ј. Сабо, редовни професор Хемијског факултета у Београду, Неорганска хемија**
4. **Др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу, Микробиологија и имунологија; Онкологија**
5. **Др Биљана В. Петровић, доцент ПМФ-а у Крагујевцу, Неорганска хемија**

Датум одбране дисертације:

Посебна ми је част и задовољство да се овом приликом најтоплије захвалим свом ментору, професору др Срећку Трифуновићу, како на предложеној теми и несебичном ангажовању током целе израде докторске дисертације, тако и на дивној сарадњи и разумевању.

Члановима комисије, професорима др Горану Калуђеровићу, др Тибору Сабоу, др Небојши Арсенијевићу и др Биљани Петровић захваљујем на корисним сугестијама и на томе што су се радо прихватили оцене овог рада; а посебно др Горану Калуђеровићу коме дугујем велику личну и професионалну захвалност за пружену помоћ, подршку, подстицање и савете који су допринели квалитету рада.

Такође, захваљујем се колегама и пријатељима из лабораторије као и др Бојани Змејковски на помоћи која је присутна од самог почетка докторских студија.

На крају, захваљујем се својој породици на стрпљењу и безграничној љубави.

САДРЖАЈ

ИЗВОД	1
SUMMARY	3
1. УВОД	5
2. ОПШТИ ДЕО	9
2.1. Антиканцерогена активност комплекса платине	11
2.1.1. Историјат открића.....	11
2.2. Синтеза и структура комплекса паладијум(II), платина(II) и платина(IV) са лигандима edda-типа	15
2.2.1. Комплекси платине(II) и платине(IV)	17
2.2.2. Комплекси паладијума(II).....	22
2.3. Цитотоксичност платина(II), платина(IV) и паладијум(II) комплекса	26
2.3.1. Цитотоксичност комплекса платине(II) и платине(IV) са edda- и R ₂ edda-типом лиганада.....	32
2.3.2. Цитотоксичност комплекса паладијума(II).....	37
2.4. Циљ и задатак докторске дисертације	40
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	41
3.1. Синтезе лиганада	43
3.1.1. Синтеза (S,S)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, (S,S)-H ₂ eddl.....	43
3.1.2. Синтезе диалкил R ₂ -(S,S)-eddl (L1-L4) естара (S,S)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, (S,S)-H ₂ eddl....	44
3.2. Синтезе комплекса	47

3.2.1. Комплекси паладијума(II): [PdCl ₂ L1]:	
дихлоридо(<i>O, O'</i> -диетил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-	
-пентаноат)паладијум(II), [PdCl ₂ {(<i>S, S</i>)-Et ₂ eddl}], [PdCl ₂ L2]:	
дихлоридо(<i>O, O'</i> -дипропил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-	
-пентаноат)паладијум(II), [PdCl ₂ {(<i>S, S</i>)-Pr ₂ eddl}], [PdCl ₂ L3]:	
дихлоридо(<i>O, O'</i> -дибутил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-	
-пентаноат)паладијум(II), [PdCl ₂ {(<i>S, S</i>)-Bu ₂ eddl}], [PdCl ₂ L4]:	
дихлоридо(<i>O, O'</i> -дипентил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-	
-пентаноат)паладијум(II), [PdCl ₂ {(<i>S, S</i>)-Pe ₂ eddl}].....	47
3.2.2. Комплекси платине(II): [PtCl ₂ L1]:	
дихлоридо(<i>O, O'</i> -диетил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-	
-пентаноат)платина(II), [PtCl ₂ {(<i>S, S</i>)-Et ₂ eddl}], [PtCl ₂ L2]:	
дихлоридо(<i>O, O'</i> -дипропил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-	
-пентаноат)платина(II), [PtCl ₂ {(<i>S, S</i>)-Pr ₂ eddl}], [PtCl ₂ L3]:	
дихлоридо(<i>O, O'</i> -дибутил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-	
-пентаноат)платина(II), [PtCl ₂ {(<i>S, S</i>)-Bu ₂ eddl}], [PtCl ₂ L4]:	
дихлоридо(<i>O, O'</i> -дипентил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-	
пентаноат)платина(II), [PtCl ₂ {(<i>S, S</i>)-Pe ₂ eddl}].....	50
3.2.3. Комплекси платине(IV): [PtCl ₄ L1]:	
тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -диетил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-	
-(4-метил)-пентаноат)платина(IV), [PtCl ₄ {(<i>S, S</i>)-Et ₂ eddl}], [PtCl ₄ L2]:	
тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -дипропил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-	
-(4-метил)-пентаноат)платина(IV), [PtCl ₄ {(<i>S, S</i>)-Pr ₂ eddl}], [PtCl ₄ L3]:	
тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -дибутил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-	
-(4-метил)-пентаноат)платина(IV), [PtCl ₄ {(<i>S, S</i>)-Bu ₂ eddl}], [PtCl ₄ L4]:	
тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -дипентил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-	
-(4-метил)-пентаноат)платина(IV), [PtCl ₄ {(<i>S, S</i>)-Pe ₂ eddl}].....	52
3.3. Мерења.....	54
3.3.1. Елементална анализа.....	54
3.3.2. Инфрацрвени спектри.....	54
3.3.3. ¹ H и ¹³ C NMR спектри.....	54

3.4. Рендгенска структурна анализа.....	55
3.4.1. <i>O,O'</i> -Дипропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)- -пентаноат дихидрохлорид, (<i>S,S</i>)-Pr ₂ eddl·2HCl.....	55
3.5. DFT прорачуни.....	56
3.6. <i>In vitro</i> антитуморска активност.....	57
3.6.1. Ћелијске линије.....	57
3.6.2. Хранљиви медијум.....	57
3.6.3. Третман ћелијских линија.....	57
3.6.4. CLL ћелије.....	58
3.6.5. Одређивање ћелијског преживљавања.....	59
3.6.5.1. МТТ тест.....	59
3.6.5.2. Кристал виолет – колориметријски тест.....	62
3.6.6. Тест за квантификацију апоптозе (AnnexinV/PI).....	62
3.6.7. Анализа ћелијског циклуса.....	63
3.6.8. Припрема узорака за анализу ћелијског циклуса на проточном цитометру.....	64
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	65
4.1. Синтезе лиганата.....	67
4.1.1. Синтеза (<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, (<i>S,S</i>)-H ₂ eddl.....	67
4.1.2. Синтезе диалкил R ₂ eddl·2HCl естара (<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> - -ди-2-(4-метил)-пентанске.....	68
4.1.3. Синтеза комплекса паладијум(II), платина(II) и платина(IV).....	69
4.2. Инфрацрвени спектри.....	71
4.3. ¹H и ¹³C NMR спектри.....	72
4.4. Кристална структура <i>O,O'</i>-дипропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин-<i>N,N'</i>-ди- -2-(4-метил)-пентаноат дихидрохлорида, (<i>S,S</i>)-Pr₂eddl·2HCl.....	78
4.5. DFT прорачуни.....	81
4.6. <i>In vitro</i> антитуморска активност.....	83
4.6.1. Резултати <i>in vitro</i> цитотоксичне активности према ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (CLL).....	83

4.6.2. Резултати <i>in vitro</i> цитотоксичне активности према циљни малигним ћелијама (SW480, MDA-MB-361, MDA-MB-453, Jurkat и K562).....	84
4.6.3. Резултати теста за квантификацију апоптозе (AnnexinV/PI).....	88
4.6.4. Ћелијски циклус.....	91
5. ЗАКЉУЧАК.....	95
6. ЛИТЕРАТУРА.....	99
БИОГРАФИЈА.....	109
РАДОВИ У КОЈИМА СУ ШТАМПАНИ РЕЗУЛТАТИ ОВЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	111
НАУЧНО-ИСТРАЖИВАЧКИ РАД.....	113
7. ПРИЛОГ.....	117

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

R	алкил
Me	метил
Et	етил
Pr	пропил
Bu	бутил
Pe	пентил
<i>n</i> -	нормални
<i>i</i> -	изо
<i>c</i> Pe	циклопентил
Cy	циклохексил
edta ⁴⁻	етилендамин- <i>N,N,N',N'</i> -тетраацетато јон
edda ²⁻	етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетато јон
eddp ²⁻	етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноато јон
eddp ²⁻	етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-пропаноато јон
eddl ²⁻	етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноато јон
eddv ²⁻	етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(3-метил)-бутаноато јон
pdda ²⁻	пропилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетато јон
edma ⁻	етилендиамин- <i>N</i> -моноацетато јон
en	етилендиамин
DNK	дезоксирибонуклеинска киселина
OAc	О-ацетил
heen	<i>N</i> -(2-хидроксиетил)етилендиамин
he ₂ en	<i>N,N'</i> -бис(2-хидроксиетил)етилендиамин
dach	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-циклохексанаминам
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум- -бромид
SD	стандардна девијација
PBMC	мононуклеарне ћелије периферне крви (engl: Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PHA	фитохемаглутинин
HeLa	хумана ћелијска линија аденокарцинома материце
Fem-x	хумана ћелијска линија малигног меланома
K562	хумана ћелијска линија мијелоидне леукемије
CLL	ћелије хроничне лимфоцитне леукемије
SW480	хумана ћелијска линија колоректалног карцинома
MDA-MB-361	хумана ћелијска линија дојки
MDA-MB-453	хумана ћелијска линија дојки
Jurkat	хумана ћелијска линија акутне Т лимфоцитне леукемије
ERK	екстраћелијским сигналом регулисана киназа
ROI	реактивни кисеонични интермедијери
AE	алоје емодин

NMR	нуклеарна магнетно-резонанциона спектроскопија
IR	инфрацрвена спектроскопија
(<i>S,S</i>)-Et ₂ eddl (L1)	<i>O,O'</i> -диетил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат
(<i>S,S</i>)-Pr ₂ eddl (L2)	<i>O,O'</i> -дипропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат
(<i>S,S</i>)-Bu ₂ eddl (L3)	<i>O,O'</i> -дибутил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат
(<i>S,S</i>)-Pe ₂ eddl (L4)	<i>O,O'</i> -дипропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат
[(<i>S,S</i>)-H ₂ <i>i</i> Pr ₂ eddip]Cl ₂	<i>O,O'</i> -диизопропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-пропаноат дихидрохлорид
[(<i>S,S</i>)-H ₂ <i>i</i> Bu ₂ eddip]Cl ₂	<i>O,O'</i> -диизобутил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-пропаноат дихидрохлорид
[(<i>S,S</i>)-H ₂ <i>c</i> Pe ₂ eddip]Cl ₂	<i>O,O'</i> -дициклопентил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-пропаноат дихидрохлорид
[(<i>S,S</i>)-H ₂ Cy ₂ eddip]Cl ₂	<i>O,O'</i> -дициклохексил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-пропаноат дихидрохлорид
[H ₂ <i>i</i> Pr ₂ eddp]Cl ₂	<i>O,O'</i> -диизопропилетилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноат дихидрохлорид
[H ₂ <i>i</i> Bu ₂ eddp]Cl ₂	<i>O,O'</i> -диизобутилетилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноат дихидрохлорид
[(<i>S,S</i>)-H ₂ <i>i</i> Pr ₂ eddl]Cl ₂	<i>O,O'</i> -диизопропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат дихидрохлорид
[(<i>S,S</i>)-H ₂ <i>i</i> Bu ₂ eddl]Cl ₂	<i>O,O'</i> -диизобутил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат дихидрохлорид
[PdCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Et ₂ eddl}]	дихлоридо(<i>O,O'</i> -диетил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)паладијум(II)
[PdCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Pr ₂ eddl}]	дихлоридо(<i>O,O'</i> -дипропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)паладијум(II)
[PdCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Bu ₂ eddl}]	дихлоридо(<i>O,O'</i> -дибутил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)паладијум(II)
[PdCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Pe ₂ eddl}]	дихлоридо(<i>O,O'</i> -дипентил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)паладијум(II)
[PtCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Et ₂ eddl}]	дихлоридо(<i>O,O'</i> -диетил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(II)
[PtCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Pr ₂ eddl}]	дихлоридо(<i>O,O'</i> -дипропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(II)
[PtCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Bu ₂ eddl}]	дихлоридо(<i>O,O'</i> -дибутил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(II)
[PtCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Pe ₂ eddl}]	дихлоридо(<i>O,O'</i> -дипропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(II)
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)-Et ₂ eddl}]	тетрахлоридо(<i>O,O'</i> -диетил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(IV)
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)-Pr ₂ eddl}]	тетрахлоридо(<i>O,O'</i> -дипропил-(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(IV)

[PtCl ₄ {(S,S)-Bu ₂ eddl}]	тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -дибутил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(IV)
[PtCl ₄ {(S,S)-Pe ₂ eddl}]	тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -дипентил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(IV)
[PtCl ₄ {(S,S)- <i>i</i> Pr ₂ eddp}]	тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -диизопропил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)платина(IV)
[PtCl ₄ {(S,S)- <i>i</i> Bu ₂ eddp}]	тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -диизобутил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)платина(IV)
[PtCl ₄ {(S,S)- <i>c</i> Pe ₂ eddp}]	тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -дициклопентил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)платина(IV)
[PtCl ₄ (<i>i</i> Pr ₂ eddp)]	тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -диизопропилетилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-3-пропаноат)платина(IV)
[PtCl ₄ (<i>i</i> Bu ₂ eddp)]	тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -диизобутилетилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-3-пропаноат)платина(IV)
[PtCl ₂ {(S,S)- <i>i</i> Pr ₂ eddp}]	дихлоридо(<i>O, O'</i> -диизопропил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)платина(II)
[PtCl ₂ {(S,S)- <i>i</i> Bu ₂ eddp}]	дихлоридо(<i>O, O'</i> -диизобутил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)платина(II)
[PtCl ₂ {(S,S)- <i>c</i> Pe ₂ eddp}]	дихлоридо(<i>O, O'</i> -дициклопентил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)платина(II)
[PdCl ₂ {(S,S)- <i>i</i> Pr ₂ eddp}]	дихлоридо(<i>O, O'</i> -диизопропил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)паладијум(II)
[PdCl{(S,S)- <i>i</i> Preddp}]	хлоридо(<i>O</i> -изопропил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)паладијум(II)
[PdCl ₂ {(S,S) <i>i</i> Bu ₂ eddp}]	дихлоридо(<i>O, O'</i> -диизобутил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)паладијум(II)
[PdCl ₂ {(S,S) <i>c</i> Pe ₂ eddp}]	дихлоридо(<i>O, O'</i> -дициклопентил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)паладијум(II)
[PdCl ₂ {(S,S)-Cy ₂ eddp}]	дихлоридо(<i>O, O'</i> -дициклопентил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-пропаноат)паладијум(II)
[PdCl ₂ {(S,S)- <i>i</i> Pr ₂ eddl}]	дихлоридо(<i>O, O'</i> -диизопропил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)паладијум(II)
[PdCl ₂ {(S,S)- <i>i</i> Bu ₂ eddl}]	дихлоридо(<i>O, O'</i> -диизобутил-(<i>S, S</i>)-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-(4-метил)-пентаноат)паладијум(II)
[PtCl ₂ (Bu ₂ eddp)]	дихлоридо(<i>O, O'</i> -дибутил-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-3-пропаноат)платина(II)
[PtCl ₄ (Bu ₂ eddp)]	тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -дибутил-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-3-пропаноат)платина(IV)
[PtCl ₄ (Pe ₂ eddp)]	тетрахлоридо(<i>O, O'</i> -дипентил-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-3-пропаноат)платина(IV)

ИЗВОД

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПОТЕНЦИЈАЛНА ЦИТОТОКСИЧНОСТ *O,O'*-ДИАЛКИЛ-(*S,S*)-ЕТИЛЕНДИАМИН- -*N,N'*-ДИ-2-(4-МЕТИЛ)-ПЕНТАНОАТА И ОДГОВАРАЈУЋИХ ПАЛАДИЈУМ(II), ПЛАТИНА(II) И ПЛАТИНА(IV) КОМПЛЕКСА

У овој докторској дисертацији описана је синтеза, карактеризација и потенцијална цитотоксичност *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂, као и одговарајућих паладијум(II), платина(II) и платина(IV) комплекса.

Естри (*S,S*)-R₂eddl·2HCl (R = етил, *n*-пропил, *n*-бутил и *n*-пентил) су добијени укапавањем тионил-хлорида у одговарајући апсолутни алкохол, а потом рефлуктовани уз додатак (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине. Сви естри су добијени у облику дихидрохлорида: (*S,S*)-Et₂eddl·2HCl, (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl, (*S,S*)-Bu₂eddl·2HCl, (*S,S*)-Pe₂eddl·2HCl. Естри су окарактерисани елементалном анализом, IR и NMR спектроскопијом, а у случају (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl структура је потврђена и рендгенском структурном анализом.

Комплекси паладијума(II): [PdCl₂{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PdCl₂{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PdCl₂{(*S,S*)-Bu₂eddl}] и [PdCl₂{(*S,S*)-Pe₂eddl}] добијени су у реакцији калијум-тетрахлоридопаладата(II) са наведеним естрима и окарактерисани елементалном анализом, IR и NMR спектроскопијом.

Комплекси платине(II): [PtCl₂{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PtCl₂{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PtCl₂{(*S,S*)-Bu₂eddl}] и [PtCl₂{(*S,S*)-Pe₂eddl}] добијени су у реакцији калијум-тетрахлоридоплатината(II) са наведеним естрима и окарактерисани елементалном анализом, IR и NMR спектроскопијом.

Комплекси платине(IV): [PtCl₄{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PtCl₄{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PtCl₄{(*S,S*)-Bu₂eddl}] и [PtCl₄{(*S,S*)-Pe₂eddl}] добијени су у реакцији калијум-хексахлоридоплатината(IV) са наведеним естрима и окарактерисани елементалном анализом, IR и NMR спектроскопијом.

DFT прорачуни рађени су за синтетисане комплексе платине(II) и платине(IV) и установљено је да је (R,R) - N,N' -конфигурациони изомер најниже енергије, при чему је формирање само једног изомера очекивано јер је у сагласности са NMR спектроскопијом.

Цитотоксична активност синтетисаних једињења одређена је на ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (CLL) и хуманим ћелијским линијама: колоректалног карцинома SW480, карцинома дојки (MDA-MB-361 и MDA-MB-453), акутној Т лимфоцитној леукемији Јуркат и хроничној мијелоидној леукемији K562 у поређењу са активношћу цисплатине, као референтним антиканцерогеним леком. Сва једињења показују активност већу од цисплатине према CLL ћелијама. Нађено је да најактивније једињење комплекс платине(II) са n -Bu групом у естарском ланцу. Комплекси платине(IV) имају одличну цитотоксичну активност у инхибицији Јуркат и K562 ћелијских линија која је веома слична оној коју показује активност цисплатине.

Кључне речи: (S,S) -етилендиамин- N,N' -ди-2-(4-метил)пентанска киселина, (S,S) -R₂eddl лиганди, R₂edda лиганди, платина(IV) комплекси, платина(II) комплекси, паладијум(II) комплекси, кристална структура, DFT прорачуни, цитотоксичност

S U M M A R Y

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND POTENTIAL CYTOTOXICITY OF *O,O'*-DIALKYL-(*S,S*)-ETHYLENEDIAMINE-*N,N'*-DI- -2-(4-METHYL)-PENTANOATE AND THE CORRESPONDING PALLADIUM(II), PLATINUM(II) AND PLATINUM(IV) COMPLEXES

This work describes synthesis, characterization and potential cytotoxicity of *O,O'*-dialkyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid, [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂, as well as their corresponding palladium(II), platinum(II) and platinum(IV) complexes.

Esters (*S,S*)-R₂eddl·2HCl (R = ethyl, *n*-propyl, *n*-butyl and *n*-pentyl) were obtained by instillation of thionyl chloride in an appropriate absolute alcohol, and then refluxing with addition of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid. All of the esters were obtained as dihydrochlorides: (*S,S*)-Et₂eddl·2HCl, (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl, (*S,S*)-Bu₂eddl·2HCl, (*S,S*)-Pe₂eddl·2HCl. Esters were characterized by elemental analysis, IR and NMR spectroscopy, and in the case of (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl the structure was confirmed by X-ray structural analysis.

Complexes of palladium(II): [PdCl₂{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PdCl₂{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PdCl₂{(*S,S*)-Bu₂eddl}] and [PdCl₂{(*S,S*)-Pe₂eddl}] were obtained by reaction of potassium-tetrachloridopalladate(II) with synthesized esters and characterized by elemental analysis, IR and NMR spectroscopy.

Complexes of platinum(II): [PtCl₂{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PtCl₂{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PtCl₂{(*S,S*)-Bu₂eddl}] and [PtCl₂{(*S,S*)-Pe₂eddl}] were obtained by reaction of potassium-tetrachloridoplatinate(II) with these esters and characterized by elemental analysis, IR and NMR spectroscopy.

Complexes of platinum(IV): [PtCl₄{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PtCl₄{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PtCl₄{(*S,S*)-Bu₂eddl}] and [PtCl₄{(*S,S*)-Pe₂eddl}] were obtained by reaction of potassium-tetrachloridoplatinate(II) with mentioned esters and characterized by elemental analysis, IR and NMR spectroscopy.

DFT calculations were performed for the synthesized complexes of platinum(II) and platinum(IV) and it was found that the *(R,R)*-*N,N'*-configuration isomer is with the lowest energy and formation of only this isomer should be expected, which is consistent with NMR spectroscopy.

Cytotoxic activity of synthesized compounds was determined against chronic lymphocyte leukemia cells (CLL) and human cell lines: SW480 colorectal cancer, breast MDA-MB-361 and MDA-MB-453, Jurkat T leukemia and K562 chronic myelogenous leukemia compared with activity of cisplatin, as a reference anticancer drug. All compounds showed higher antitumoral activity than activity of cisplatin against CLL cells. It was found that the most active complexes are platinum(II) complexes with *n*-Bu group in the ester chain. Complexes of platinum(IV) have an excellent cytotoxic activity in the inhibition of Jurkat and K562 cell lines, which is very similar to that shown by activity of cisplatin.

Keywords: *(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoic acid, *(S,S)*-R₂eddl ligands, R₂edda-type ligands, palladium(II) complexes, platinum(II) complexes, platinum(IV) complexes, crystal structure, DFT calculations, cytotoxicity

1. УВОД

Досадашња изучавања комплексних једињења елемената платинске групе метала и њихова примена у медицини започела су од Розенберговог (В. Rosenberg) открића квадратно-планарног комплекса платине, *cis*-диамминдихлоридоплатина(II), $cis\text{-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, познатог под именом цисплатина 1964. године [1]. Након открића антитуморске активности цисплатине, синтетисано је много комплекса платине у циљу проналажења бољег лека са мање непожељних ефеката.

Неки комплекси платине(II) и платине(IV) са *NN* бидентатним лигандима, а нарочито са аминским лигандима показали су значајну антитуморску активност. Комплекси платине(IV) су инертнији од комплекса платине(II) и могу се користити орално. Комплекси паладијума(II) су такође део антитуморских истраживања јер су структурни аналози комплекса платине(II), имају сличне хемијске особине (d^8 -систем, граде квадратно-планарне комплексе), осим што једињења паладијума(II) показују око 10^5 пута већу реактивност.

С обзиром на мали број комплексних једињења платине(IV), платине(II) и паладијума(II) са *NN* бидентатним $R_2\text{edda}$ -типом лиганада (алкил естри *edda*-типа лиганада), од интереса је испитати могућности добијања ових једињења, утврдити њихову изомерију и испитати *in vitro* антитуморску активност, као и механизам уништавања туморских ћелија.

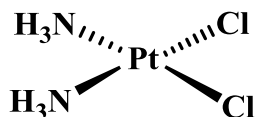
2. ОПШТИ ДЕО

2.1. АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ

2.1.1. Историјат открића

Откриће квадратно-планарног *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], (цисплатина), (Слика 1), комплекса 1845. године, познатог као Пејронов хлорид (Peyrone's chloride) [1-3], било је од великог значаја у развоју бионеорганске хемије. Биолошка активност откривена је случајно 1964. године. Биофизичар Розенберг (В. Rosenberg) и његови сарадници са Мичигенског универзитета испитивали су утицај електричног поља на деобу и раст бактерије *Escherichia coli*, и при томе установили да је деоба бактерије заустављена, док се њен раст нормално одвијао. Сматрали су да су ови ефекти последица утицаја електричног поља, међутим, након дужег разматрања, установили су да је до блокирања деобе бактерија дошло под утицајем *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекса, који се наградио у току експеримента у реакцији између платинске електроде и хранљивог медијума са амонијачним пуфером. Розенберг је ово једињење тестирао, а резултат је био спектакуларан. Дозирање цисплатине директно у абдомен миша са имплантираним тумором *Sarcoma-180*, довео је за неколико дана до смањења, чак и нестајања тумора. Лек назван платинол, са генеричким именом цисплатина, од 1979. године је уведен у хемиотерапију као цитостатик у лечењу појединих врста тумора. Рано је запажено да цисплатина најбоље делује на генитоуринарне туморе [4-9]. Ефикасна је и у терапији тумора главе и врата [10,11], као и при лечењу неких малигних болести крви [12] и неких

облика карцинома плућа [13], док ограничену клиничку активност има у лечењу тумора дојки и једњака.

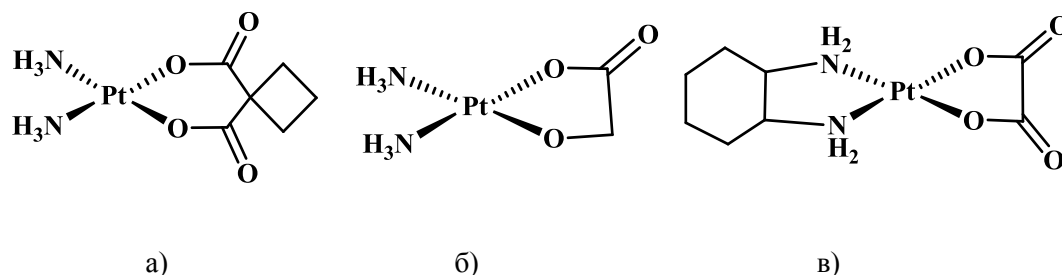


Слика 1. Цисплатина

Упркос великом успеху при лечењу тумора, цисплатина показује и нежељене ефекте попут велике нефротоксичности, неуротоксичности, изазива повраћање и боље изазива резистенцију код неких врста тумора. Резистентност тумора на цисплатину се јавља, како се показало, због:

- 1) смањеног нагомилавања платине унутар ћелије;
- 2) пораста детоксификационог дејства протеина цитоплазме;
- 3) повећања толеранције ДНК репаразе платина ДНК-адукта.

Једно од решења било је синтеза нових комплекса аналога цисплатини који се баве неким или свим побројаним механизмима за превазилажење резистентности. У првој фази радило се на замени хлоридних анјона другим анјонским лигандима. Тако су синтетисани диаммин[1,1-циклобутан-дикарбоксилато(2-)-к2]-*O,O'*-платина(II) (карбоплатина, Слика 2, а) и *cis*-диаммин(гликолато-*O,O'*)платина(II) (недаплатина, Слика 2, б). Такође, радило се и на замени NH₃ лиганда неким другим амин лигандима, као у случају (*cis*-L-диамминциклохексан)оксалатоплатина(II) (оксалиплатина, Слика 2, в). Међутим, до данас се у свету од комплекса метала, осим цисплатине у лечењу тумора једино употребљавају карбоплатина и оксалиплатина [14], који представљају другу генерацију антитуморских комплекса платине(II).



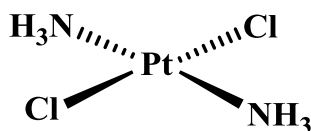
Слика 2. Структура једињења познатих у медицини као карбоплатина (а), недаплатина (б) и оксалиплатина (в)

Великим бројем истраживања у овој области примећено је да постоји веза између структуре комплекса платине(II) и њихове антитуморске активности. Активнији комплекси слични су цисплатини: електронеутрални са *cis*-геометријском структуром, имају два лабилна монодентатна ањонска лиганда или један лабилан бидентатни лиганд, и такође, у *cis* положају су инертни азот-донорски лиганди са најмање једном N-H везом.

Правило структура-активност је диктирало развој нових потенцијалних платинских лекова преко 20 година, што се одразило и на клиничку примену таквих комплекса. Међутим, постало је очигледно да многи аналози цисплатине и карбоплатине неће понудити битну клиничку предност у односу на постојеће лекове. Велики број истраживача је кренуо другим путем у дизајнирању лекова на бази платине и нарушио је правило структура-активност. Неки такви комплекси су показали активност. Даљи покушаји били су усмерени ка дизајнирању комплекса са специфичним карактеристикама попут: могућност за оралну примену или избегавање механизма резистенције на лекове платине.

Ранија истраживања су показала да *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂] (трансплатина, Слика 3), у поређењу са цисплатином показује нижу *in vitro* и *in vivo* антитуморску активност [15]. Из тих разлога синтеза комплекса платине са *trans* геометријом је дуже време била занемарена, све до 1990. године када су објављени први значајни резултати [16,17]. Посебно обећавајуће резултате пружају комплекси *trans*-платине са хетероцикличним, алифатичним, фосфорним и иминострима као лигандима. Скорији резултати на цитотоксичну активност потврђују да практично не постоје

структурна ограничења на потенцијалне терапијски активане комплексе *trans*-платине [18,19].

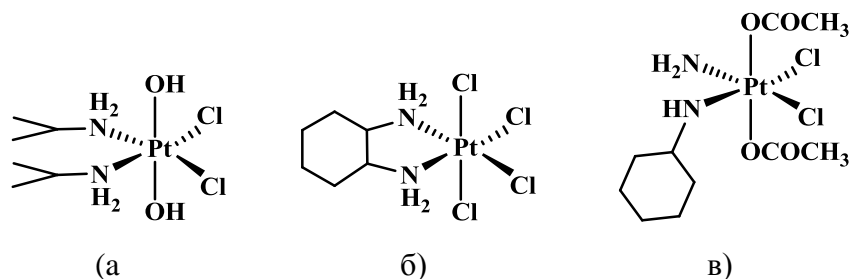


Слика 3. Трансплатина

Трећу генерацију антитуморских комплекса платине, који се већином налазе у предклиничком испитивању, чине комплекси платине(IV), комплекси са *trans*-геометријском структуром, полинуклеарни платина(II) комплекси или комплекси који у свом саставу садрже лиганд са асиметричним угљениковим атомом. Из ове групе издвајају се комплекси са 1,2-диаминциклохексаном (*dach*) као инертним лигандом, док улогу одлазећих лиганата могу имати сулфати, малонати и други.

У последње време све је веће интересовање за комплексе платине(IV) који су инертнији у поређењу са комплексима платине(II), имају умањену токсичност током хемиотерапије што омогућава оралну примену ових једињења као цитостатика. У крвотоку, платина остаје у вишем оксидационом стању, што знатно умањује реактивност, а због инертне кинетике већа је количина лека која стигне до циљног места [20-24]. Комплекси платине(IV) могу имати и већу липофилност што омогућава бољи пролазак кроз ћелијске мембране.

Мањи број платина(IV) комплекса су испитивани као потенцијални цитостатици у односу на платина(II) комплексе, а неки од њих су ушли у клиничка испитивања. Ипроплатина, (*cis,trans,cis*-[PtCl₂(OH)₂(iPrNH₂)₂]), (CHIP, JM-9), (Слика 4, а) коју су синтетисали Tobe и сарадници [25], је одабрана због своје велике растворљивости, али је током клиничких студија откривено да је знатно мање активна од цисплатине [24]. Тетраплатина, [PtCl₄(chda)], (ормаплатина), (Слика 4, б), је показала велику активност у предклиничким испитивањима, али је касније напуштена због велике неуротоксичности [26].



Слика 4. Структура једињења познатих као ипроплатина (а), тетраплатина (б) и сатраплатина (в)

Од великог броја клинички испитиваних комплекса платине само је сатраплатина, *cis,trans*-[PtCl₂(OAc)₂(NH₃)C₆H₁₁NH₂], октаедарски платина(IV) комплекс [20,21] (JM-216, Слика 4, в) за сада интересантна за даља и напреднија клиничка истраживања.

Све ово наводи истраживаче широм света да синтетишу и испитују једињења која би могла постати бољи цитостатици у смислу активности и селективности према малигним ћелијама и са што је могуће мање негативних ефеката по здраве ћелије.

2.2. СИНТЕЗА И СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМ(II), ПЛАТИНА(II) И ПЛАТИНА(IV) СА ЛИГАНДИМА EDDA -ТИПА

Лиганди edda-типа представљају N- или C- супституисане деривате edda-лиганда или његове хомологе који садрже продужене ланце, на пример: етилендиамин-*N,N'*-дисирћетна киселина (H₂edda); етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропанска киселина (H₂eddp); 1,3-пропилендиамин-*N,N'*-дисирћетна киселина (H₂pdda). Често се у литератури за све ове лиганде користи скраћеница edda-тип

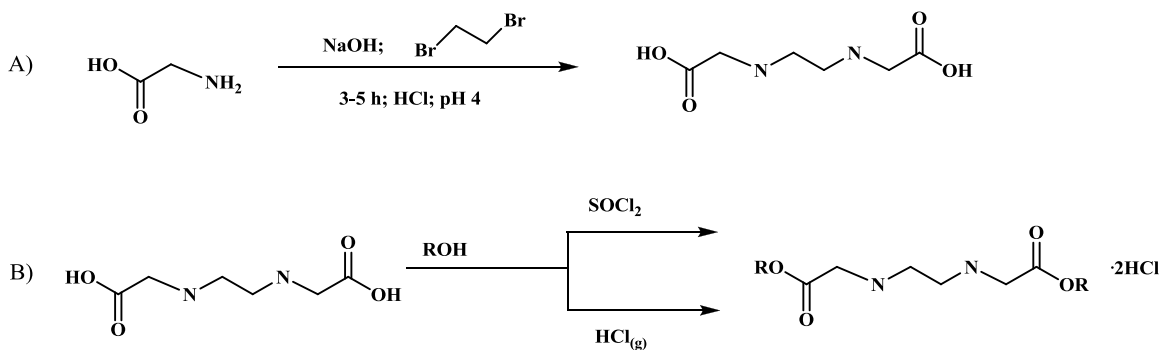
лиганда, због претходних истраживања на ову тему [27]. У Табели 1 приказани су неки лиганди edda-типа.

Табела 1. Неки тетрадентатни лиганди edda-типа

Назив и формула лиганда	Скраћеница
етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат ${}^{-}\text{OOCCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COO}^{-}$	edda
етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-3-пропаноат ${}^{-}\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^{-}$	eddp
1,3-пропандиамин- <i>N,N'</i> -диацетат ${}^{-}\text{OOCCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COO}^{-}$	1,3-pdda (tmdda)
<i>N,N'</i> -диметил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат ${}^{-}\text{OOCCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COO}^{-}$	dmedda
(<i>S,S</i>)-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-пропаноат ${}^{-}\text{OOC}(\text{CH}_3)\text{C}^*\text{HNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHC}^*\text{H}(\text{CH}_3)\text{COO}^{-}$	(<i>S,S</i>)-eddip
<i>N,N'</i> -диетил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат ${}^{-}\text{OOCCH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{COO}^{-}$	deedda
<i>N,N'</i> -bis-(2-аминоетил)глицинат $(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{COO}^{-}$	i-dtma
<i>N,N'</i> -добензил-етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат ${}^{-}\text{OOCCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}_2\text{COO}^{-}$	dbedda

Саме киселине се за јоне метала координују тетрадентатно, $\kappa^2N,N',\kappa^2O,O'$, а естерификовани деривати бидентатно, κ^2N,N' .

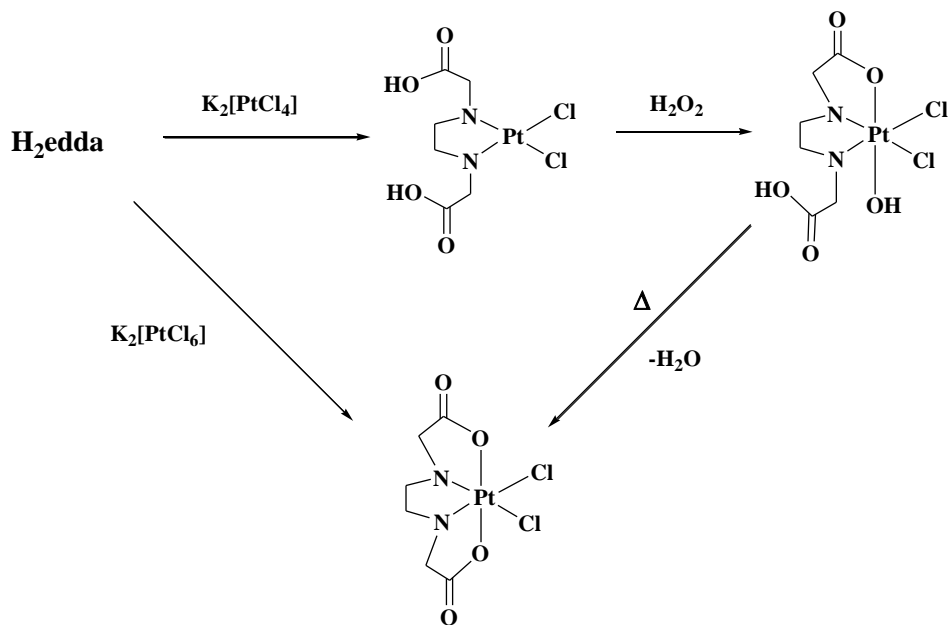
Киселине се лако могу синтетисати по методи коју је патентирао Берсворт (Bersworth), још 1955. године (Шема 1, А) [28]. Диестри ових киселина могу се добити коришћењем уобичајене методе (Шема 1, В) [29].



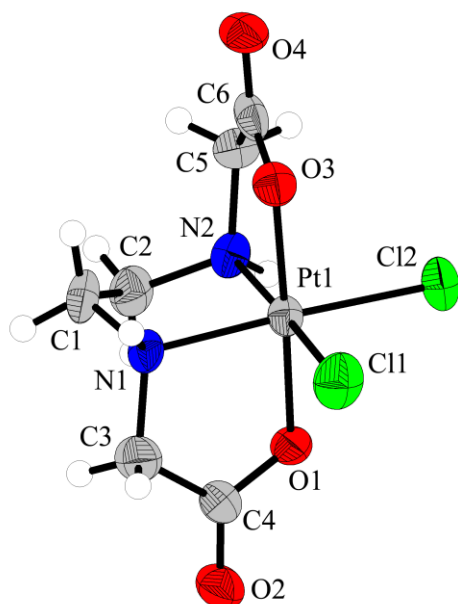
Шема 1. Уобичајене методе синтеза H_2edda киселине (A) и R_2edda -типа естера (B)

2.2.1. Комплекси платине(II) и платине(IV)

Платина(II) и платина(IV) комплексе са edda лигандом је први пут синтетисао Лиу (Liu) 1963. године (Шема 2.) [30]. Нађено је да се edda може координовати бидентатно и тетрадентатно за платина(II)-јон, док се за платину(IV) координује тридентатно или тетрадентатно.



Шема 2. Синтеза платина(II) и платина(IV) edda комплекса



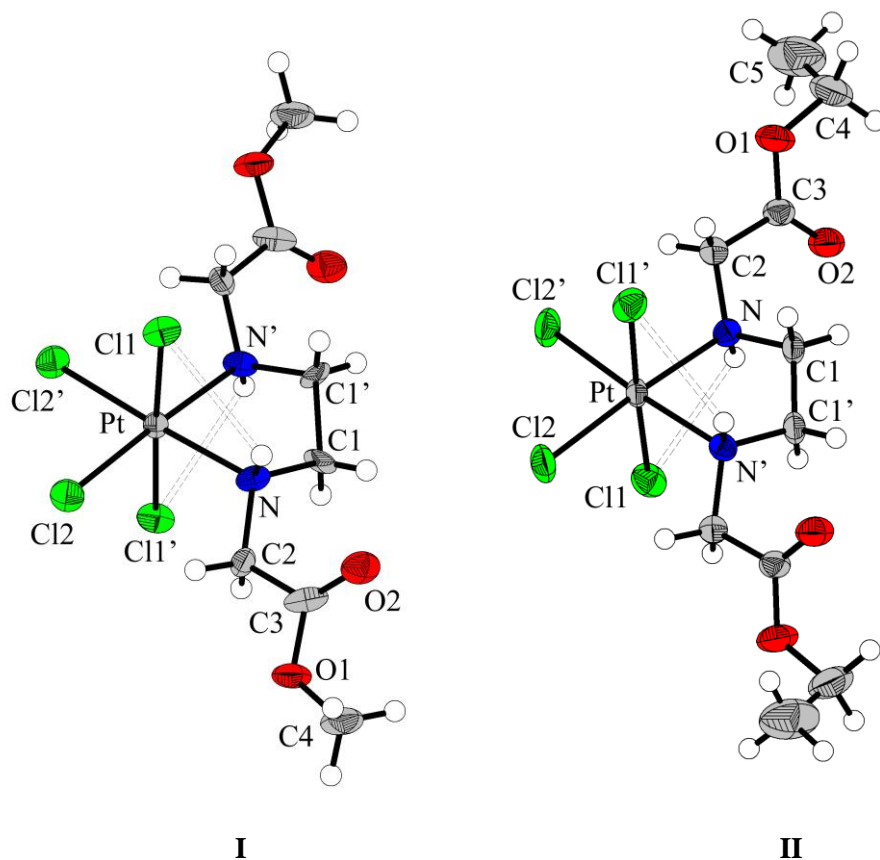
Слика 5. ORTEP презентација структуре платина(IV)-edda комплекса

Jolley и сарадници [31] приказали су синтезу неколико платина(II) и платина(IV) комплекса са хидроксиалкил или карбоксиалкил дериватима етилендиаминa. Међу коришћеним лигандима је и edda за коју је утврђено да је координована бидентатно за платину(II), а оксидацијом помоћу водоник-пероксида добијен је комплекс платине(IV) са тетрадентатно координованом edda, $[\text{PtCl}_2(\text{edda})]$, што је потврђено рендгенском структурном анализом (Слика 5). У литератури је такође описана и кристална структура (етилендиамин- N,N' -диацетато)платина(II) комплекса [32].

Комплекси платине(IV) и платине(II) са eddp и 1,3-pdda лигандима су синтетисани према већ описаној процедури коју је дао Liu [30,33-37]. Естерификацијом поменутих киселина добијају се бидентатни бис(алкилкарбоксиалкиламино)етан или -пропан лиганди, у реакцији са одговарајућим апсолутним алкохолом у присуству тионил-хлорида (Шема 1., **B**) [29,38].

Платина(IV) комплекси са бидентатним κ^2N,N' $R_2\text{edda}$ естрима ($R = \text{Me}, \text{Et}, n\text{-Pr}$) су синтетисани на собној температури [39,40]. Структуре Pt(IV) комплекса са

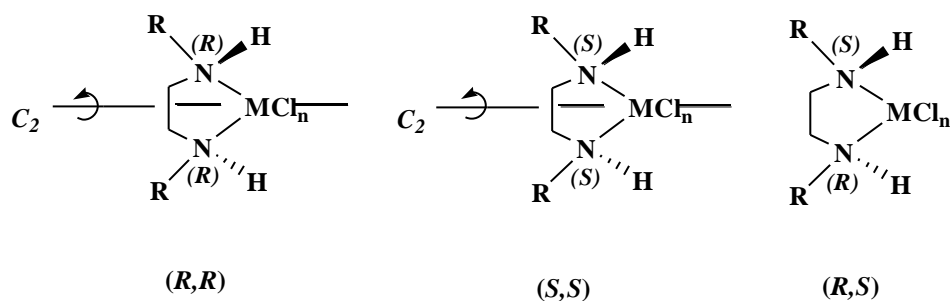
Me₂edda и Et₂edda лигандима (Слика 6) одређене су рендгенском структурном анализом, при чему је нађено да је кристална решетка комплекса стабилизована интрамолекулским водоничним везама, што је у сагласности са претходним резултатима добијеним за аналогне структуре са тетрадентатним edda лигандима [33,34].



Слика 6. Diamond презентација структуре Pt(IV) комплекса са Me₂edda (I) и Et₂edda (II)

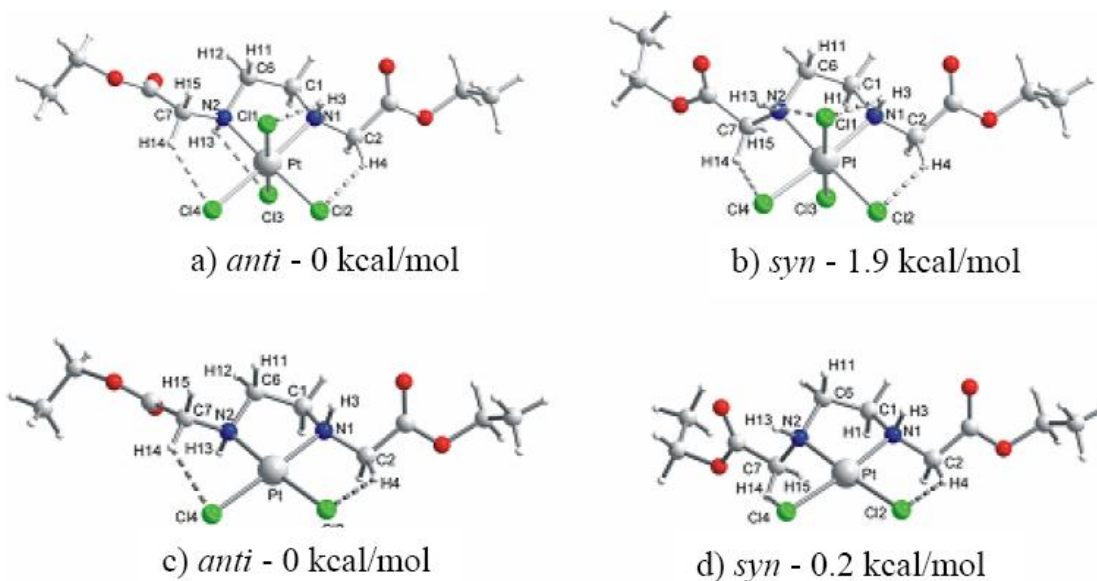
Координовањем R₂edda за платину азотови атоми постају хирални што теоријски даје могућност за настајање три стереоизомера: два енантиомера (*R,R*) и (*S,S*) и један диастереоизомер (*R,S*), односно *anti* и *syn* (Слика 7.). Приликом синтезе платина(IV) комплекса са Et₂edda добијена је (*R,R*) и (*S,S*) рацемска смеша и у чврстом стању и у раствору, што је потврђено рендгенском структурном анализом и NMR спектроскопијом. Да би се објаснио разлог диастереоселективности, рађени су DFT прорачуни за *R,R* (*anti*; *S,S* енантиомер

исте енергије као и R,R и R,S (*syn*) изомере коришћењем MPW1PW91 функције (Слика 8.). Нађено је да је у случају *anti* изомера N–H⋯Cl електростатичка интеракција нешто јача, што може бити довољан разлог за диастереоселективност [40].



$M = \text{Pt(IV)}, \text{Pt(II)}, \text{Pd(II)}$

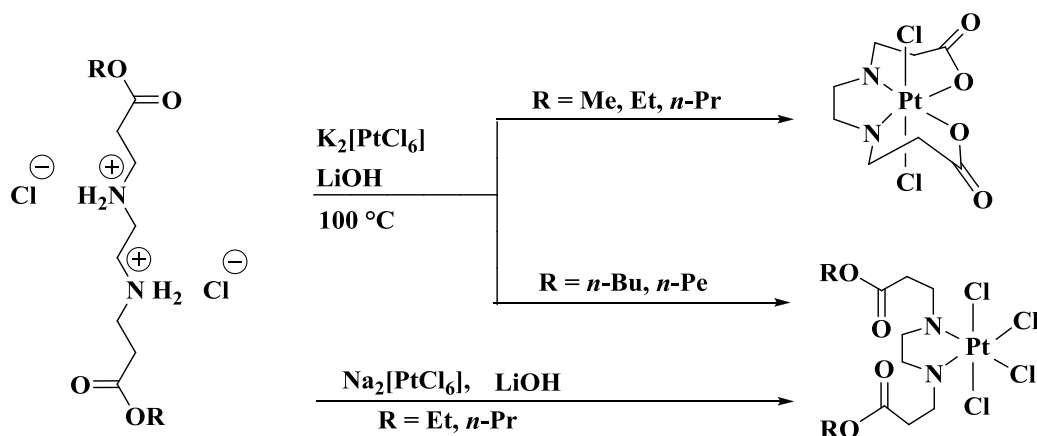
Слика 7. Могући стереоизомери $[\text{PtCl}_n(\text{R}_2\text{edda-типа})]$, ($n = 2, 4$) и $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2\text{edda-типа})]$ комплекса



Слика 8. Структуре одређене на бази DFT прорачуна за $[\text{PtCl}_n(\text{Et}_2\text{edda})]$ комплекс

(a, b: $n = 4$; c, d: $n = 2$)

DFT прорачуни рађени су и за комплекс платине(II) са Et₂edda, [PtCl₂(Et₂edda)] [23]. Аксијални атоми хлора су искључени, а самим тим и стабилизујуће N–H···Cl водоничне везе, због саме структуре једињења. Резултати су показали знатно мање енергетске разлике између *syn* и *anti* диастереоизомера, чиме је показано да наведене електростатичке интеракције N–H···Cl утичу на стереоселективност (Слика 8). Стога, у случају платина(II) комплекса са бидентатним *N,N'* лигандима треба очекивати формирање сва три изомера (*R,R*)/(*S,S*)-*anti* и (*R,S* ≡ *S,R*)-*syn* (Слика 8). (*R,R*)/(*S,S*) енантиомери имају C₂ молекулску симетрију, за разлику од (*R,S*) дијастереоизомера са C₁ молекулском симетријом, што значи да су код њих естарске групе магнетно нееквивалентне. С обзиром на структурну сличност платина(II) и паладијум(II) комплекса, исто би требало очекивати и за R₂edda комплексе паладијума(II).



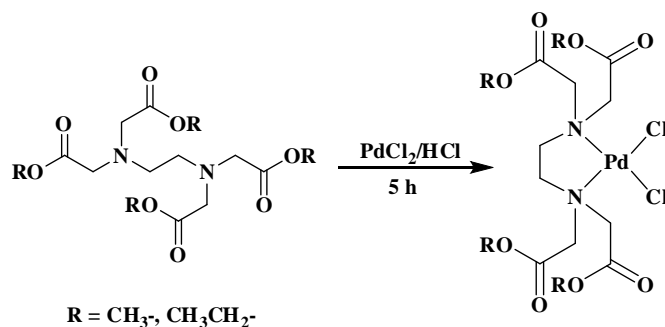
Шема 3. Синтеза комплекса платине(IV) са R₂eddp-лигандима

У реакцији R₂eddp лиганда у зависности од R-група, координовањем за платину(IV) долази до формирања различитих производа. За R = Me, Et, *n*-Pr, долази до хидролизе естарских група чиме се добија [PtCl₂(eddp-κ²N,N',κ²O,O')] комплекс (Шема 3.), а рендгенска структурна анализа је потврдила да је реч о *trans*-дихлоридо геометријском изомеру [39]. Када је R = *n*-Bu или *n*-Pe, естарске групе нису хидролизоване, а добијен је следећи производ [PtCl₄(R₂eddp-κ²N,N')],

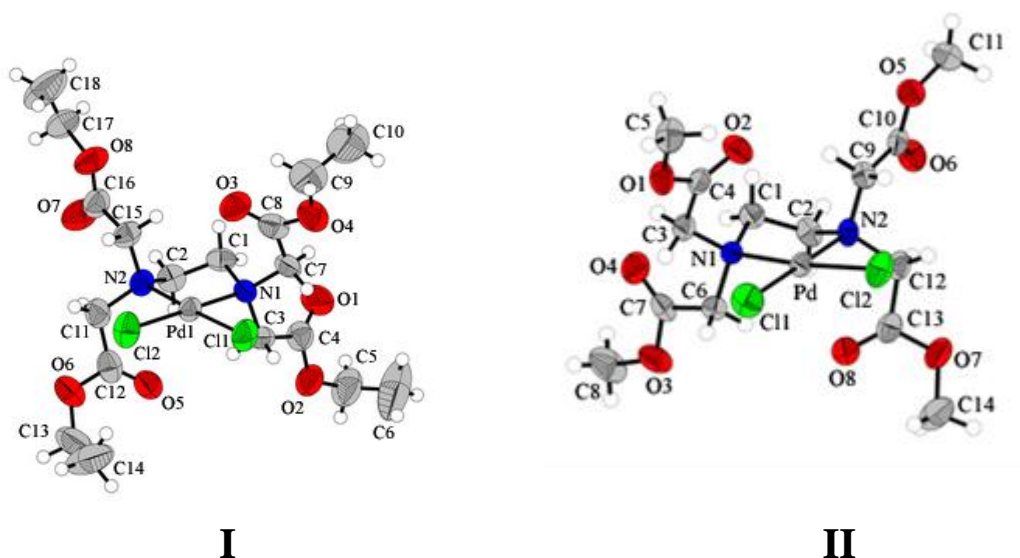
(Шема 3.). Међутим, када је коришћен $\text{Na}_2[\text{PtCl}_6]$ на собној температури добијени су диетил и дипропил естри eddp-а координовани за платину(IV) [40].

2.2.2. Комплекси паладијума(II)

Паладијум(II) и платина(II) јони имају сличне хемијске особине (d^8 -систем, граде квадратно-планарне комплексе). Може се рећи да су једињења паладијума(II) структурни аналози једињењима платине(II), осим што су једињења паладијума(II) око 10^5 пута реактивнија, односно лабилнија. Приличан број комплекса паладијума(II) са лигандима који садрже N и O атоме је синтетисан и окарактерисан и то са EDTA [41-43], етилендиамином [44,45], као и са неким аминокиселинама [46-48]. Синтеза комплекса паладијума(II) са тетраметил и тетраетил естрима EDTA приказана је на Шеми 4. У новије време објављене су кристалне структуре ових комплекса [49] (Слика 9.). Дужине веза и углови су у сагласности са литературним подацима [41-48].

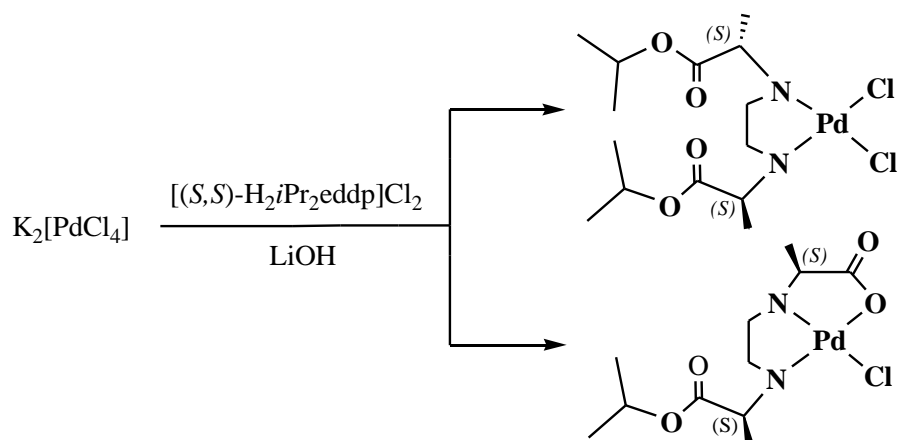


Шема 4. Синтеза комплекса паладијума(II) са тетраметил и тетраетил естрима EDTA



Слика 9. ORTEP презентација структуре комплекса паладијума(II) са тетраетил (I) и тетраметил (II) естрима EDTA

Недавно су синтетисани комплекси паладијума(II) са естрима (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропанске киселине ((*S,S*)-H₂eddip) [50]. При грађењу комплекса естри се координују бидентатно κ^2N,N' за металне јоне, осим у случају једног комплекса паладијума(II) где је дошло до тридентатног везивања изопропил естра (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропанске киселине. Наиме, у истој реакцији формирала су се два комплекса: један са бидентатно везаним нехидролизованом естром и други са тридентатно везаним естром код кога је дошло до хидролизовања једне изопропил групе (Шема 5.).

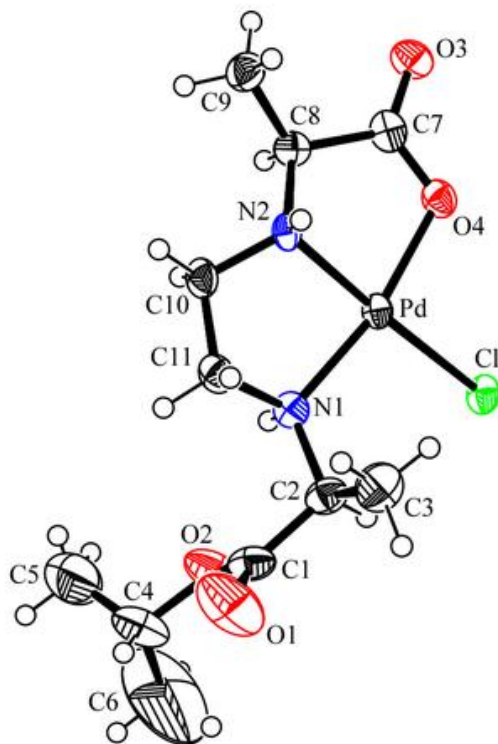


Шема 5. Реакција добијања два комплекса паладијума(II) са $[(S,S)\text{-H}_2i\text{Pr}_2\text{eddp}]\text{Cl}_2$

Такође, публикована је и кристална структура хлоридо(*O*-изопропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропаноат)паладијум(II), $[\text{PdCl}\{(S,S)\text{-}i\text{Preddip}\}]$ [50].

$[\text{PdCl}\{(S,S)\text{-}i\text{Preddip}\}]$ кристалише у моноклиничном кристалном систему, са просторном групом $P2_1$. Молекулска структура приказана је на Слици 10, а одабране дужине веза и углови веза дати су у Табели 2.

Атом паладијума има квадратно-планарну координациону геометрију са једним $[(S,S)\text{-}i\text{Pr}]\text{eddp}]^-$ лигандом координованим преко једног карбоксилног кисеониковог атома и два азотова атома ($\kappa^2N,N',\kappa O$ координација). Преостало координационо место је заузето хлоро лигандом. Нађено је да је у питању (*R,R*)-*N,N'* изомер.



Слика 10. ORTEP презентација $[\text{PdCl}\{(\text{S,S})\text{-iPreddip}\}]$

Pd–N везе (1,995(5) и 2,047(6) Å) су краће него код одговарајућих паладијумових комплекса са edta тетраалкил естарским лигандима (2,098(4)–2,106(7) Å) [41-43,49]. Pd–N1 веза одговара опсегу дужина веза нађених код Pd(II) комплекса са етилендиамином (2,03–2,09 Å) [44,45]. Pd–O веза од 2,019(5) Å је у границама вредности од (1,999(6) – 2,105(3) Å) које су објављене за петочлане и шесточлане хелате који садрже Pd–O везе [51,52]. Дужина везе Pd–Cl (2,325(1) Å) одговара литературним подацима за $[\text{PdCl}_2(\text{R}_4\text{edta})]$ и $[\text{PdCl}_2(\text{H}_4\text{edta})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$ комплексе (R = Me, Et; x = 5, 6; 2,287(2)–2,298(2) и 2,30(1) Å) [42,43,49].

Табела 2. Одабране дужине веза (Å) и углови веза (°) за [PdCl₂(S,S)-iPreddip]

Дужине веза (Å)		Углови веза (°)	
Pd–N2	1,995(5)	N2–Pd–N1	86,3(2)
Pd–O4	2,019(5)	N2–Pd–Cl	177,1(1)
Pd–N1	2,047(6)	O4–Pd–N1	167,7(2)
Pd–Cl	2,325(1)	O4–Pd–Cl	95,2(1)
C1–O1	1,190(1)	N1–Pd–Cl	96,6(1)
C1–O2	1,314(1)	N2–C10–C11	108,2(6)
C4–O2	1,441(1)	N1–C11–C10	108,9(5)
C7–O3	1,216(8)	C3–C2–N1	112,0(6)
C7–O4	1,316(8)	N2–C8–C9	113,0(5)
C10–N2	1,476(8)	C11–N1–Pd	106,9(4)
C11–N1	1,508(8)	C7–O4–Pd	113,7(4)

Интрамолекулске водоничне везе N1–H···O2 (N1···O2 = 2,838(9) Å, N1–H···O2 = 102°) и интермолекулске N1–H···O3 водоничне везе (N1···O3 = 2,997(8) Å, N1–H···O3 = 170°) су од значаја.

2.3. ЦИТОТОКСИЧНОСТ ПЛАТИНА(II), ПЛАТИНА(IV) И ПАЛАДИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА

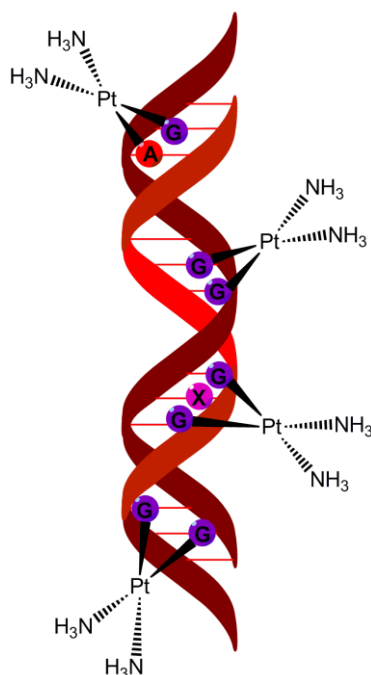
Антитуморско дејство комплекса платине(II) огледа се у њиховом везивању за молекул ДНК, при чему се зауставља њена транскрипција и репликација, а тиме онемогућава умножавање ћелија тумора [53-59]. Поремећај нормалног ћелијског циклуса, односно онемогућавање репликације активира настанак „програмиране ћелијске смрти” - апоптозе. Дакле, један од могућих механизма цитотоксичног деловања комплекса платине(II) је индукција апоптозе туморских ћелија деловањем на репликацију и транскрипцију.

Резистенција на цитостатике може настати као толеранција туморске ћелије на ДНК оштећења односно може настати у условима када туморска ћелија

активира унутарћелијске механизме поправке ДНК оштећења којим регулише репликацију и нормализује сопствени ћелијски циклус.

Када комплекс платине уђе у ћелију, најповољнији процес је хидролиза и директно везивање за молекулу ДНК. С обзиром да је концентрација Cl^- јона у екстрацелуларној течности око 100 mM, а у интрацелуларној од 5-10 mM, хидролиза комплекса је процес који игра важну улогу. Због високе концентрације хлорида у крви цисплатина долази до ћелије тумора неизмењена уколико није деактивирана неким биомолекулом (нпр. протеини који садрже SH групу), а кад уђе у ћелију формирају се аква комплекси међу којима је најактивнији $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ катјон [60-63].

Када комплекс доспе до молекула ДНК, могућности за координацију су различите. Везивање комплекса за ДНК се првенствено дешава преко N7 атома гуанина, док је мање заступљено везивање за N7 и N1 аденина и N3 цитозина [64,65]. Обзиром да молекулу ДНК у својим комплементарним спиралним структурама садржи различиту секвенцу пуринских и пиримидинских база, установљено је да је са 60% заступљена координација комплекса типа 1,2-(GpG), односно веза преко два молекула гуанозин-5'-монофосфата, који се налази на супротним ланцима ДНК. Око 25% је заступљена веза типа 1,2-(ApG), тј. веза са аденозин-5'-монофосфатом и гуанозин-5'-монофосфатом смештеним на супротним ДНК ланцима. Остали начини везивања (монофункционално везивање комплекса, везе типа 1,3-(GpG), везе преко гуанозина смештених на истом ланцу молекула ДНК, итд.) су мање заступљени. На слици 11 приказани су различити начини везивања цисплатинског фрагмента за молекулу ДНК.



Слика 11. Могући начини везивања цисплатине за ДНК хеликс [66].

Процењено је да се мање од 1% цисплатине која уђе у ћелију везује за ДНК из једра, док се преостала количина везује за протеине и друге биомолекуле [67].

Посебно велики афинитет комплекси платине показују према биомолекулима који садрже сумпор, како у тиолном тако и у тиоетарском облику. Наиме, платина(II) као “мека“ Луисова киселина гради јако стабилна једињења са сумпор донорима (“меким“ Луисовим базама). Настала једињења су одговорна за појаву токсичних ефеката. Пошто је концентрација тиола, укључујући глутатион и L-цистеин, у интрацелуларној течности око 10 mM, претпоставља се да је већи део комплекса платине инактивиран везивањем за сумпор из биомолекула, пре него што дође до молекула ДНК [65,67,68].

Везивање комплекса платине за сумпор из тиоетра је кинетички фаворизован процес. Настала Pt-S (тиоетар) веза може се раскинути у присуству молекула ДНК, тј. N7 атом гуанозин-5'-монофосфата може да супституише молекул тиоетра из насталог једињења [69]. Из тих разлога се једињења типа Pt-S (тиоетар) сматрају “резервоаром“ комплекса платине у организму, тј. погодним интермедијером у реакцији комплекса платине(II) и ДНК. Pt-S (тиоетар) веза може

„For every cell, there is a time to live and a time to die.”

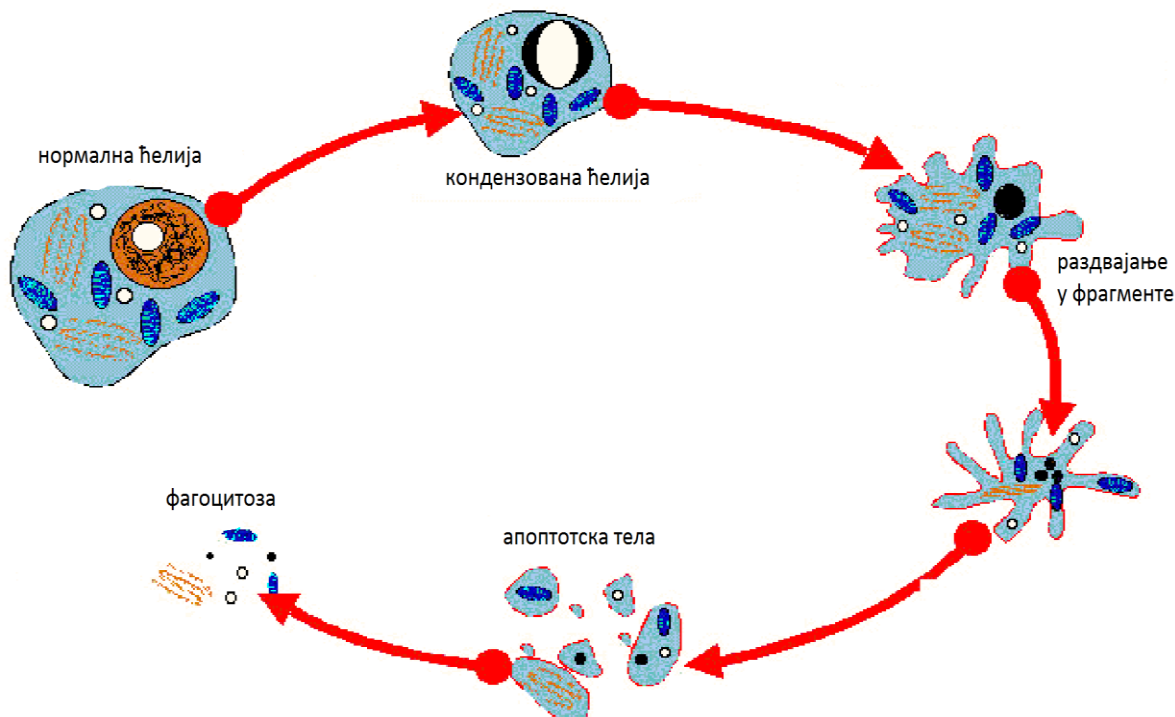
Туморске ћелије, услед дејства цитотоксичних комплекса, могу да умру на два начина: некрозом и апоптозом. Некроза представља неконтролисан и пасиван процес који обично захвата велики број ћелија, док је апоптоза контролисан и енергетски-завишан процес који захвата једну или неколико ћелија. Некроза настаје као последица знатног оштећења ћелије најчешће узрокованог физичко-хемијским агенсима, док је апоптоза програмирана ћелијска смрт, вид ћелијске аутодеструкције, односно ћелијског самоубиства.

Некроза је непожељан вид ћелијске смрти с обзиром да током некрозе ћелије долази до прскања ћелијске мембране, али неретко и до руптуре ћелијских органела, па се након руптуре лизосома бројни лизозомални ензими могу наћи у екстрацелуларном матриксу где узрокују деструкцију околних ћелија и ткива. Током некрозе, ћелије оштећене физичкохемијским агенсима пролазе кроз серију карактеристичних промена: ћелије и њихове органеле бубре, јер је способност ћелијске мембране да контролише равнотежу течности и електролита нарушена; ћелијски садржај се ослобађа и доспева у међућелијски простор, индукује инфламацију и последичну деструкцију околног ткива.

Апоптоза је пожељан вид ћелијске смрти јер представља тзв. програмирану ћелијску смрт, низ догађаја где долази до аутодеструкције ћелије без руптуре ћелијске мембране, самим тим без изласка унутарћелијског садржаја у екстрацелуларни простор. То је процес елиминисања нефункционалних ћелија. Ћелија може активно, уз утрошак енергије, да покрене властиту смрт. Саставни је део физиолошких процеса и одговор је на одређена патолошка стања. Апоптоза, умирање изнутра, је високо регулисан процес који се дешава у једној ћелији независно од околних дешавања. Светлосна и електронска микроскопија показале су многе морфолошке промене на ћелији током апоптозе [71]. На почетку процеса апоптозе светлосном микроскопијом су, као први знаци апоптозе, видљиви смежуравање ћелије и пикноза једра [72]. Ћелије губе волумен, цитоплазма постаје гушћа, а органеле збијено распоређене. Пикноза је последица кондензације хроматина, и једро често добија облик потковице. Долази до инверзије ћелијске

мембране што визуелно заокругљује апоптотски измењену ћелију. У исто време разара се ћелијски матрикс, фрагментисе једро и распарчава ДНК. Ово је енергетски завистан процес за разлику од некрозе. Ове промене одигравају се на нивоу ћелије и не долази до ослобађања интрацелуларног садржаја. Следи бубрење ћелијске мембране и одвајања делова ћелије у апоптотска телашца. Телашца садрже цитоплазму и густо спаковане органеле, као и фрагменте једра. Запаљенска реакција изостаје јер апоптотске ћелије не ослобађају садржај у међућелијски простор, а апоптотска телашца бивају брзо фагоцитована (Слика 12) [73,74]. Око 10 милијарди ћелија умире путем апоптозе сваког дана у просечном људском организму [75,76]. Апоптоза обезбеђује равнотежу између настанка и умирања ћелија и има важну улогу у ембриогенези. У ембрионалном развоју апоптоза потпомаже формирање органа (нпр. одвајање прстију током ембриогенезе одвија се строго контролисаним механизмима апоптозе). Ћелијска смрт без пратећег инфламаторног одговора један је од најбољих начина за разликовање апоптозе и некрозе.

Апоптоза има кључну улогу у формирању имунског репертоара. Т и В лимфоцити, као носиоци специфичне имуности током процеса сазревања који се одвија у тимусу (Т ћелије) и костној сржи (В лимфоцити) реаранжирају своје рецепторе. Процесом апоптозе елиминишу се они лимфоцити који су нефункционални и они лимфоцити који показују склоност ка аутодеструкцији, односно, оне ћелије које су способне да реагују против сопствених антигена. Дакле, апоптоза је одговорна за елиминацију аутореактивних клонова Т и В лимфоцита и превенцију настанка аутоимунских болести.



Слика 12. Шематски приказ смрти ћелије апоптозом

2.3.1. Цитотоксичност комплекса платине(II) и платине(IV) са edda- и R₂edda-типом лигананда

Са edda-типом лигананда, слично JM-216, платина има Cl₂N₂O₂ донорски сет атома. Иако са естрима R₂edda-типа платина нема такво координационо окружење, већ Cl₄N₂, ипак естерификовани деривати обећавају у области развоја платина(IV) лекова против рака.

Комплекси платине(II) и платине(IV) са лигандима који су деривати етилендиамина *N*-(2-хидроксиетил)етилендиамин (heen), *N,N'*-бис(2-хидроксиетил)етилендиамин (he₂en), етилендиамин-*N,N'*-дисирћетна киселина (H₂edda) и етилендиамин-*N*-моносирћетна киселина (Hedma) су испитани на пет ћелијских линија хуманог карцинома јајника: CH1, A2780, Skov-3, CH1cisR и A2780cisR, од којих су последње две резистентне на цисплатину (6 и 12 пута

резистентне) [31]. Неки од ових комплекса показују умерену антитуморску активност, али је та активност и даље знатно мања него она коју имају цисплатина и JM-216.

Испитивања комплекса платине(II) и платине(IV) са естарским дериватима eddp (Слика 13, а), (Табела 3.) су показала да су најактивнији тетраклоридоплатина(IV) комплекси: (1) према ћелијама HeLa око пет пута мање активни од цисплатине и (2) према ћелијама хумане мијелоидне леукемије K562. Активност је упоређена са цисплатином. Ови комплекси изазивају смрт ћелија апоптозом [74].

Табела 3. IC₅₀ (μM)^a на HeLa, K562 ћелијама, на PBMС и PBMС стимулираних са РНА, одређене МТТ тестом (72 h), за [PtX₄(R₂eddp)] (X = Cl, Br, I) и за цисплатину.

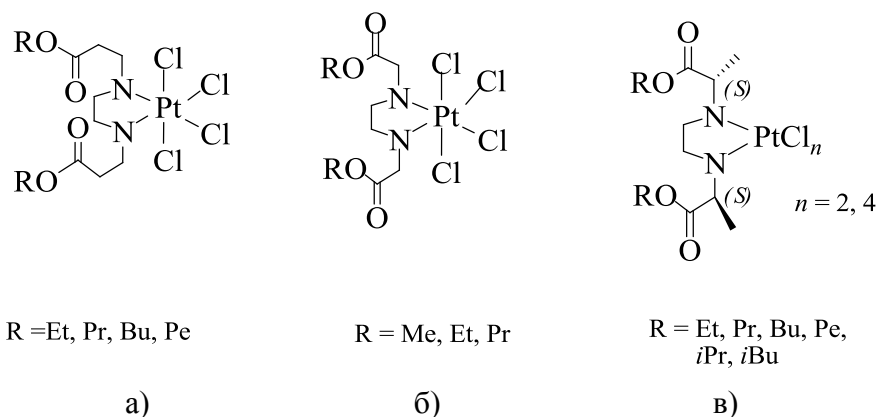
Једињење \ ћелијска линија	IC ₅₀ ± SD			
	HeLa	K562	PBMС	PBMС+РНА
[PtCl ₄ (Bu ₂ eddp)]	15 ± 3	7 ± 2	15 ± 6	11 ± 4
[PtBr ₃ Cl(Bu ₂ eddp)]	37 ± 2	16 ± 4	44 ± 6	25 ± 8
[PtCl ₂ I ₂ (Bu ₂ eddp)]	89 ± 8	36 ± 3	110 ± 13	75 ± 19
[PtCl ₄ (Pe ₂ eddp)]	16 ± 3	6 ± 2	17 ± 7	11 ± 5
[PtCl ₂ (Bu ₂ eddp)]	76 ± 2	59 ± 7	>100	76 ± 14
цисплатина	4,5 ± 0,3	5,8 ± 0,3	33,6	26 ± 6

^a Средња вредност ± SD из три до четири експеримента

Неколико платина(II) и платина(IV) комплекса је испитивано на ћелијским линијама тумора мишјег фибросаркома L929 и хуманог астроцитома U251 [63]. *In vitro* антитуморска активност платина(IV) комплекса са R₂eddp лигандима, (R = *n*-бутил и *n*-пентил), [PtCl₄(R₂eddp)] (Слика 13, а), је такође испитивана на обе ћелијске линије. Нађено је да је процес ћелијске смрти изазван овим комплексима знатно бржи у односу на онај који је изазван активношћу цисплатине. Истраживања су показала да [PtCl₄(Bu₂eddp)] и [PtCl₄(Pe₂eddp)] изазивају некрозу, посредством кисеоничних радикала, независно од ERK, за разлику од цисплатине која изазива ERK-зависну ћелијску смрт апоптозом без оксидативног стреса [75].

Слични комплекси платине са R₂edda уместо R₂eddp [PtCl₄(R₂edda)] (R = Me, Et и *n*-Pr), су такође испитивани да би се открио утицај супституента R на *in*

in vitro антипролиферативну активност. Испитивања су вршена на различитим туморским ћелијским линијама: 1411HP, H12.1 (канцери тестиса), DLD-1 (карцином дебелог црева), 518A2 (меланом), A549 (карцином плућа) и липосарком [40]. Активност комплекса зависи од броја угљеникових атома у естарском ланцу R – што је дужи ланац, већа је активност. Ћелијска линија карцинома дебелог црева DLD-1, резистентна на цисплатину, је била једина која не показује овакав тренд. Све ћелијске линије, изузев ћелија DLD-1, су показале ћелијску смрт апоптозом када су се користиле IC₉₀ концентрације комплекса [40]. Комплекси [PtCl₄(Et₂edda)] и [PtCl₄(Pr₂edda)] су цитотоксички ефикаснији на цисплатина-резистентним 1411HP ћелијама (IC₅₀ ~ 35–40 μM) у поређењу са њиховим ефектом на цисплатина-осетљивим H12.1 ћелијама (IC₅₀ ~ 58–59 μM) или DLD-1 ћелијама (IC₅₀ није одређена у коришћеним експерименталним условима). Рачvasti лиганд прекурсори (S,S)-R₂eddiр·2HCl ((S,S)-eddiр = (S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-пропаноат; R = *i*Pr и *i*Bu) и одговарајући дихлоридоплатина(II) и тетраклоридоплатина(IV) комплекси, [PtCl_n{(S,S)-R₂eddiр}] (*n* = 2, 4; Слика 13. в), тестирани су на *in vitro* антипролиферативну активност према хуманим ћелијским линијама аденокарцинома материце HeLa, хуманим ћелијским линијама мијелоидне леукемије K562, хуманим ћелијским линијама малигног меланома Fem-x и према нормалним имунокомпетентним ћелијама - мононуклеарне ћелије периферне крви (PBMC), као и на PBMC ћелијама (PBMC+PHA) користећи KBR тест [76]. Нађено је да је најактивније једињење комплекс платине(IV) [PtCl₄{(S,S)-*i*Pr₂eddiр}]. Ово једињење најактивније је према K562 ћелијама и показује упола мању активност од цисплатине. Исто једињење показује велику селективност према K562 и Fem-x ћелијама. Комплекси платине(II) су такође показали значајну антитуморску активност и селективност али мању у односу на одговарајуће платина(IV) комплексе.



Слика 13. Комплекси Pt(IV) и Pt(II) са R₂edda-типом лиганата

Полазна тачка детаљнијих испитивања су резултати добијени проучавањем платина(IV) комплекса са естрима eddp према L929 и U251 ћелијама. Одређивана је активност комбинованог дејства антрахинонског деривата *алоје емодина* (АЕ) са цисплатином или [PtCl₄(Bu₂eddp)] на одабраним ћелијским линијама [77]. Добијени резултати указивали су да комбиновање АЕ са цисплатином може умањити антитуморски ефекат саме цисплатине, јер се сузбија ERK-зависна ћелијска смрт. Уместо тога, комбиновањем АЕ са платинским једињењима која не захтевају ERK за сопствену цитотоксичну активност, као што је [PtCl₄(Bu₂eddp)], изгледа вредно да се размотри као алтернативни терапеутски приступ. Са друге стране, уношење АЕ у одвојено време као помоћно средство у терапији цисплатином може бити добар начин за заштиту нормалног ткива од токсичних ефеката цисплатине [77]. *In vivo* истраживања активности ових комбинација су у току.

Слични комплекси платине са R₂edda уместо R₂eddp [PtCl₄(R₂edda)] (R = Me, Et и *n*-Pr), (Слика 13, б), су такође испитивани да би се установио утицај супституента R на *in vitro* антипролиферативну активност. Испитивања су вршена на различитим туморским ћелијским линијама: 141HP, H12.1 (канцери тестиса), DLD-1 (карцином дебелог црева), 518A2 (меланом), A549 (карцином плућа) и липосарком [40]. Активност комплекса зависи од броја угљеникових атома у естарском ланцу R – што је дужи ланац, већа је активност. Ћелијска линија карцинома дебелог црева DLD-1, резистентна на цисплатину, је била једина која не показује овакав тренд. Све ћелијске линије, изузев ћелија DLD-1, су показале

ћелијску смрт апоптозом када су се користиле IC_{90} концентрације комплекса [40]. Комплекси $[PtCl_4(Et_2edda)]$ и $[PtCl_4(Pr_2edda)]$ су цитотоксички ефикаснији на цисплатина-резистентним 1411HP ћелијама ($IC_{50} \sim 35\text{--}40 \mu\text{M}$) у поређењу са њиховим ефектом на цисплатина-осетљивим H12.1 ћелијама ($IC_{50} \sim 58\text{--}59 \mu\text{M}$) или DLD-1 ћелијама (IC_{50} није одређена у коришћеним експерименталним условима).

У скоријој студији испитивана је цитотоксичност *NN* бидентатних платина(IV) комплекса са диетил и дипропил естрима eddp, као и самих естара на десет различитих туморских ћелијских линија: A2780 (јајници), A431 (грлић материце), 518A2 (меланом), A549 (плућа), FaDu (глава и врат), HT-29, HCT-8, DLD-1, 8505C, SW480 (дебело црево) [78]. Естри су показали ниску антитуморску активност, док су комплекси показали велику активност на туморским ћелијским линијама, а највећу на A2780 и A431 линијама (Табела 4.).

Табела 4. IC_{50} вредности [μM] за Et_2eddp , Pr_2eddp , $[PtCl_4(Et_2eddp)]$, $[PtCl_4(Pr_2eddp)]$ и цисплатину

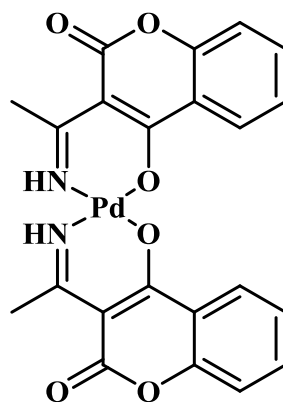
	$Et_2eddp \cdot 2HCl$, $Pr_2eddp \cdot 2HCl$	$[PtCl_4(Et_2eddp)]$	$[PtCl_4(Pr_2eddp)]$	цисплатина
A2780		$13,78 \pm 0,37$	$8,60 \pm 0,23$	0,5
A431		$32,30 \pm 0,21$	$19,62 \pm 0,48$	0,6
518A2		$43,95 \pm 2,57$	$17,99 \pm 2,38$	1,5
A549		$35,06 \pm 0,27$	$20,81 \pm 0,47$	1,5
FaDu	>125	$48,20 \pm 0,47$	$31,24 \pm 0,45$	1,2
HT-29		$38,23 \pm 0,90$	$32,80 \pm 0,35$	0,6
HCT-8		$36,24 \pm 0,31$	$31,78 \pm 0,55$	1,5
SW480		$35,48 \pm 2,54$	$26,24 \pm 4,61$	3,2
8505C		$48,04 \pm 4,76$	$25,23 \pm 1,73$	5
DLD-1		$89,26 \pm 1,17$	$49,03 \pm 4,02$	5

Такође је рађен тест интеракције ових комплекса са pBR322 плазмидом ДНК у одсуству, као и у присуству аскорбинске киселине, која може да редукује комплексе Pt(IV) до комплекса Pt(II) и нађено је да и Pt(IV) и Pt(II) комплекси интерагују са DNK [78]. То значи да се ови комплекси платине(IV) могу користити и као „пролекови“ и као лекови против рака.

2.3.2. Цитотоксичност комплекса паладијума(II)

Откриће антитуморских особина цисплатине и сличних комплекса платине је повећало интерес према добијању још ефикаснијих комплекса других јона метала и лиганата. Међу првим комплексима коришћеним у клиничким испитивањима против тумора били су паладијум(II) аналози цисплатине, $[\text{PdCl}_2(\text{en})]$ и $\text{PdCl}_2(\text{dach})_2$. Паладијум(II) и платина(II) су меке Луисове (Lewis) киселине и формирају јаче везе са азотовим атомима (односно меким Lewis-овим базама). Уопштено говорећи, платина(II) комплекси су термодинамички и кинетички стабилнији од паладијум(II) аналога. Паладијум(II) комплекси подлежу хидролизи и измени лиганата 10^5 пута брже него одговарајући платина(II) комплекси, што објашњава нижу антитуморску активност $[\text{PdCl}_2(\text{en})]$ и $[\text{PdCl}_2(\text{dach})_2]$ у поређењу са платина(II) аналозима, а такође и њихову велику токсичност [79].

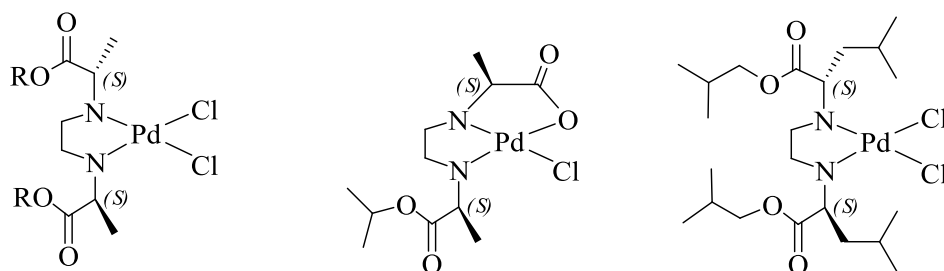
Иако првобитни резултати нису били охрабрујући, комплекси паладијума ипак су много шире проучавани. Паладијум(II) деривати су скоро увек показивали нижу антитуморску активност него цисплатина, због њихове велике лабилности [80,81]. Сматрало се да брза измена лиганата онемогућава да паладијум(II) комплекс стигне до биолошке мете непромењен и да се повећава ризик од неповољних ефеката на биохемијске процесе који се нормално одвијају у ћелијама. Да би се ови проблеми превазишли, неки аутори [82] су предлагали да би употреба хелатних лиганата могла умањити реактивност паладијумовог центра. Успех лекова на бази комплекса метала веома је повезан са избором лиганата, јер од њих зависи реактивности и липофилност, као и стабилизовање одређених оксидационих стања метала, или могућност супституције [83,84]. До сада једина примена паладијума у медицини је у лечењу брзорастућег канцера простате и то користећи радиоактивни изотоп ^{103}Pd [85,86].



Слика 14. Комплекс паладијума(II) са дериватом кумарина, активнији ~7800 пута од карбоплатине

Неки комплекси паладијума(II) ипак имају веома високу цитотоксичност која је упоредива са цисплатином и карбоплатином. Један од изучаваних комплекса (Слика 14.) је чак ~7800 пута активнији од карбоплатине према А549, HeLa и K562 ћелијама, а лиганд у овом случају је дериват кумарина (Слика 14.) [80,81]. Изгледа да са волуминозним и липофилнијим лигандима комплекси паладијума(II) показују бољу антитуморску активност. Приличан број паладијум(II) комплекса са неутралним лигандима, као што су деривати пиридина [82,83], фосфонатни деривати хинолина [84,85] или деривати пиразола [86], су испитивани и њихова значајна цитотоксична активност је доказана.

Недавно је објављен рад у коме су описане синтеза и карактеризација комплекса паладијума(II) са R₂edda-типovima естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропанске киселине, (*S,S*)-R₂eddip·2HCl (Слика 15. **а, б**) [87,88], и изобутил естар (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине (*S,S*)-(iBu₂)eddl·2HCl (Слика 15. **в**) [89]. Естри (*S,S*)-R₂eddip·2HCl и одговарајући паладијум(II) комплекси [PdCl₂{(*S,S*)-R₂eddip}], (R = *iPr*, *iBu*, *cPe*, *Sy*; Слика 15. **а**) коришћени су за *in vitro* антитуморска испитивања [87].



R = *i*Pr, *i*Bu, *c*Pe, Cy

а)

б)

в)

Слика 15. Паладијум(II) комплекси са R₂edda-типovima лигананда

Нађено је да је естар [(*S,S*)-H₂Cy₂eddir]Cl₂ дупло активнији према K562 ћелијама него одговарајући комплекс паладијума(II), [PdCl₂{(*S,S*)-Cy₂eddir}]. Сви испитивани паладијумови комплекси показују средњу активност, а најактивнији комплекс [PdCl₂{(*S,S*)-Cy₂eddir}] има око 10 пута мању активност него цисплатина према K562 ћелијама. Како расте липофилност естарских група, тако расте и активност. Иако су објављени радови у којима су описани веома активни комплекси паладијума, у овом случају је ипак потврђено правило да због лабилности комплекси паладијума не показују значајну антитуморску активност.

2.4. ЦИЉ И ЗАДАТАК ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Појачан интерес за комплексе прелазних метала са лигандима edda-типа и њиховим дериватима јавио се у прошлој деценији када је утврђено да ова једињења имају хидролитичко дејство на молекуле нуклеинских киселина и значајну антитуморску активност, а мање нежељене ефекте, односно токсичност на поједине органе, у односу на цисплатину која се већ примењује у медицини као цитостатик.

Циљ овог рада је синтеза (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂, одговарајућих диестара и комплекса паладијума(II), платине(II) и платине(IV) као и карактеризација и одређивање антитуморске активности синтетисаних једињења.

У оквиру ове докторске дисертације, предвиђени су следећи задаци:

- Синтетисати тетрадентатни лиганд (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанску киселину, [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂
- Синтетисати *O,O'*-диалкил естре тетрадентатног лиганда (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, (*S,S*)-R₂eddl, (R = етил, Et; пропил, *n*-Pr; бутил, *n*-Bu; пентил, *n*-Pe)
- Синтетисати одговарајуће паладијум(II), платина(II) и платина(IV) комплексе са наведеним *O,O'*-диалкил естрима
- Састав лиганада и комплекса утврдити на бази резултата елементалне микроанализе
- Структуру лиганада и награђених комплекса предвидети на бази њихових инфрацрвених и нуклеарно-магнетних спектра
- Структуру лиганада и награђених комплекса потврдити на бази рендгенске структурне анализе, где год је то могуће
- Испитати антитуморску активност наведених лиганада и награђених комплекса метала.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. СИНТЕЗЕ ЛИГАНДА

3.1.1. Синтеза (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, (*S,S*)-H₂eddl

(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанска киселина, (*S,S*)-H₂eddl, је синтетисана на основу модификованог раније описаног поступка [90].

У раствор који садржи 10,000 g (0,250 mol) натријум-хидроксида лагано се, у малим порцијама додаје 32,780 g (0,250 mol) *S*-леуцина. Раствор се рефлукује уз укапавање 23,480 g (0,125 mol) 1,2-диброметана и истовремено додавање 13,240 g (0,125 mol) безводног натријум-карбоната. Раствор се рефлукује још три сата. Након хлађења реакционе смеше и подешавања рН на 4 помоћу раствора НСл/вода (1/1) издваја се чврст, бели производ, (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанска киселина, који се процеди, добро испере водом и осуши на ваздуху, при чему кристалише као дихидрохлорид монохидрат. Принос 42,500 g (89,63%).

Елементална анализа: израчунато за (*S,S*)-H₂eddl·2НСл·Н₂О = C₁₄H₃₂N₂O₅Cl₂: С, 44,33; Н, 8,50; N, 7,38%. Нађено: С, 44,69; Н, 8,10; N, 7,49%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, ppm): 0,94 (d, 12H, C^{6,7}H₃), 1,65 (m, 4H, C⁴H₂), 1,72 (m, 2H, C⁵H), 3,18 (m, 4H, C¹H₂), 3,75 (t, 2H, C²H). ¹³C NMR (200 MHz, D₂O, ppm): 23,79 (C^{6,7}H₃), 24,93 (C⁵H), 27,04 (C⁴H₂), 42,66 (C¹H₂), 56,29 (C²H), 178,39 (COO⁻). IR (cm⁻¹): 3451, 3083, 2957, 2871, 1579, 1470, 1396, 1063, 798, 673, 540.

3.1.2. Синтезе диалкил (*S,S*)-R₂eddl (L1-L4) естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, (*S,S*)-H₂eddl

Диалкил естри (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, (*S,S*)-H₂eddl, се добијају у облику дихидрохлорида: **L1**: *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентаноат, (*S,S*)-Et₂eddl, **L2**: *O,O'*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентаноат, (*S,S*)-Pr₂eddl, **L3**: *O,O'*-дибутил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентаноат, (*S,S*)-Bu₂eddl и **L4**: *O,O'*-дипентил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентаноат, (*S,S*)-Pe₂eddl, а синтетисани су по доле наведеној општој методи.

У балон од 150 cm³ који садржи 50 cm³ одговарајућег апсолутног алкохола (етанол, *n*-пропанол, *n*-бутанол, *n*-пентанол) охлађеног на 0°C у леденом купатилу лагано се укапава тионил-хлорид (4,0 cm³, 55 mmol) током једног сата. Након тога у балон се дода 2,00 g (5,54 mmol) (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине дихидрохлорида, (*S,S*)-H₂eddl·2HCl, и суспензија се рефлукује 16 сати на температури кључања одговарајућег алкохола. Смеша се процеди, филтрат остави у фрижидеру неколико дана. Добијени бели производ се процеди, испере одговарајућим алкохолом и осуши на ваздуху. Нумерација атома је дата на слици 16.

L1·2HCl·H₂O: Принос 1,120 g, 48,78%. Елементална анализа: израчунато за (*S,S*)-Et₂eddl = C₁₈H₃₈N₂O₄Cl₂·H₂O: C, 49,65; H, 9,25; N, 6,43%. Нађено: C, 49,73; H, 8,79; N, 6,44%. ¹H NMR* (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0,96 (d, 12H, ³J_{H,H} = 5,68, C^{6,7}H₃), 1,33 (t, 4H, C⁹H₃), 1,79 (m, 4H, C⁴H₂), 1,92 (m, 2H, C⁵H), 3,49 (s, 4H, C¹H₂), 4,17 (m, 2H, C²H), 4,35 (q, 4H, C⁸H₂). ¹³C NMR* (50 MHz, D₂O, δ ppm): 16,1 (C⁹H₃), 23,7 и 24,9 (C^{6,7}H₃), 27,1 (C⁵H), 41,2 (C⁴H₂), 45,3 (C¹H₂), 62,2 (C²H), 66,8 (C⁸H₂), 173,02 (COOR).

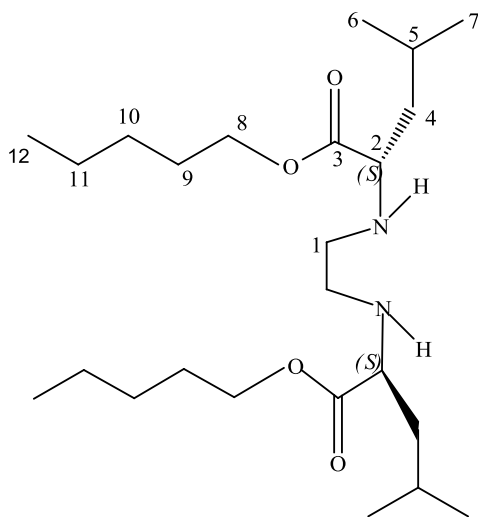
IR (cm^{-1}): 3457, 2975, 2719, 2622, 2527, 2403, 1737, 1546, 1476, 1216, 1066, 1015, 803.

L2·2HCl·0.5H₂O: Принос 0,980 g, 40,90%. Елементална анализа: израчунато за (S,S)- Pr₂eddl = C₂₀H₄₂N₂O₄Cl₂·0.5H₂O: C, 52,86; H, 9,54; N, 6,16%. Нађено: C, 52,74; H, 9,21; N, 6,36%. **¹H NMR*** (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0,93 (t, 6H, C¹⁰H₃), 0,95 (d, 12H, ³J_{H,H}=6,10, C^{6,7}H₃), 1,60-2,00 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,76 (m, 4H, C⁹H₂), 3,51 (s, 4H, C¹H₂), 4,15 (m, 2H, C²H), 4,25 (t, 4H, ³J_{H,H} = 6.48 C⁸H₂). **¹³C NMR*** (50 MHz, D₂O, δ ppm): 14,0 (C¹⁰H₃), 25,1 (C⁹H₂), 25,6 и 28,4 (C^{6,7}H₃), 28,7 (C⁵H), 42,6 (C⁴H₂), 46,6 (C¹H₂), 63,7 (C²H), 73,6 (C⁸H₂), 174,3 (COOR). **IR** (cm^{-1}): 3453, 2966, 2721, 2621, 2528, 2407, 1735, 1547, 1472, 1210, 1065, 927, 802.

L3·2HCl·H₂O: Принос 1,020 g, 39,38%. Елементална анализа: израчунато за (S,S)- Bu₂eddl = C₂₂H₄₆N₂O₄Cl₂·H₂O: C, 53,75; H, 9,84; N, 5,69%. Нађено: C, 53,29; H, 9,48; N, 5,78%. **¹H NMR*** (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0,91 (t, 16H, C¹¹H₃), 0,95 (d, 12H, ³J_{H,H} = 5,04, C^{6,7}H₃), 1,38 (m, 4H, C¹⁰H₂), 1,60-2,00 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,69 (m, 4H, C⁹H₂), 3,47 (s, 4H, C¹H₂), 4,15 (m, 2H, C²H), 4,30 (t, 4H, C⁸H₂). **¹³C NMR*** (50 MHz, D₂O, δ ppm): 15,8 (C¹¹H₃), 21,5 (C¹⁰H₂), 23,7 и 25,0 (C^{6,7}H₃), 27,2 (C⁹H), 32,7 (C⁵H₂), 41,3 (C⁴H₂), 45,4 (C¹H₂), 62,2 (C²H), 70,4 (C⁸H₂), 173,3 (COOR). **IR** (cm^{-1}): 3455, 2963, 2716, 2619, 2526, 2405, 1736, 1546, 1470, 1209, 1062, 925, 803.

L4·2HCl·H₂O: Принос 0,960 g, 35,05%. Елементална анализа: израчунато за (S,S)- Pe₂eddl = C₂₄H₅₀N₂O₄Cl₂·H₂O: C, 55,47; H, 10,08; N, 5,39%. Нађено: C, 55,32; H, 9,83; N, 5,14%. **¹H NMR*** (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0,91 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7,20, C¹²H₃), 0,99 (d, 12H, ³J_{H,H} = 5,40, C^{6,7}H₃), 1,36 (m, 8H, C^{10,11}H₂), 1,60-2,00 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,74 (m, 4H, C⁹H₂), 3,53 (s, 4H, C¹H₂), 4,22 (m, 2H, C²H), 4,32 (t, 4H, C⁸H₂). **¹³C NMR*** (50 MHz, D₂O, δ ppm): 16,15 (C¹²H₃), 23,25 (C¹¹H₃), 26,94 (C¹⁰H₂), 30,27 (C⁹H₂), 24,51 (C^{6,7}H₃), 24,99 (C⁵H), 41,37 (C⁴H₂), 45,40 (C¹H₂), 62,24 (C²H), 70,62 (C⁸H₂), 173,36

(COOR). IR (cm^{-1}): 3452, 2960, 2726, 2623, 2525, 2401, 1736, 1543, 1470, 1211, 1066, 956, 798.



Слика 16. Нумерација атома коришћених за дискусију NMR спектра

3.2. СИНТЕЗЕ КОМПЛЕКСА

3.2.1. Комплекси паладијума(II): [PdCl₂L1]:

дихлоридо(*O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-
-пентаноат)паладијум(II), [PdCl₂{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PdCl₂L2]:
дихлоридо(*O,O'*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-
-пентаноат)паладијум(II), [PdCl₂{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PdCl₂L3]:
дихлоридо(*O,O'*-дибутил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-
-пентаноат)паладијум(II), [PdCl₂{(*S,S*)-Bu₂eddl}], [PdCl₂L4]:
дихлоридо(*O,O'*-дипентил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-
-пентаноат)паладијум(II), [PdCl₂{(*S,S*)-Pe₂eddl}]

Комплекси паладијума(II) су добијени мешањем 10 cm³ воденог раствора K₂[PdCl₄] (0,200 g, 0,610 mmol) и одговарајућих лиганата ((*S,S*)-Et₂eddl·2HCl·H₂O: 0,267g, 0,610 mmol; (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl·H₂O: 0,277g, 0,61mmol; (*S,S*)-
-Bu₂eddl·2HCl·H₂O: 0,301 g, 0,610 mmol; (*S,S*)-Pe₂eddl·2HCl·H₂O: 0,318g, 0,610mmol). Током мешања од 2 сата, у реакциону смешу се укапава 10 cm³ воденог раствора LiOH (0,0293 g, 1,220 mmol). Након укапавања добијени су жути талози комплекса, који се процеде, исперу са мало ледене воде и осуше на ваздуху. [PdCl₂L1]·0,5H₂O: Принос 0,260 g, 80,00%. Елементална анализа: израчунато за [PdCl₂{(*S,S*)-Et₂eddl}] = C₁₈H₃₆N₂O₄Cl₂Pd·0,5H₂O: C, 40,73; H, 7,02; N, 5,27%. Нађено: C, 40,83; H, 6,93; N, 5,44%. Изомер А: ¹H NMR* (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,94 (d, 12H, ³J_{H,H} = 3,66, C^{6,7}H₃), 1,28 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7,10, C⁹H₃), 1,60-2,10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 2,52 (m, 4H, C¹H₂), 3,48 (q, 2H, C²H), 4,33 (m, 4H, C⁸H₂), 6,30-6,50 (s, 2H, NH). ¹³C NMR* (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 14,1 (C⁹H₃), 21,7 (C^{6,7}H₃), 24,6 (C⁵H), 37,7 (C⁴H₂), 48,9 (C¹H₂), 59,6 (C²H), 61,6 (C⁸H₂), 169,6 (COOR). Изомер В: ¹H NMR* (200

MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,92 (d, 12H, ³J_{H,H} = 3,66, C^{6,7}H₃), 1,39 (t, 4H, ³J_{H,H} = 7,14, C⁹H₃), 1,60-2,10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 2,80 (m, 4H, C¹H₂), 3,73 (q, 2H, C²H), 4,19 (m, 4H, C⁸H₂), 5,85-6,05 (s, 2H, NH). ¹³C NMR* (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 14,2 (C⁹H₃), 22,7 (C^{6,7}H₃), 24,6 (C⁵H), 38,9 (C⁴H₂), 49,3 (C¹H₂), 59,6 (C²H), 60,4 (C⁸H₂), 171,6 (COOR). IR (cm⁻¹): 3088, 2960, 2872, 1739, 1468, 1370, 1239, 1194, 1143, 1024, 934, 849, 774.

[PdCl₂L2]: Принос 0,300 g, 89,45%. Елементална анализа: израчунато за [PdCl₂{(S,S)-Pr₂eddl}] = C₂₀H₄₀N₂O₄Cl₂Pd: C, 43,68; H, 7,33; N, 5,09%. Нађено: C, 43,33; H, 7,12; N, 5,03%. Изомер А: ¹H NMR* (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,92 (d, 12H, ³J_{H,H} = 3,74, C^{6,7}H₃), 1,07 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6,82, C¹⁰H₃), 1,60-2,10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,70 (m, 4H, C⁹H₂), 2,54 (m, 4H, C¹H₂), 3,48 (q, 2H, C²H), 4,25 (m, 4H, C⁸H₂), 6,30-6,50 (s, 2H, NH). ¹³C NMR* (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 10,4 (C¹⁰H₃), 21,9 (C^{6,7}H₃), 22,7 (C⁹H₂), 26,0 (C⁵H), 37,8 (C⁴H₂), 49,3 (C¹H₂), 60,3 (C²H), 67,2 (C⁸H₂), 171,5 (COOR). Изомер В: ¹H NMR* (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,92 (d, 12H, ³J_{H,H} = 3,74, C^{6,7}H₃), 1,25 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6,82, C¹⁰H₃), 1,60-2,10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,70 (m, 4H, C⁹H₂), 2,82 (m, 4H, C¹H₂), 3,72 (q, 2H, C²H), 4,08 (m, 4H, C⁸H₂), 5,85-6,05 (s, 2H, NH). ¹³C NMR* (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 10,4 (C¹⁰H₃), 21,6 (C^{6,7}H₃), 23,7 (C⁹H₂), 24,7 (C⁵H), 38,9 (C⁴H₂), 48,9 (C¹H₂), 59,6 (C²H), 67,1 (C⁸H₂), 169,8 (COOR). IR (cm⁻¹): 3143, 2961, 2875, 1739, 1468, 1389, 1241, 1195, 1144, 1057, 946, 845, 775.

[PdCl₂L3]: Принос 0,330 g, 93,19%. Елементална анализа: израчунато за [PdCl₂{(S,S)-Bu₂eddl}] = C₂₂H₄₄N₂O₄Cl₂Pd: C, 45,72; H, 7,67; N, 4,84%. Нађено: C, 45,49; H, 7,78; N, 4,77%. Изомер А: ¹H NMR* (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,93 (d, 12H, ³J_{H,H} = 6,60, C^{6,7}H₃), 1,08 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7,40, C¹¹H₃), 1,40 (sex, 4H, C¹⁰H₂), 1,60-2,10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,70 (m, 4H, C⁹H₂), 2,55 (m, 4H, C¹H₂), 3,20 (m, 2H, C²H), 4,28 (t, 4H, C⁸H₂), 6,20-6,60 (m, 2H, NH). ¹³C NMR* (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13,6 (C¹¹H₃), 19,1 (C^{6,7}H₃), 21,6 (C¹⁰H₂), 25,9 (C⁵H), 30,4 (C⁹H₂), 38,9 (C⁴H₂), 48,9 (C¹H₂), 60,3 (C²H), 65,5 (C⁸H₂), 171,5 (COOR). Изомер В: ¹H NMR* (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,93 (d, 12H, ³J_{H,H} = 6,60, C^{6,7}H₃), 1,08 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7,40, C¹¹H₃), 1,40 (sex, 4H, C¹⁰H₂), 1,60-2,10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,70 (m, 4H, C⁹H₂), 2,81 (m, 4H, C¹H₂), 3,20 (m, 2H, C²H), 4,12 (t, 4H, C⁸H₂), 5,60-6,10 (m, 2H, NH). ¹³C NMR* (50 MHz, CDCl₃, δ

ppm): 13,7 ($C^{11}H_3$), 19,1 ($C^{6,7}H_3$), 22,6 ($C^{10}H_2$), 24,6 (C^5H), 30,5 (C^9H_2), 37,7 (C^4H_2), 49,1 (C^1H_2), 59,5 (C^2H), 65,3 (C^8H_2), 169,8 (COOR). **IR** (cm^{-1}): 3133, 2960, 2872, 1740, 1466, 1369, 1241, 1197, 1143, 1089, 938, 844, 736.

[PdCl₂L4]·2,5H₂O: Принос 0,290 g, 72,72%. Елементална анализа: израчунато за [PdCl₂{(S,S)-Pe₂eddl}] = C₂₄H₄₈N₂O₄Cl₂Pd·2,5H₂O: C, 44,27; H, 8,20; N, 4,30%. Нађено: C,43,79; H, 8,01; N, 4,57%. Изомер А: **¹H NMR*** (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,91 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6,60 C¹²H₃), 1,03 (d, 12H, ³J_{H,H} = 6,60 C^{6,7}H₃), 1,33 (m, 8H, C^{10,11}H₂), 1,60-2,20 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,66 (m, 2H, C⁹H), 3,20 (m, 4H, C¹H₂), 3,84 (m, 2H, C²H), 4,19 (t, 4H, C⁸H₂). 5,90-6,10 (s, 2H, NH). **¹³C NMR*** (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13,8 (C¹²H₃), 22,1 (C^{6,7}H₃), 2,7 (C¹¹H₂), 24,9 (C¹⁰H₂), 27,9 (C⁹H₂), 28,0 (C⁵H₂), 40,9 (C⁴H₂), 42,8 (C¹H₂), 55,4 (C²H), 66,0 (C⁸H₂), 172,3 (COOR). Изомер В: **¹H NMR*** (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,91 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6,60 C¹²H₃), 1,03 (d, 12H, ³J_{H,H} = 6,60, C^{6,7}H₃), 1,33 (m, 8H, C^{10,11}H₂), 1,60-2,2, (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 3,64 (m, 4H, C¹H₂), 3,84 (m, 2H, C²H), 4,23 (t, 4H, C⁸H₂), 6,30-6,50 (s, 2H, NH). **¹³C NMR*** (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13,8 (C¹²H₃), 22,1 (C^{6,7}H₃), 22,7 (C¹¹H₂), 24,9 (C¹⁰H₂), 27,9 (C⁹H₂), 28,0 (C⁵H), 40,9 (C⁴H₂), 42,8 (C¹H₂), 55,4 (C²H), 66,0 (C⁸H₂), 164,9 (COOR). **IR** (cm^{-1}): 3139, 2959, 2870, 1741, 1466, 1369, 1229, 1197, 1129, 1070, 971, 730.

3.2.2. Комплекси платине(II): [PtCl₂L1]:

дихлоридо(*O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-
-пентаноат)платина(II), [PtCl₂{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PtCl₂L2]:
дихлоридо(*O,O'*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-
-пентаноат)платина(II), [PtCl₂{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PtCl₂L3]:
дихлоридо(*O,O'*-дибутил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-
-пентаноат)платина(II), [PtCl₂{(*S,S*)-Bu₂eddl}], [PtCl₂L4]:
дихлоридо(*O,O'*-дипентил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-
-пентаноат)платина(II), [PtCl₂{(*S,S*)-Pe₂eddl}]

Калијум-тетрахлоридоплатинат(II), K₂[PtCl₄], (0,100 g, 0,240 mmol) се раствори у 10 cm³ воде а затим се дода одговарајући лиганд ((*S,S*)-Et₂eddl·2HCl·H₂O: 0,105 g, 0,240 mmol; (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl·H₂O: 0,109 g, 0,240 mmol; (*S,S*)-Bu₂eddl·2HCl·H₂O: 0,118 g, 0,240 mmol; (*S,S*)-Pe₂eddl·2HCl·H₂O: 0,125 g, 0,240 mmol). Током мешања од два часа у реакциону смешу укапавано је 10 cm³ воденог раствора LiOH (0,0115 g, 0,480 mmol). Уколико дође до стварања смоластог дела, дода се мало ацетона. Након стајања на собној температури од пар дана добијени су светло жути талози комплекса, који се процеде, исперу са мало ледене воде и осуше на ваздуху.

[PtCl₂L1]·(CH₃)₂CO: Принос 0,065 g, 44,46%. Елементална анализа: израчунато за [PtCl₂{(*S,S*)-Et₂eddl}] = C₁₈H₃₆N₂O₄Cl₂Pt·(CH₃)₂CO: C, 37,73; H, 6,33; N, 4,19%. Нађено: C, 37,40; H, 5,84; N, 4,52%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,97 (d, 12H, ³J_{H,H} = 4,40, C^{6,7}H₃), 1,29 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6,80, C⁹H₃), 1,70-2,10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 2,38 (m, 4H, C¹H₂), 3,01 (q, 2H, C²H), 4,29 (m, 4H, C⁸H₂). 6,15-6,75 (s, 2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13,9 (C⁹H₃), 22,3 (C^{6,7}H₃), 25,7 (C⁵H), 30,3 (C⁴H₂), 51,7 (C¹H₂), 61,6 (C²H), 68,2 (C⁸H₂), 171,5 (COOR). IR (cm⁻¹): 3138, 2959, 2872, 1737, 1469, 1369, 1241, 1195, 1136, 1025, 934, 853, 775.

[PtCl₂L2]: Принос 0,067 g, 43,95%. Елементална анализа: израчунато за [PtCl₂{(S,S)-Pr₂eddl}] = C₂₀H₄₀N₂O₄Cl₂Pt: C, 37,62; H, 6,31; N, 4,39%. Нађено: C, 37,87; H, 5,95; N, 4,29%. **¹H NMR** (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,93 (d, 12H, ³J_{H,H} = 4,82, C^{6,7}H₃), 1,03 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7,34, C¹⁰H₃), 1,60-2,10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,71 (m, 4H, C⁹H₂), 2,41 (m, 4H, C¹H₂), 3,48 (q, 2H, C²H), 4,15 (m, 4H, C⁸H₂), 6,10-6,70 (s, 2H, NH). **¹³C NMR** (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 10,4 (C¹⁰H₃), 21,9 (C^{6,7}H₃), 23,7 (C⁹H₂), 25,8 (C⁵H), 29,6 (C⁴H₂), 51,3 (C¹H₂), 60,3 (C²H), 67,2 (C⁸H₂), 171,5 (COOR). **IR** (cm⁻¹): 3144, 2961, 2874, 1737, 1468, 1385, 1238, 1193, 1137, 1057, 932, 839, 743.

[PtCl₂L3]: Принос 0,058 g, 36,63%. Елементална анализа: израчунато за [PtCl₂{(S,S)-Bu₂eddl}] = C₂₂H₄₄N₂O₄Cl₂Pt: C, 39,64; H, 6,65; N, 4,20%. Нађено: C, 39,37; H, 6,70; N, 4,16%. **¹H NMR** (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,90 (d, 12H, ³J_{H,H} = 4,40, C^{6,7}H₃), 0,98 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6,60, C¹¹H₃), 1,34 (m, 4H, C¹⁰H₂), 1,57-2,04 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,66 (m, 4H, C⁹H₂), 3,05 (m, 4H, C¹H₂), 4,13 (m, 2H, C²H), 4,24 (t, 4H, C⁸H₂), 6,10-6,70 (m, 2H, NH). **¹³C NMR** (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13,5 (C¹¹H₃), 18,9 (C^{6,7}H₃), 21,5 (C¹⁰H₂), 23,1 (C⁵H), 24,9 (C⁹H₂), 30,2 (C⁴H₂), 38,9 (C¹H₂), 60,8 (C²H), 66,5 (C⁸H₂), 168,9 (COOR). **IR** (cm⁻¹): 3139, 2960, 2872, 1736, 1468, 1388, 1244, 1195, 1135, 1061, 938, 846, 737.

[PtCl₂L4]·2H₂O: Принос 0,056 g, 32,24%. Елементална анализа: израчунато за [PtCl₂{(S,S)-Pe₂eddl}] = C₂₄H₄₈N₂O₄Cl₂Pt·2H₂O: C, 39,45; H, 7,17; N, 3,83%. Нађено: C, 39,34; H, 7,31; N, 4,18%. **¹H NMR** (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,91 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6,20 C¹²H₃), 1,00 (d, 12H, ³J_{H,H} = 4,80 C^{6,7}H₃), 1,33 (m, 8H, C^{10,11}H₂), 1,63-1,95 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,75 (m, 2H, C⁹H), 3,08 (m, 4H, C¹H₂), 4,12 (m, 2H, C²H), 4,23 (t, 4H, C⁸H₂). 6,10-6,80 (s, 2H, NH). **¹³C NMR** (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13,9 (C¹²H₃), 21,7 (C^{6,7}H₃), 22,2 (C¹¹H₂), 23,7 (C¹⁰H₂), 25,1 (C⁹H₂), 25,9 (C⁵H), 28,1 (C⁴H₂), 51,3 (C¹H₂), 61,0 (C²H), 65,8 (C⁸H₂), 171,5 (COOR). **IR** (cm⁻¹): 3131, 2958, 2871, 1735, 1467, 1398, 1244, 1193, 1137, 1046, 967, 729.

3.2.3. Комплекси платине(IV): [PtCl₄L1]:

тетрахлоридо(*O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(IV), [PtCl₄{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PtCl₄L2]:
тетрахлоридо(*O,O'*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(IV), [PtCl₄{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PtCl₄L3]:
тетрахлоридо(*O,O'*-дибутил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(IV), [PtCl₄{(*S,S*)-Bu₂eddl}], [PtCl₄L4]:
тетрахлоридо(*O,O'*-дипентил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентаноат)платина(IV), [PtCl₄{(*S,S*)-Pe₂eddl}]

Калијум-хексахлоридоплатинат(IV), K₂[PtCl₆], (0,100 g, 0,206 mmol) се раствори у што мање воде на воденом купатилу. У добијени раствор се дода еквимоларна количина одговарајућег лиганда ((*S,S*)-Et₂eddl·2HCl·H₂O: 0,086 g, 0,206 mmol; (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl·H₂O: 0,092g, 0,206 mmol; (*S,S*)-Bu₂eddl·2HCl·H₂O: 0,097 g, 0,206 mmol; (*S,S*)-Pe₂eddl·2HCl·H₂O: 0,103g, 0,206 mmol). Реакциона смеша се меша 12 сати и за то време се додаје 10 cm³ воденог раствора LiOH (0,0099 g, 0,412 mmol) у малим порцијама. Након тога раствор се упари на воденом купатилу до почетка таложења комплекса и остави у фрижидеру, а потом процеди, испере са мало ледене воде и осуши на ваздуху.

[PtCl₄L1]: Принос 87,520 mg, 62,42%. Елементална анализа: израчунато за [PtCl₄{(*S,S*)-Et₂eddl}] = C₁₈H₃₆N₂O₄Cl₄Pt: C, 31,73; H, 5,33; N, 4,11%. Нађено: C, 31,40; H, 5,50; N, 4,42%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,97 (d, 12H, ³J_{H,H} = 5,60, C^{6,7}H₃), 1,29 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7,20, C⁹H₃), 1,60-2,10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 2,97 (m, 4H, C¹H₂), 3,46 (q, 2H, C²H), 4,29 (m, 4H, C⁸H₂). 6,65-6,95 (s, 2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13,8 (C⁹H₃), 21,4 (C^{6,7}H₃), 23,6 (C⁵H), 38,9 (C⁴H₂), 50,4 (C¹H₂), 62,2 (C²H), 63,1 (C⁸H₂), 171,9 (COOR). IR (cm⁻¹): 3132, 2961, 2872, 1731, 1470, 1371, 1329, 1247, 1198, 1126, 1027, 909, 852, 744.

[PtCl₄L2]·H₂O: Принос 92,430 mg, 61,75%. Елементална анализа: израчунато за [PtCl₄{(S,S)-Pr₂eddl}] = C₂₀H₄₀N₂O₄Cl₄PtH₂O: C, 33,02; H, 5,82; N, 3,85%. Нађено: C, 32,84; H, 5,70; N, 4,03%. **¹H NMR** (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,95 (d, 12H, ³J_{H,H} = 7,80, C^{6,7}H₃), 1,01 (t, 6H, ³J_{H,H} = 4,60, C¹⁰H₃), 1,60-2,10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,71 (m, 4H, C⁹H₂), 3,02 (m, 4H, C¹H₂), 3,46 (q, 2H, C²H), 4,22 (m, 4H, C⁸H₂), 6,10-6,70 (s, 2H, NH). **¹³C NMR** (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 10,4 (C¹⁰H₃), 21,6 (C^{6,7}H₃), 23,2 (C⁹H₂), 24,9 (C⁵H), 25,9 (C⁴H₂), 38,7 (C¹H₂), 59,9 (C²H), 68,9 (C⁸H₂), 168,8 (COOR). **IR** (cm⁻¹): 3133, 2962, 2874, 1734, 1472, 1395, 1329, 1254, 1197, 1128, 1058, 933, 744.

[PtCl₄L3]: Принос 98,740 mg, 65,07%. Елементална анализа: израчунато за [PtCl₄{(S,S)-Bu₂eddl}] = C₂₂H₄₄N₂O₄Cl₄Pt: C, 35,83; H, 6,01; N, 3,80%. Нађено: C, 35,75; H, 5,53; N, 4,00%. **¹H NMR** (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,91 (d, 12H, ³J_{H,H} = 5,60, C^{6,7}H₃), 0,98 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6,20, C¹¹H₃), 1,38 (m, 4H, C¹⁰H₂), 1,58-2,04 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,67 (m, 4H, C⁹H₂), 3,05 (m, 4H, C¹H₂), 4,24 (m, 2H, C²H), 4,54 (t, 4H, C⁸H₂) 6,60-6,90 (m, 2H, NH). **¹³C NMR** (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13,5 (C¹¹H₃), 18,9 (C^{6,7}H₃), 21,4 (C¹⁰H₂), 23,1 (C⁵H), 24,9 (C⁹H₂), 30,1 (C⁴H₂), 39,1 (C¹H₂), 62,3 (C²H), 66,8 (C⁸H₂), 172,1 (COOR). **IR** (cm⁻¹): 3129, 2960, 2872, 1731, 1466, 1390, 1330, 1250, 1196, 1126, 1064, 937, 834, 743.

[PtCl₄L4]: Принос 94,520 mg, 60,01%. Елементална анализа: израчунато за [PtCl₄{(S,S)-Pe₂eddl}] = C₂₄H₄₈N₂O₄Cl₂Pt: C, 37,66; H, 6,32; N, 3,66%. Нађено: C, 37,27; H, 6,43; N, 3,89%. **¹H NMR** (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,91 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6,60, C¹²H₃), 1,00 (d, 12H, ³J_{H,H} = 4,80, C^{6,7}H₃), 1,33 (m, 8H, C^{10,11}H₂), 1,63-1,95 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1,68 (m, 2H, C⁹H), 2,77 (m, 4H, C¹H₂), 4,16 (m, 2H, C²H), 4,20 (t, 4H, C⁸H₂). 6,10-6,80 (s, 2H, NH). **¹³C NMR** (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13,9 (C¹²H₃), 22,1 (C^{6,7}H₃), 22,2 (C¹¹H₂), 22,3 (C¹⁰H₂), 24,6 (C⁹H₂), 27,8 (C⁵H), 28,0 (C⁴H₂), 39,5 (C¹H₂), 52,3 (C²H), 66,9 (C⁸H₂), 170,0 (COOR). **IR** (cm⁻¹): 3231, 2959, 2871, 1739, 1467, 1401, 1228, 1193, 1133, 1046, 961, 729.

3.3. МЕРЕЊА

3.3.1. Елементална анализа

Елементалне анализе (C, H, N) су урађене уз помоћ CHNS-932 (LECO) Elemental Analyzer или Vario EL III C, H, N, S Elemental Analyzer.

3.3.2. Инфрацрвени спектри

Инфрацрвени спектри су снимљени помоћу спектрофотометара Perkin-Elmer FTIR 31725-X и Perkin-Elmer Spectrum One FTIR (КВг техника), (4000–300 cm^{-1}).

3.3.3. ^1H и ^{13}C NMR спектри

^1H и ^{13}C NMR спектри снимани су на Varian “Gemini 2000” (200 MHz) NMR спектрометру.

3.4. РЕНДГЕНСКА СТРУКТУРНА АНАЛИЗА

3.4.1. *O,O'*-Дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)- -пентаноат дихидрохлорид, (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl

Беличасти провидни кристали погодни за рендгенску структурну анализу добијени су растварањем (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl у што мање топле воде и стајањем раствора неколико дана на собној температури.

Подаци о монокристалу прикупљени су на дифрактометру CrysAllis CCD [91] који је служио за одређивање параметара јединичне ћелије и прикупљање интензитета дифракционих максимума. Коришћено је CuK/α ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$) зрачење монохроматизовано графитним монохроматором. Кристална структура решена је директним методама коришћењем Sir2002 [92,93]. Анизотропија најмањих квадрата реализована је уз SHELXL-97 [94]. Геометријски прорачуни су урађени са PARST97 [95], а молекулски графици са ORTEP [96], и Mercury [97]. Детаљнији подаци дати су у Табели 5.

Табела 5. Основни кристалографски подаци за (S,S)-Pr₂eddl·2HCl

Емпиријска формула	C ₂₀ Cl ₂ H ₄₂ O ₄ N ₂
M	445,469
Температура (K)	293
Таласна дужина (Å)	1,54184
Кристални систем	Тетрагоналан
Просторна група	<i>P4</i> ₂
<i>a</i> (Å)	16,562 (2)
<i>b</i> (Å)	16,562 (2)
<i>c</i> (Å)	5,224 (1)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
<i>V</i> (Å ³)	1432,9 (3)
<i>Z</i>	2
μ (mm ⁻¹)	2,215
<i>F</i> (000)	484
Величина кристала (mm)	0,0702 × 0,0235 × 0,0111
Измерене рефлексије	8570
Независне рефлексије	2869
R(int)	0,0663
R ₁ , wR ₂ [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0,0769, 0,1911
Апсолутни структурни параметар	0,05 (6)

3.5. DFT ПРОРАЧУНИ

Геометрије свих структура су потпуно оптимизоване DFT методом, при чему се електронска енергија оптимизује у односу на електронску густину. Израчунавања су изведена коришћењем програма Gaussian 03 [98]. Све структуре су оптимизоване користећи MPW1PW91 функционал [99]. У прорачунима је употребљен SDD базис сет за све атоме [100].

3.6. IN VITRO АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ

3.6.1. Ћелијске линије

Као циљне ћелијске линије у нашем раду коришћене су: SW480 (ћелијске линије хуманог колоректалног аденокарцинома), MDA-MB-361 и MDA-MB-453 (ћелијске линије хуманог карцинома дојке), Jurkat (акутна леукемија Т лимфоцита), K562 (хронична мијелоидна леукемија) и као CLL ћелије (ћелије хроничне В лимфоцитне леукемије изоловане из периферне крви оболелих).

3.6.2. Хранљиви медијум

За раст и одржавање CLL ћелија, Jurkat и K562 ћелијских линија коришћен је хранљиви медијум RPMI 1640 са 10% инактивисаним серумом говечета (FBS), L-глутамином, тако да финална концентрација буде 3 mM, затим са 100 IU/mL пеницилина, 100*g/mL стрептомицина и 25 mM Нереса, рН је подешено на 7,2 бикарбонатним раствором. За MDA-MB-361 и MDA-MB-453 ћелијске линије коришћен је исти медијум, само са додатком глукозе 1,11g/L подлоге. SW480 ћелије су рутински одржаване у DMEM медијуму.

3.6.3. Третман ћелијских линија

Испитивана једињења су најпре растворена у DMSO-у, до шток концентрације од 20 mM. Након тога, једињења се у хранљивом медијуму разблажују до одговарајућих радних концентрација. У тестовима за одређивање ћелијског преживљавања (МТТ и КВР тест) коришћене су микротитар плоче са 96 бунарића (Nunc, Nalgene, Danska). Ћелије су равномерно засејаване у одговарајућој

густина. Густина Jurkat ћелија је била 15000 ћелија по бунарићу у 100 μL подлоге, MDA-MB-361 ћелија 7000 ћелија по бунарићу у 100 μL подлоге, густина MDA-MB-453 ћелија 3000 ћелија по бунарићу, у 100 μL подлоге, густина K562 ћелија 5000 ћелија по бунарићу у 100 μL подлоге а SW480 ћелија 5000 ћелија по бунарићу; као слепа проба коришћен је хранљиви медијум. 24 часа након засејавања ћелија, у бунариће са малигним ћелијама као и у одговарајуће слепе пробе, додато је по 50 μL пет различитих концентрација испитиваних једињења, а на контролне ћелије и слепе пробе, додато је по 50 μL свежег хранљивог медијума. Изузетно, код K562 ћелија које расту у суспензији, испитивана једињења су додавана 2 часа након сађења у микротитар плејтове. Финалне концентрације испитиваних једињења примењене на циљне малигне ћелије биле су: 5, 10, 25, 50 и 100 μM осим за SW480 ћелије: 1,60; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 μM . Ћелије су инкубиране 72 h у CO_2 инкубатору на 37 $^\circ\text{C}$. Након инкубације, у сваки бунарић је додато по 20 μL MTT раствора (5 mgMTT/mL PBS), а 4 h касније је додато 100 μL раствора 10% SDSa. Следећег дана, абсорбанца је мерена на 570 nm на ELISA читачу. У експерименту је праћен антипролиферативни ефекат испитиваних једињења у односу на контролну групу малигну ћелија раслих у свежем медијуму. Ћелијско преживљавање је израчунато тако што се абсорбанца узорака са слепом пробом, (As), одузима од абсорбанце узорака са третираним ћелијама (At), помножи са сто, и на крају подели са абсорбанцом контроле, (AK-As).

$$S(\%) = (At - As) \times 100 / (Ak - As)$$

IC_{50} концентрација се дефинише као концентрација супстанце која за 50% инхибира ћелијско преживљавање у односу на нетретирану контролу.

3.6.4. CLL ћелије

Хронична В лимфоцитна леукемија, CLL-B је најчешћа хронична леукемија одраслих у земљама Европе и Северне Америке. Карактерише се акумулацијом на изглед зрелих В лимфоцита (IgM, IgD, CD23, CD19, CD20, CD5) у крви, лимфним

чворовима, костној сржи, што је праћено леукоцитозом, лимфаденопатијом, хепатоспленомегалијом дисфункцијом костне сржи, рекурентним инфекцијама и често аутоимунским поремећајима (16 ревијски приказ). Око 80% CLL је удружено са карактеристичним хромозомским аберацијама (13q14 који садрже 2 miRNA miR-15a miR16-1; 11q23 који кодира АТМ; 17p13 који кодира p53). Такође присутне су епигенетске промене: хипометилација BCL-2; метилација промотора за DAPK1, молекула који у случају стреса ћелије, недостатка фактора раста изазива апоптозу или аутофагију у зависности од ћелије и окружења [101].

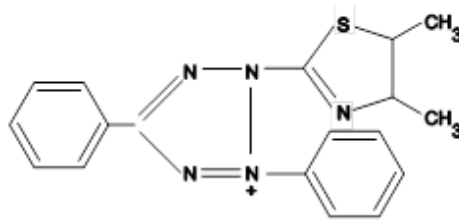
Свака терапијска мера CLL праћена је развојем резистенције. Резистенција CLL ћелија је за сада најбоље повезана са делецијом или аберацијом p53, пацијенти који имају мутације у овом гену су резистентни на терапију и имају лошу прогнозу [102]. Резистенцији доприноси и целуларно микроокружење, CLL ћелије по изолацији из пацијента врло брзо улазе у апоптозу. CLL интерагују са ћелијама и солубилним факторима у лимфном чвору и тако добијају пролиферативне и антиапопточне сигнале. Показано је да је интеракција CD40:CD40L поред сигнала са BCR-а важна за пролиферацију CLL ћелија. *In vitro* се развија 100 пута јача резистенција на Bcl-2 инхибиторе ако се CLL ћелије култивишу са ћелијама које имитирају њихово природно микроокружење [103,104].

3.6.5. Одређивање ћелијског преживљавања

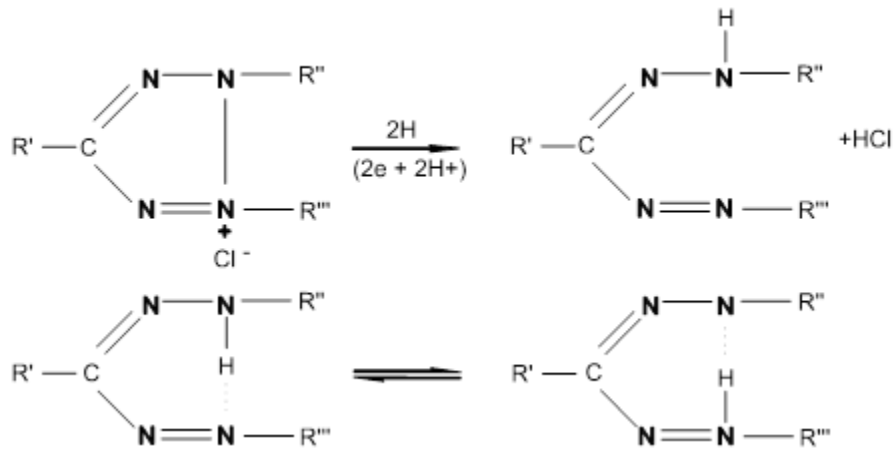
3.6.5.1. MTT тест

MTT тест је метода којом се индиректно одређује вијабилност ћелија [105,106]. MTT (Слика 17), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (Sigma Aldrich, Немачка), је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама се MTT редукује до несолубилних љубичастих кристала формазана (Слика 18). Митохондријална редуктаза (сукцинат

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



Слика 17. Хемијска структура МТТ



Слика 18. Основна структура тетразолијумске соли и њена редукција до обојеног формазана. Име тетразолијум потиче од присуства четири азотова атома у петочланом прстену. R', R'' и R''' су супституенти који замењују гломазну структурну формулу тетразолијумске соли. (Слика 17) Одмах након редукције тетразолијумски прстен се отвара и кватернарни амин се конвертује у терцијарни амин. Један од амина се везује за атом водоника.

Ефекат испитиване супстанце се одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. Формирани формазан се раствара у органским растварачима и интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 570 nm.

Утицај испитиваних комплекса на вијабилност DPSC ћелија је одређиван МТТ тестом. Ћелије у експоненцијалној фази раста су прикупљене из флашка а број је одређен коришћењем *Neubauer*-ове коморе уз искључење мртвих ћелија тј. ћелија обојених трипан плавим. Трипан плаво је боја која може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена [107]. Ћелије су разблажене до густине 3×10^4 ћелија/mL. У микротитар плоче са 96 отвора је сипано 100 μ L (3.000 ћелија) суспензије по отвору. У посебне отворе је сипан медијум без ћелија како би се одредила оптичка густина самог медијума, слепа проба. Плоча се преко ноћи инкубирала на температури од 37 °C и у присуству 5% CO₂. За 24 сата су се ћелије полепиле, па је медијум одливен и замењен са 100 μ L раствора испитиваног комплекса. За сваку концентрацију рађен је трипликат. У контролне отворе је поново сипан чист медијум. Плоча је инкубирана 72 сата под истим условима.

По истеку 72 сата, из свих бунарчића је уклоњена течност и додато је по 100 μ L чистог DMEM-а са 15 % МТТ раствора (5 mg/mL у PBS-у, Pхosphate buffer saline). Плоче су инкубиране још 2 до 4 сата. По истеку инкубације медијум је одливен и у сваки отвор је сипано по 150 μ L диметил сулфооксида (Sigma Aldrich, Немачка) и 20 μ L глицинског пуфера (pH=10,5). Плоче су вортексоване до растварања кристала формазана и оптичка густина узорака је мерена мултифункционалним читачем микротитар плоча, Zenytx 3100. Процент вијабилних ћелија је израчунат на основу формуле: % вијабилних ћелија = $(E-B)/(K-B) \times 100$; E - означава отвор са испитиваним супстанцама; B – слепа проба; K -отвор са нетретираним ћелијама.

3.6.5.2. Кристал виолет – колориметријски тест

Ћелијска одрживост након излагања тестираних једињења мерена је колориметријским тестом – Кристал виолет. CLL ћелије помешане су са медијумом 1×10^5 ћелија/mL, аликвотима (5×10^4 ћелија/100 μ l) и смештени у микротитар плоче са 96 отвора и инкубиране различитим концентрацијама у распону од 250 μ M до 8,4 μ M на 37 °C у 5% CO₂. Након 72 сата ћелије су након одговарајућих третмана испиране PBS-ом како би се одстраниле мртве ћелије. Уследила је фиксација залепљених ћелија метанолом 10 минута на собној температуре, а потом и бојење тако фиксираних ћелија раствором Кристал виолета (0,05%) у трајању од 10 минута на собној температуре. Након тога су бунарчићи интензивно испирани водом, да би се одстранила сва боја коју нису примиле фиксиране ћелије. Оптичка густина је мерена на 595 nm на детектору Zenyth 3100 а цитотоксичност је израчуната користећи исту формулу као и за МТТ тест.

3.6.6. Тест за квантификацију апоптозе (AnnexinV/PI)

Апоптозу карактерише транслокација фосфатидил серина са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. Annexin V-FITC је флуоресцентна проба која се везује за фосфатидил серин, изложен на ћелијској мембрани. Пропидијум јодид, PI се везује за ДНК присутну у ћелији само уколико је интегритет ћелијске мембране нарушен. Сматра се да су Annexin V (-); PI (-) ћелије живе, annexin V (+); PI (-) ћелије су у раним фазама апоптозе и Annexin V (+); PI (+) су у касним фазама апоптозе [108]. У експоненцијалној фази раста су ћелије пресејане на 9 нових фласкова. Када су ћелије прекриле 70% дна флашка, медијум је замењен раствором комплекса у медијуму. Контролне ћелије нису излагане комплексима, медијум је замењен свежим комплетним медијумом. Након 24 сата изложености комплексима

ћелије су прукпљене из фласкова, опране 2 пута у комплетном медијуму и ресуспендоване у пуферу који омогућава везивање Annexin-a V (10X пуфер: 0.1 M HEPES, pH 7,4; 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl₂) до густине 1.000.000 ћелија/mL. У 100 µL такве суспензије додато је по 5 µl Annexin-a V (BD Pharmingen, Сједињене Државе) и 5 µL PI (50 µg/mL PBS-a) (Sigma Aldrich, Немачка). После истека 15 минута инкубације на собној температури и у мраку, додато је по 400 µL 1X пуфера за везивање. Анализирано је 20000 догађаја на FacsCalibur BD проточном цитометру, а подаци су обрађени у Winmdi 2.9 програму.

3.6.7. Анализа ћелијског циклуса

Циљне ћелије (MDA-MB-361 и MDA-MB-453 као и Jurkat и K562 ћелије) су анализирани коришћењем проточног цитометра након бојења пропидијум јодидом, (PI) (Ormerod 1997.) (Becton Dickinson FAC-Scan flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) за мерење ефекта синтетисаних једињења на дистрибуцију ћелијског циклуса.

Ова метода је заснована на особини пропидијум јодида да интеркалира у завојницу ДНК чиме се на основу количини везане боје, која је пропорционална количини ДНК, ћелије разврставају по фазама ћелијског циклуса. Подаци се добијају методом проточне цитофлуориметрије, а дистрибуција ћелија по фазама ћелијског циклуса се читава на хистограму.

Циљне ћелије (3×10^5 ћелија) су гајене у храњивом медијуму у six well plejtu током 24 h инкубације у CO₂ инкубатору. Након тога, адхерентне ћелије су у експоненцијалној фази раста изложене дејству испитиваних једињења у концентрацији IC₅₀, при чему је IC₅₀ одредена коришћењем МТТ теста. Код ћелија које расту у суспензији (K562 ћелије) испитивана једињења су додавана 2 часа након сађења у плејтове са шест отвора. Ћелије су инкубирани у CO₂ инкубатору на 37 °C, у храњивом медијуму са или без испитиваних једињења, 24 h. Након тога, ћелије су посматране под светлосним микроскопом, прикупљене у епрувету и по

потреби трипсинизирани, а затим центрифугиране на 2000 rpm, 10 минута. Талог ћелија је ресуспендован и испран у фосфатном пуферу (PBS)-у.

3.6.8. Припрема узорака за анализу ћелијског циклуса на проточном цитометру

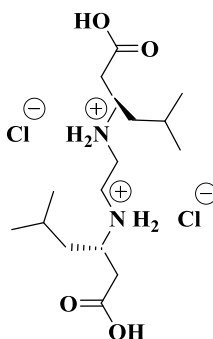
Талог анализираних ћелија, (добијен из предходног испирања) ресуспендован је у 200 μL PBS-а и фиксиран са 2 mL леденог 70 % етанола уз мешање на вортексу. Ћелије се инкубирају у етанолу и на леду минимално 30 минута, а тако припремљени узорци могу се чувати недељу дана пре бојења и анализе на проточном цитометру. Након фиксације, ћелије се још једном испирају у PBS-у, супернатант се одлије, а талог ресуспендује у 800 μL PBS-а. Затим се узорци инкубирају 30 минута на 37 °C у присуству 100 μL раствора RNазе А (концентрације 1 mg/mL). На крају, након третмана RNазом А, у узорак се додаје 100 μL раствора пропидијум јодида (PI) (Becton Dickinson FAC-Scan flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) концентрације 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Обојена суспензија ћелија, предходно промућкана на вортексу, анализира се на проточном цитометру. Анализа ћелијског циклуса и DNK садржаја урађена је на проточном цитометру (Becton Dickinson FAC-Scan flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), а DNK хистограм је анализиран коришћењем CellQuestR софтвера, за минимум 10000 ћелија по узорку.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. СИНТЕЗЕ ЛИГАНАДА

4.1.1. Синтеза (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, (*S,S*)-H₂eddl

(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанска киселина, (*S,S*)-H₂eddl, је добијена у реакцији натријумове соли *S*-леуцина и 1,2-диброметана [90]. Подешавањем рН раствора омогућено је таложење из матичног раствора у облику "zwitter" јона. Добијена (*S,S*)-H₂eddl киселина је прекристалисана из јако киселе средине (рН≈1) уз додатак концентроване хлороводоничне киселине при чему је наведена киселина изолована као дихидрохлорид монохидрат, (*S,S*)-H₂eddl·2HCl·H₂O (Шема 7.).

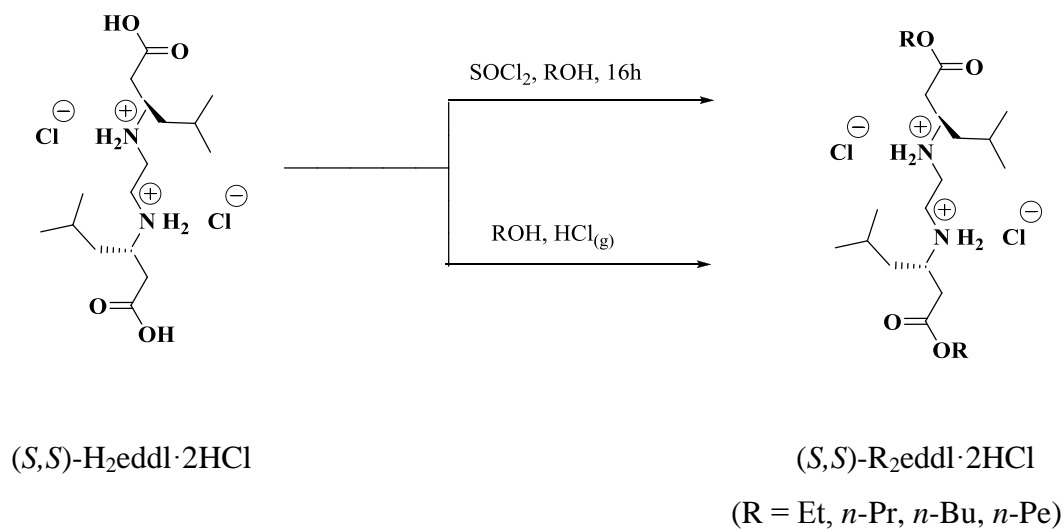


Шема 7. Структура (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине дихидрохлорида, (*S,S*)-H₂eddl·2HCl

4.1.2. Синтезе диалкил $R_2eddl \cdot 2HCl$ естара (S,S)-етилендиамин- N,N' -ди-2-(4-метил)-пентанске киселине

Диалкил естри, (S,S) - $R_2eddl \cdot 2HCl$ ($R = Et, n-Pr, n-Bu, n-Pe$), добијени су реакцијом одговарајућег апсолутног алкохола и тионил-хлорида а потом додавањем (S,S) - H_2eddl дихидрохлорида, (Шема 7) [109].

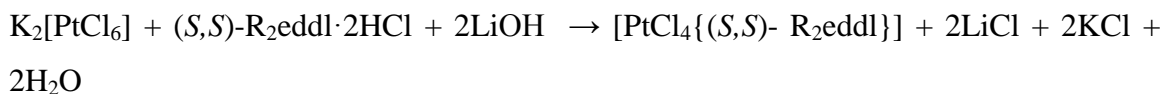
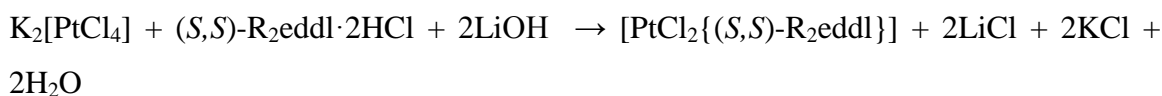
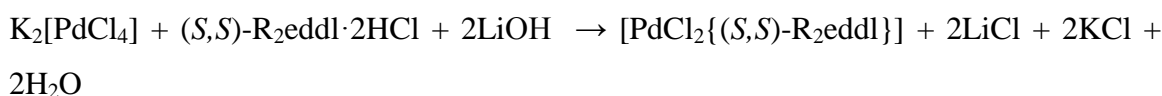
Реакција се такође може изводити и класичном Фишеровом естерификацијом, са апсолутним алкохолом који је засићен гасовитим хлороводоником (Шема 8.).



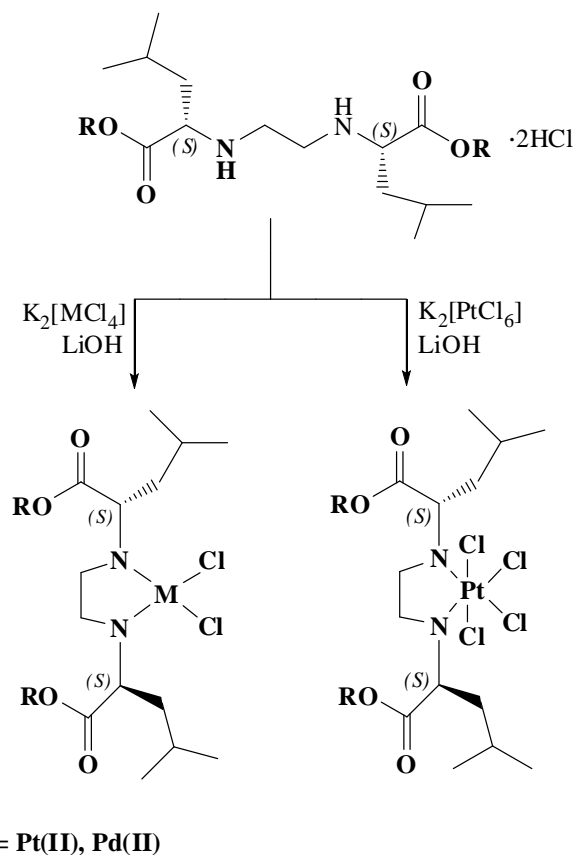
Шема 8. Синтеза O,O' -диалкил естара (S,S) -етилендиамин- N,N' -ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, (S,S) - $R_2eddl \cdot 2HCl$

4.1.3. Синтезе паладијум(II), платина(II) и платина(IV) комплекса

Комплекси паладијума(II), платине(II) и платине(IV) су добијени реакцијом водених раствора калијум-тетрахлоридопаладата(II), калијум-тетрахлоридоплатината(II), калијум-хексахлоридоплатината(IV) и одговарајућих естара у присуству литијум-хидоксида у молском односу 1:1:2, при чему се естри координују бидентатно κ^2N,N' за металне јоне, што је приказано следећим реакцијама (Шема 9.) [109-111]:



(R = Et, *n*-Pr, *n*-Bu, *n*-Pe)



Шема 9. Синтеза паладијум(II), платине(II) и платине(IV) комплекса са одговарајућим естрима (S,S)-R₂edd1·2HCl

4.2. ИНФРАЦРВЕНИ СПЕКТРИ

У Табели 6 дате су најважније траке у инфрацрвеним спектрима изолованог (*S,S*)-H₂eddl лиганда, одговарајућих естара као и одговарајућих паладијум(II), платина(II) и платина(IV) комплекса. У инфрацрвеним спектрима изолованих естара уочене су следеће важне апсорпционе траке: за секундарне амонијум групе $\nu(\text{R}_2\text{NH}_2^+)$, за алкил групе $\nu(\text{CH}_2)$, естарске групе $\nu(\text{C}=\text{O})$ и $\nu(\text{C}-\text{O})$. Приликом координације долази до формирања секундарне амино групе. У Табели 6. дати су положаји тих трака за све изоловане естре и комплексе.

Инфрацрвени спектри естара и комплекса показују одговарајуће траке које су у складу са њиховим претпостављеним структурама. Траке које одговарају секундарним амонијум групама за естре су у спектрима комплекса на таласним бројевима који одговарају секундарним амино групама, што указује на координацију преко атома азота. Траке које потичу од асиметричних валенционих вибрација карбонилне групе налазе се на приближно истим вредностима за естре и одговарајуће комплексе (1700-1750 cm^{-1}), што потврђује претпоставку да није дошло до координације преко атома кисеоника. Међутим, различити положаји трака у инфрацрвеним спектрима (Табела 6) која потичу од -NH група сугеришу на депротоновање -NH₂⁺ група у естрима R₂eddl-типа као и њихово кординовање преко азотових атома ових естара за јоне метала.

Табела 6. Важније траке у инфрацрвеним спектрима синтетисаних лиганада и комплекса

Лиганд	$\nu(\text{NH}_2^+)$	$\nu(\text{CH}_2)$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C-O})$
(<i>S,S</i>)-H ₂ eddl·2HCl	3451	2957	1579	1396
(<i>S,S</i>)-Et ₂ eddl·2HCl	3457	2975	1737	1216
(<i>S,S</i>)-Pr ₂ eddl·2HCl	3453	2966	1745	1210
(<i>S,S</i>)-Bu ₂ eddl·2HCl	3455	2963	1736	1209
(<i>S,S</i>)-Pe ₂ eddl·2HCl	3452	2960	1736	1211
Комплекс	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CH}_2)$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C-O})$
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)-Et ₂ eddl}]	3132	2961	1731	1247
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)-Pr ₂ eddl}]	3133	2962	1734	1254
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)-Bu ₂ eddl}]	3129	2960	1731	1250
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)-Pe ₂ eddl}]	3231	2959	1739	1228
[PtCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Et ₂ eddl}]	3138	2959	1731	1247
[PtCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Pr ₂ eddl}]	3144	2961	1737	1238
[PtCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Bu ₂ eddl}]	3139	2960	1736	1244
[PtCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Pe ₂ eddl}]	3131	2959	1735	1244
[PdCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Et ₂ eddl}]	3088	2960	1739	1239
[PdCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Pr ₂ eddl}]	3143	2961	1739	1241
[PdCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Bu ₂ eddl}]	3133	2960	1740	1241
[PdCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Pe ₂ eddl}]	3139	2959	1741	1229

4.3. ¹H И ¹³C NMR СПЕКТРИ

У Табели 7 дате су вредности хемијских померања (δ у ppm) за поједине групе у ¹H NMR (у односу на тетраметилсилан као стандард) и ¹³C NMR спектрима за (*S,S*)-H₂eddl и одговарајућих (*S,S*)-R₂eddl естре (**L1–L4**), (нумерација атома је дата на Слици 16). У ¹H NMR спектрима лиганада прекурсора сигнали протона свих метил група налазе се у опсегу од 0,8 до 1,3 ppm. Водоникови атоми етилендиаминског дела молекула показују хемијска померања на око 3,5 ppm, док

се сигнали за CH и CH₂ групе леуцинског дела молекула налазе на око 1,8 ppm. У ¹H NMR спектрима естара сигнали за водоникове атоме секундарних амонијум група нађени су у опсегу 9,5–10,5 ppm.

У ¹³C NMR спектрима ових естара запажа се да је број сигнала је двоструко мањи од укупног броја угљеникових атома из чега се закључује да је молекул симетричан. Померање које се налази на око 170 ppm јасно указује на присуство угљениковог атома у оквиру естарске –COOR групе.

Табела 7. Хемијска померања (*S,S*)-H₂eddl и одговарајућих (*S,S*)-R₂eddl естара (L1–L4) у ¹H и ¹³C NMR спектрима, (нумерација атома је дата на Слици 16)

	<i>(S,S)</i> -H ₂ eddl		L1		L2		L3		L4	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
-C ¹² H ₃									0,91(t)	10,8
-C ¹¹ H ₂							0,91(t)	15,8	1,36(m)	14,5
-C ⁶ H ₃	0,94(d)	23,7	0,96(d)	23,7	0,95(d)	25,6	0,95(d)	23,7	0,99(d)	18,4
-C ⁷ H ₃	0,96(d)	23,7	0,96(d)	24,9	0,95(d)	28,4	0,95(d)	25,0	0,99(d)	19,2
-C ⁵ H	1,72(m)	24,9	1,95(m)	27,1	1,97(m)	28,7	1,94(m)	32,7	1,96(m)	25
-C ¹⁰ H ₂					0,93(t)	14,0	1,38(m)	21,5	1,36(m)	19,6
-C ⁹ H ₂			1,31(t)	16,1	1,76(m)	25,1	1,69(m)	27,2	1,74(m)	21,9
-C ⁴ H ₂	1,65(m)	27,0	1,65(m)	41,2	1,60(m)	42,6	1,60(m)	41,3	1,65(m)	35,9
-C ¹ H ₂	3,18(s)	42,7	3,49(s)	45,3	3,51(s)	46,6	3,47(s)	45,4	3,53(s)	40,0
-C ² H	3,75(t)	56,3	4,17(m)	62,2	4,15(m)	63,7	4,15(m)	62,2	4,22(m)	57,0
-C ⁸ H ₂			4,33(q)	66,8	4,25(t)	73,6	4,30(t)	70,4	4,32(t)	65,5
-COO ⁻		178,4		173,0		174,3		173,3		167,9

У ^1H NMR спектрима комплекса паладијума(II) сигнали за водоникове атоме секундарних амонијум група нађени су у опсегу 5.8–6.6 ppm (у поређењу са **L1**·2HCl–**L4**·2HCl: 9.5 - 10.5 ppm). Сигнали CH_2 протона од етилендиаминског дела молекула померени су ка вишем магнетном пољу у односу на лиганде прекурсоре (од 0,1–0,9 ppm), што указује на координацију азотових атома за централни метални атом. Сигнали протона пореклом из свих метил група налазе се у опсегу од 0,86 - 1,13 ppm за сва једињења. Међутим, присуство два сета сигнала за протоне у спектрима комплекса паладијума(II) указује на постојање два диастереоизомера (Табела 8.).

У ^{13}C NMR спектрима комплекса сигнали за угљеникове атоме у оквиру естарске групе налазе се на приближно истим положајима као и у спектрима лиганата прекурсора око 170 ppm, што потврђује да није дошло до координације кисеоникових атома за централни метални јон. Такође, присуство два сета сигнала у спектрима паладијум(II) комплекса (у приближно једнаком односу) указује на формирање диастереоизомера.

Табела 8. Хемијска померања паладијум(II) комплекса у ^1H и ^{13}C NMR спектрима, (нумерација атома је дата на Слици 16)

	[PdCl ₂ L1]		[PdCl ₂ L2]		[PdCl ₂ L3]		[PdCl ₂ L4]	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
-C ¹² H ₃							0,91(t)	13,8
-C ¹¹ H ₂					1,08(t)	13,6 13,7	1,33(m)	22,7
-C ⁶ H ₃	0,92(d)	21,7	0,92(d)	21,6	0,93(d)	19,1	1,03(d)	22,1
-C ⁷ H ₃	0,94(d)	22,7	0,92(d)	21,9	0,93(d)	19,1	1,03(d)	22,1
-C ⁵ H	2,10(m)	24,6	2,05(m)	24,7 26,0	2,05(m)	24,6 25,9	2,15(m)	28,0
-C ¹⁰ H ₂			1,07(t) 1,25	10,4	1,40(m)	21,6 22,6	1,33(m)	24,9
-C ⁹ H ₂	1,28(t) 1,39	14,1 14,2	1,70(m)	22,7 23,7	1,70(m)	25,9 30,5	1,66(m)	27,9
-C ⁴ H ₂	1,60(m)	37,7 38,9	1,65(m)	37,8 38,9	1,65(m)	37,7 38,9	1,60(m)	40,9
-C ¹ H ₂	2,52(m) 2,80	48,9 49,3	2,54(m) 2,82	48,9 49,4	2,55(m) 2,81	48,9 49,1	3,20(m) 3,64	42,8
-C ² H	3,48(q) 3,73	59,6	3,48(q) 3,72	59,6 60,3	3,20(m)	59,5 60,3	3,84(m)	55,4
-C ⁸ H ₂	4,19(m) 4,33	60,4 61,6	4,08(m) 4,25	67,1 67,2	4,12(t) 4,28	65,3 65,5	4,19 4,23(t)	66,0
-COO ⁻		169,6 171,6		169,8 171,5		169,8 171,5		164,9 172,3

У Табели 9 и Табели 10 дата су хемијска померања у ^1H и ^{13}C NMR спектрима за комплексе платине(II) и платине(IV) са наведеним естрима (L1–L4). Нађено је да сваки атом има другачије померање, што је последица настанка једног

изомера У ^1H NMR спектрима комплекса платине(II) сигнали за водоникове атоме који припадају азотовим атомима нађени су у опсегу 5.2–6.8 ppm. У ^1H NMR спектрима комплекса платине(IV) сигнали за водоникове атоме који припадају азотовим атомима нађени су у опсегу 6.1–6.9 ppm. Сигнали за метиленске протоне етилендиаминског дела молекула такође су померени ка вишем магнетном пољу у односу на лиганде прекурсоре (по 0,1–0,9 ppm), што указује на координацију азотових атома за централни метални атом. Сигнали протона свих метил група налазе се у опсегу од 0,86 - 1,13 ppm за сва једињења.

У ^{13}C NMR спектрима комплекса сигнали за угљеникове атоме из естарских група налазе се на приближно истим положајима као и у спектрима лиганда око 170 ppm, што указује на то да није дошло до координације кисеоникових атома за централни метални јон.

Табела 9. Хемијска померања платина(II) комплекса у ^1H и ^{13}C NMR спектрима, (нумерација атома је дата на Слици 16)

	[PtCl ₂ L1]		[PtCl ₂ L2]		[PtCl ₂ L3]		[PtCl ₂ L4]	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
-C ¹² H ₃							0,91(t)	13,9
-C ¹¹ H ₂					0,98(t)	13,5	1,33(m)	22,2
-C ⁶ H ₃	0,97(d)	22,3	0,93(d)	21,9	0,90(d)	18,9	1,00(d)	21,7
-C ⁷ H ₃	0,97(d)	22,3	0,93(d)	21,9	0,90(d)	18,9	1,00(d)	21,7
-C ⁵ H	2,05(m)	25,7	2,10(m)	25,8	2,04(m)	23,1	1,95(m)	25,9
-C ¹⁰ H ₂			1,03(t)	10,4	1,34(m)	21,5	1,33(m)	23,7
-C ⁹ H ₂	1,29(t)	13,9	1,71(m)	23,7	1,66(m)	24,9	1,75(m)	25,1
-C ⁴ H ₂	1,70(m)	30,3	1,65(m)	29,6	1,57(m)	30,2	1,63(m)	28,1
-C ¹ H ₂	2,38(m)	51,7	2,41(m)	51,3	3,05(m)	38,9	3,08(m)	51,3
-C ² H	3,01(q)	61,6	3,48(q)	60,3	4,13(m)	60,8	4,12(m)	61,0
-C ⁸ H ₂	4,29(m)	68,2	4,15(m)	67,2	4,24(t)	66,5	4,23(t)	65,8
-COO ⁻		171,5		171,5		168,9		171,5

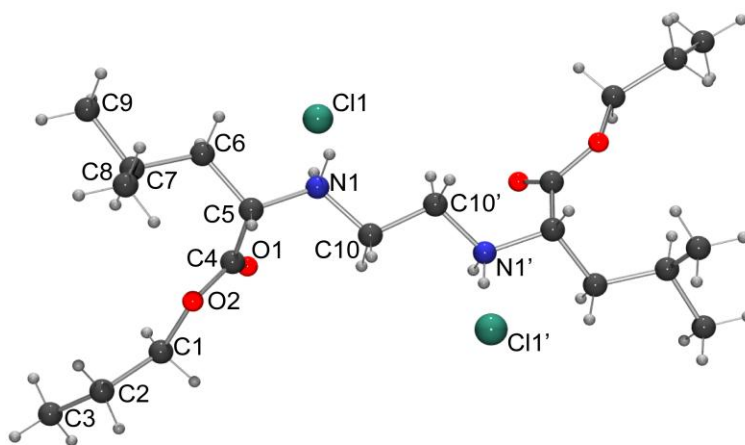
Табела 10. Хемијска померања платина(IV) комплекса у ^1H и ^{13}C NMR спектрима, (нумерација атома је дата на Слици 16)

	[PtCl ₄ L1]		[PtCl ₄ L2]		[PtCl ₄ L3]		[PtCl ₄ L4]	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
-C ¹² H ₃							0,91(t)	13,9
-C ¹¹ H ₂					0,98(t)	13,5	1,33(m)	22,2
-C ⁶ H ₃	0,97(d)	21,4	0,95(d)	21,6	0,91(d)	18,9	1,00(d)	22,1
-C ⁷ H ₃	0,97(d)	21,4	0,95(d)	21,6	0,91(d)	18,9	1,00(d)	22,1
-C ⁵ H	2,05(m)	23,6	2,10(m)	24,9	2,04(m)	23,1	1,95(m)	27,8
-C ¹⁰ H ₂			1,01(t)	10,4	1,38(m)	21,4	1,33(m)	22,3
-C ⁹ H ₂	1,29(t)	13,8	1,71(m)	23,2	1,67(m)	24,9	1,68(m)	24,6
-C ⁴ H ₂	1,70(m)	38,9	1,65(m)	25,9	1,58(m)	30,1	1,63(m)	28,0
-C ¹ H ₂	2,97(m)	50,4	3,02(m)	38,7	3,05(m)	39,1	2,77(m)	39,5
-C ² H	3,46(q)	62,2	3,46(q)	59,9	4,24(m)	62,3	4,16(m)	52,3
-C ⁸ H ₂	4,29(m)	63,1	4,22(m)	68,9	4,54(t)	66,8	4,20(t)	66,9
-COO ⁻		171,9		168,8		172,1		170,0

4.4. КРИСТАЛНА СТРУКТУРА

O,O'-ДИПРОПИЛ-(*S,S*)-ЕТИЛЕНДИАМИН-*N,N'*-ДИ-2-(4-МЕТИЛ)-ПЕНТАНОАТ ДИХИДРОХЛОРИДА, (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl

Рендгенском структурном анализом потврђена је структура *O,O'*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентаноат дихидрохлорида (Слика 19) [112]. (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl кристалише у тетрагоналном кристалном систему, са просторном групом *P4*₂. Оса другог реда која пролази кроз центар C10–C10^{*i*}, (*i* = $-x + 1, -y, z$), полови молекула на две идентичне јединице. Позитивно наелектрисање молекула естра је неутралисано хлоридним анјонима. Изабране дужине веза (Å) и углови веза (°) дати су у Табели 11. Према вредностима торзионих углова C7–C6–C5–N1, C6–C5–N1–C10, C5–N1–C10–C10^{*i*} и N1–C10–C10^{*i*}–N1^{*i*}, (*i* = $-x + 1, -y, z$), који су у распону од $-167,2(9)$ до $-178,8(8)^\circ$ конформација алифатичних ланаца је описана као потпуно издужена. Атоми C5/C6/C7/N1/C10 фрагмената су ко-планарни са $0,037(6)$ Å.



Слика 19. Структура молекула (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl

Табела 11. Одабрани геометријски параметри (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl

Дужине веза (Å)		Углови веза (°)	
C4–O1	1,479(18)	C5–C6–C7	113,5(6)
C4–O2	1,324(10)	C4–C5–N1	107,0(6)
C5–N1	1,491(8)	C5–N1–C10	115,8(5)
C5–C6	1,541(9)	O1–C4–O2	125,7(9)
C6–C7	1,531(9)	C5–C4–O1	127,4(8)

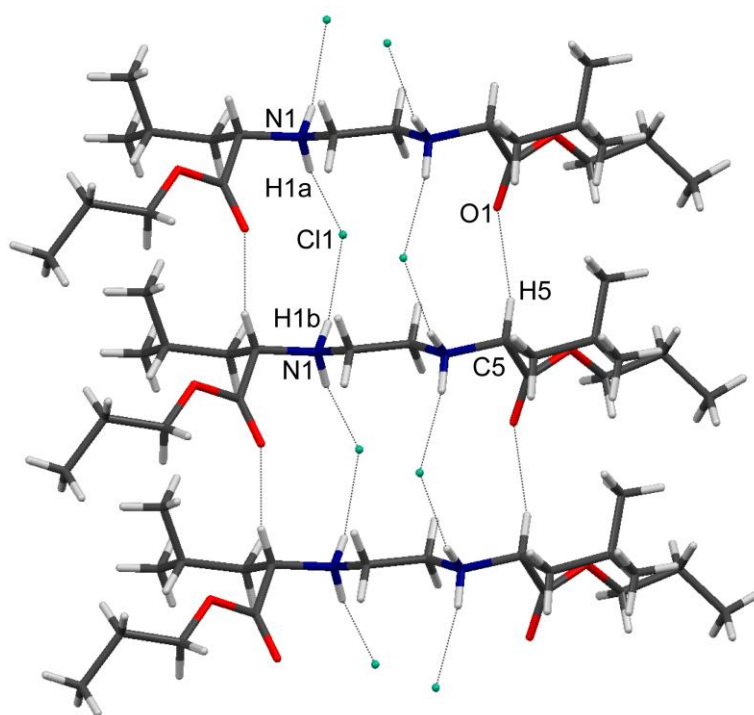
Молекулска конформација је стабилизована двома прилично slabим интрамолекулским водоничним везама насталих између N–H из диаминa и C–H из изопропил група и кисеоника из естарске групе (Табела 12). У паковању кристала доминирају водоничне везе настале између поменутих компоненти, азота протоноване амино групе и Cl⁻ анјона. Обе N–H амино групе учествују у водоничном везивању. Ове две веома јаке N–H...Cl интеракције (Табела 11) повезују молекул. Поред N–H...Cl водоничних веза, молекули су међусобно повезани C5–H...O1 интеракцијама (Слика 20(a)). Иако се C5–H...O1 сматрају секундарним интеракцијама, ипак показују повољна усмерења (Табела 12).

На слици 20(б) приказано је формирање тродимензионалне порозне структуре, са паралелним каналима проширеним у *c* смеру.

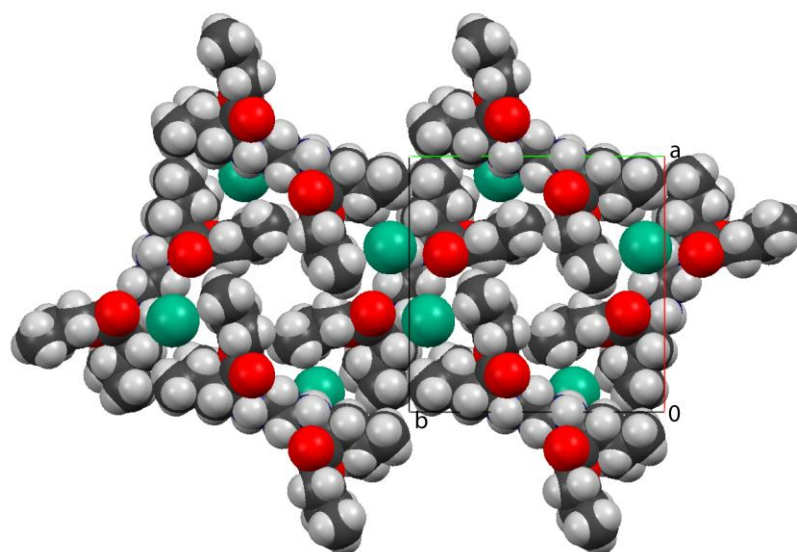
Табела 12. Геометрија водоничних веза (Å, °).

	D–H	D...A	H...A	D–H...A
C7–H7...O2 ⁱ	0,98	3,111(11)	2,57	114
C10–H10a...O1 ⁱ	0,97	3,119(10)	2,58	115
N1–H1a...Cl1 ⁱ	0,90	3,133(8)	2,25	166
N1–H1b...Cl1 ⁱⁱ	0,90	3,106(8)	2,25	158
C5–H5...O1 ⁱⁱ	0,98	3,303(10)	2,35	164

$$i = -x + 1, -y, z$$



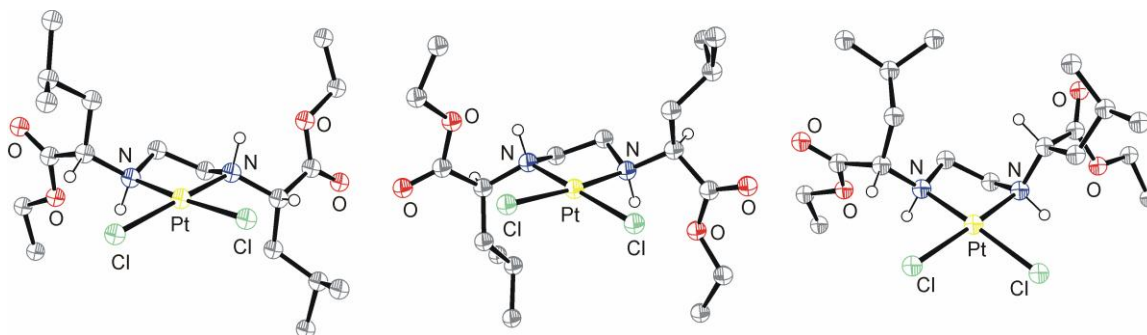
(a)



(б)

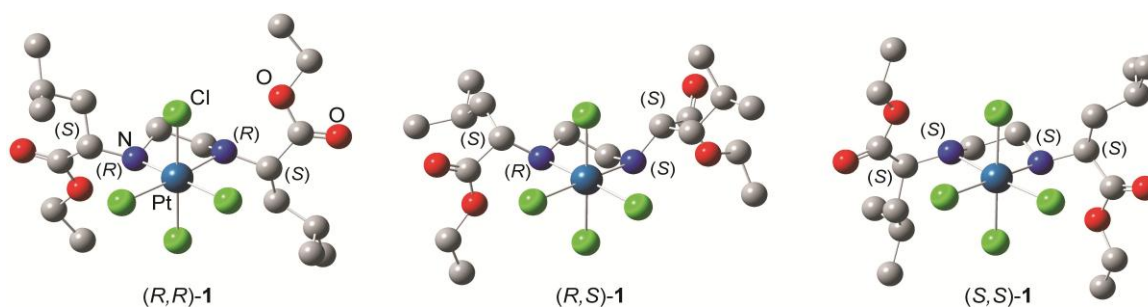
Слика 20. (а) Интермолекулске N–H...Cl и C–H...O водоничне везе. (б) Део тродимензионалне порозне кристалне структуре молекула

спектроскопије) показују присуство само једног изомера и DFT прорачуни указују да је (*R,R*) конфигурација N атома може бити додељена овом изомеру.



Слика 22. Израчунате структуре: (*R,R*); (*S,S*); (*R,S*) (с лева на десно) комплекса $[PtCl_2L1]$.

Оптимизоване структуре комплекса платине(IV) приказане су на Слици 23. У случају комплекса платине(IV) пронађено је да је (*R,R*)-*N,N'*-конфигурациони изомер најстабилнији (Табела 13) у односу на (*R,S*) и (*S,S*) изомере са 2,9–3,2 и 8,0–8,2 kcal/mol. Резултати су такође у сагласности са резултатима из NMR спектроскопије.



Слика 23. Равнотежна структура дијастереизомера комплекса $[PtCl_4L1]$.

Табела 13. Релативне енергије комплекса платине(IV) у kcal/mol

Комплекси	(R,R)	(R,S)	(S,S)
[PtCl ₄ L1]	0,00	3,21	8,14
[PtCl ₄ L2]	0,00	3,18	8,15
[PtCl ₄ L3]	0,00	2,91	8,03
[PtCl ₄ L4]	0,00	3,02	8,18

4.6. IN VITRO АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ

4.6.1. Резултати *in vitro* цитотоксичне активности према ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (CLL)

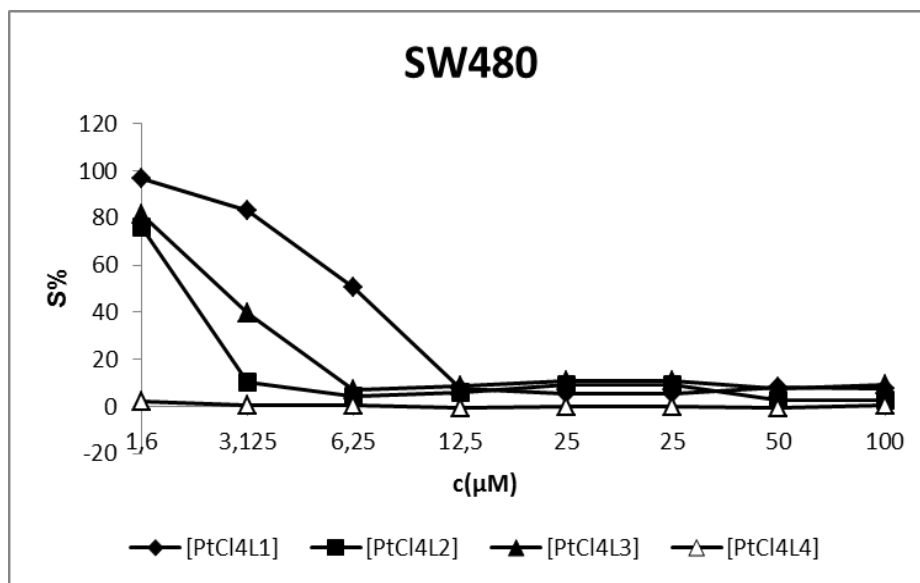
Цитотоксична активност свих синтетизованих једињења одређена је на ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (CLL). Естри и њихови одговарајући комплекси паладијума(II), платине(II) и платине(IV) показују умерену цитотоксичну активност према циљним CLL ћелијама (Табела 14). Што се тиче лиганада прекурсора, чини се да је повећање липофилности естарске групе (Et < *n*-Pr < *n*-Bu < *n*-Pe) резултирало вишом цитотоксичношћу (IC₅₀ од 114 - 29. μM). Комплекси паладијума(II) са Et и *n*-Bu групама у естарским ланцима показују 2,8 – 4,8 пута нижу активност него комплекси са *n*-Pr или *n*-Pe групама. Већина активних једињења су L4·2HCl (IC₅₀ = 29 ± 2 μM) и [PdCl₂L2] (IC₅₀ = 19 ± 6 μM). Резултати указују да сва испитивана једињења имају знатно јачу цитотоксичну активност у поређењу са активношћу цисплатине (IC₅₀ = 263,7 μM).

Заменом паладијум(II)-јона платина(II)-јоном примећена је већа цитотоксична активност. IC₅₀ вредности за комплексе платине(II) су 2-17 пута већи него IC₅₀ вредности одговарајућих комплекса паладијума(II). Од испитиваних комплекса платине(II) најмања активност је забележена код комплексу са најкраћим естарским ланцем. Заменом Et са *n*-Pr или *n*-Bu групом у естарском ланцу код комплекса платине(II) повећава се цитотоксична активност. Једињење [PtCl₂L4] које има *n*-Pe групу у естарском ланцу показује сличну активност као [PtCl₂L2] и [PtCl₂L3]. Активност комплекса платине(II) према CLL ћелијама била је значајно виша у односу на цисплатину. Ниска активност цисплатине према CLL ћелијама је у сагласности са ранијим истраживањима [113-117]. Однос структура-активност се може запазити и у сагласности је са претходним студијама [87]: *in vitro* активност се повећава у следећем редоследу Ln₂HCl < [PdCl₂Ln] < [PtCl₂Ln]. Наши прелиминарни подаци о CCL ћелијама изолованих из периферне крви три пацијента, показују да комплекси платине(IV) не изазивају значајан цитотоксични ефекат. Такође, показано је да одговарајући паладијум(II) комплекси показују знатно већу цитотоксичну активност према испитиваним CCL ћелијама (32,1±7,8 – 92,1±11,7) од активности комплекса платине(IV).

4.6.2. Резултати *in vitro* цитотоксичне активности према циљним малигним ћелијама (SW480, MDA-MB-361, MDA-MB-453, Jurkat и K562)

Цитотоксична активност свих синтетизованих једињења естара, њихових одговарајућих комплекса паладијума(II), платине(II) и платине(IV) одређена је и на ћелијској линији хуманог колоректалног карцинома SW480. Резултати ових експеримената приказани су у Табели 14 као IC₅₀ вредности (концентрација једињења која доводи до смањења преживљавања малигних ћелија за 50%) одређене МТТ тестом при континуираном дејству једињења након 72 h инкубације.

Испитивана једињења показују дозно зависан цитотоксични ефекат према SW480 ћелијама [118]. При вишим концентрацијама (у опсегу од 500 μM до 62,5 μM) лиганди прекурсори показују значајно већу цитотоксичност према SW480 ћелијама. Такође, IC_{50} вредности указују на то да су лиганди **L3** и **L4** два односно четири пута активнији од лиганда **L1** и **L2**. Од комплекса паладијум(II) једињење $[\text{PdCl}_2\text{L4}]$ које има *n*-Pe групу у естрском ланцу показује сличну активност као $[\text{PdCl}_2\text{L2}]$. Најактивније једињење комплекса платине(II) је $[\text{PtCl}_2\text{L3}]$ са *n*-Bu групом у естарском ланцу. Обзиром да је активност комплекса платине(IV) према SW480 ћелијама била значајно виша у односу на активност цисплатине на Слици 24. (а) представљени су репрезентативни графици преживљавања SW480 ћелија након 72 h дејства испитиваних комплекса платине(IV).

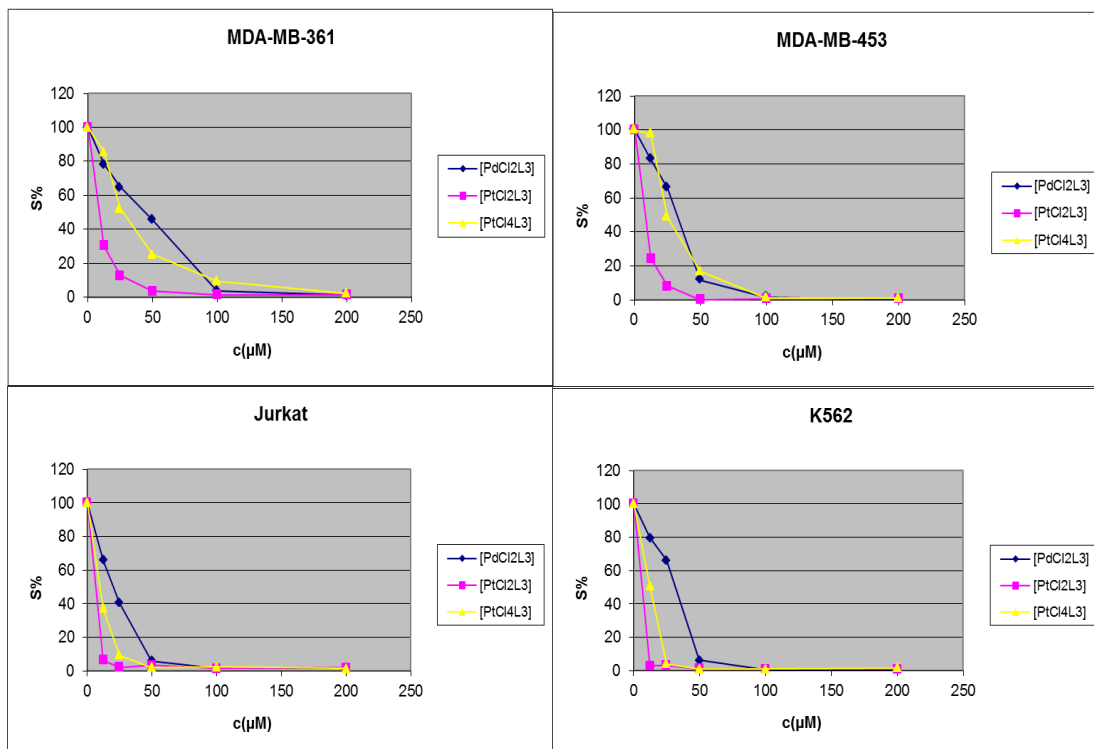


Слика 24(а). Репрезентативни графици преживљавања SW480 ћелија након 72 h дејства испитиваних комплекса платине(IV).

Табела 14. IC₅₀ (μМ) за 72 h деловања испитиваних једињења: лиганата прекурсора, паладијум(II), платина(II) и платина(IV) комплекса на CLL ћелијама и ћелијској линији SW480, одређених МТТ тестом

Једињења	CLL ћелије	SW480
L1·2HCl	114,6 ± 27,34	120,37 ± 5,38
L2·2HCl	81,93 ± 15,48	107,97 ± 0,80
L3·2HCl	70,19 ± 19,58	42,66 ± 9,77
L4·2HCl	29,11 ± 2,09	25,83 ± 4,57
[PdCl₂L1]	88,12 ± 25,69	121,16 ± 35,75
[PdCl₂L2]	19,34 ± 6,54	4,69 ± 2,32
[PdCl₂L3]	92,14 ± 11,68	80,33 ± 16,32
[PdCl₂L4]	31,18 ± 7,76	6,57 ± 4,29
[PtCl₂L1]	22,35 ± 5,62	20,70 ± 3,47
[PtCl₂L2]	9,85 ± 1,55	23,11 ± 9,16
[PtCl₂L3]	5,39 ± 1,12	4,02 ± 1,53
[PtCl₂L4]	10,37 ± 4,78	21,59 ± 2,74
[PtCl₄L1]	>100	5,09 ± 4,44
[PtCl₄L2]	96,56±10,59	2,32 ± 0,18
[PtCl₄L3]	63,70±8,88	3,95 ± 0,76
[PtCl₄L4]	>100	0,74 ± 0,20
цисплатина	263,75 ± 33,36	31,92 ± 13,86

Сва синтетисана једињења такође су испитана на цитотоксичну активност према ћелијама хуманог карцинома дојке MDA-MB-361 и MDA-MB-453, ћелије хумане Т леукемије Јуркат и ћелије хумане мијелоидне леукемије K562 са цисплатином као референтним цитостатиком. IC₅₀ вредности испитиваних комплекса приказани су у Табели 15. На слици 24(б) представљени су репрезентативни графици преживљавања наведених малигних ћелија након 72 h дејства испитиваних најактивнијих једињења.



Слика 24(б). Репрезентативни графици преживљавања малигнух ћелија након 72 h дејства испитиваних најактивнијих једињења.

Резултати су показали да комплекси платине(IV) имају значајну цитотоксичну активност, IC_{50} вредности у опсегу од 0,74 до 70 μM , према свим тестираним ћелијским линијама. Посебно, комплекси $[\text{PtCl}_4\text{L}_2]$, $[\text{PtCl}_4\text{L}_3]$ и $[\text{PtCl}_4\text{L}_4]$ показују јаку цитотоксичност у инхибицији Јуркат и K562 ћелијских линија која је веома слична оној коју показује цисплатина. Примећена је нешто мања, али веома значајна активност једињења према адхерентним ћелијама солидних тумора (MDA-MB-361 [119] и MDA-MB-453). Од испитиваних комплекса најмања активност је забележена код комплексу са најкраћим естарским ланцем. Заменом Et са *n*-Pr или *n*-Bu групом у естарском ланцу код комплекса повећава се цитотоксична активност, тако да комплекси са *n*-Bu групом у естарском ланцу показују највишу цитотоксичну активност.

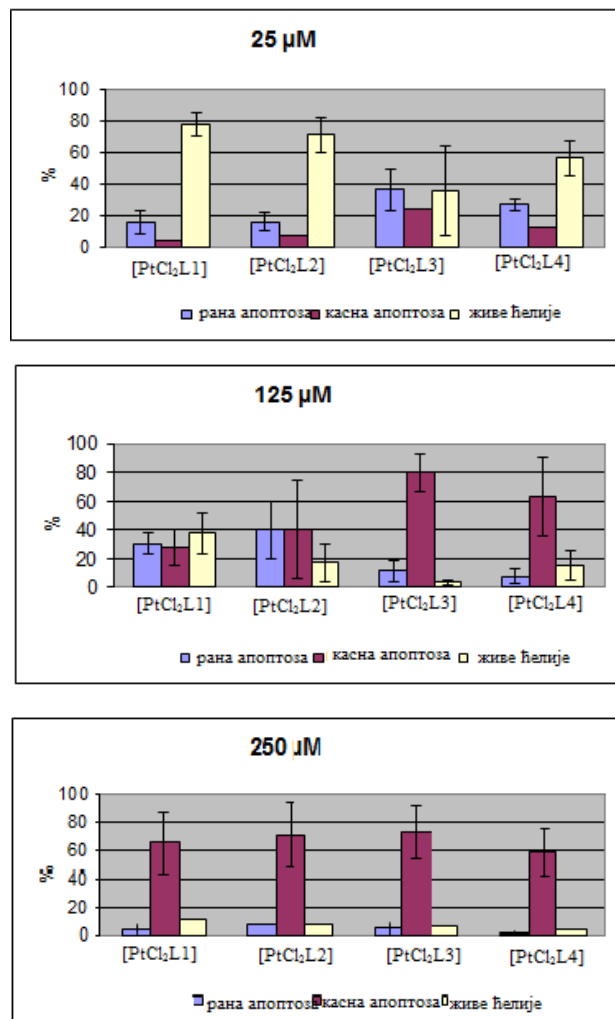
Табела 15. IC₅₀ (μМ) за 72 h деловања испитиваних једињења: лиганата прекурсора, паладијум(II), платина(II) и платина(IV) комплекса на MDA-MB-453, MDA-MB-361, K562 и Jurkat ћелијским линијама, одређених МТТ тестом

Једињења	MDA-MB-453	MDA-MB-361	K562	Jurkat
L1·2HCl	>200	>200	>200	157,31±3,41
L2·2HCl	86,18±2,18	78,12±2,61	103,72±1,23	66,17±1,34
L3·2HCl	28,015±0,04	40,64±2,01	31,62±3,26	24,56±0,95
L4·2HCl	180,44±1,67	180,37±1,58	191,98±1,74	156,63±1,55
[PdCl ₂ L1]	>200	>200	>200	135,71±0,82
[PdCl ₂ L2]	93,04±3,76	86,44±2,41	102,91±2,38	65,54±0,76
[PdCl ₂ L3]	35,31±2,99	48,67±3,57	31,75±1,85	20,32±1,58
[PdCl ₂ L4]	48,43±0,27	56,77±3,86	38,66±0,36	27,66±2,88
[PtCl ₂ L1]	96,42±1,62	147,55±0,12	118,73±0,84	45,83±3,21
[PtCl ₂ L2]	37,87±0,24	46,62±3,49	27,05±0,24	18,03±1,05
[PtCl ₂ L3]	7,64±0,63	8,31±0,68	6,42±1,93	6,67±0,94
[PtCl ₂ L4]	195,31±0,56	181,41±0,58	121,37±2,46	46,12±1,22
[PtCl ₄ L1]	44,98±1,19	70,06±1,19	22,53±3,41	25,51±2,19
[PtCl ₄ L2]	16,42±0,58	29,14±0,51	8,51±1,67	9,61±0,87
[PtCl ₄ L3]	23,19±1,48	25,95±1,26	12,68±1,39	9,93±0,42
[PtCl ₄ L4]	22,75±3,81	24,03±0,21	13,15±0,58	11,41±0,68
цисплатина	3,75±0,12	14,74±0,36	8,52±0,09	7,79±0,83

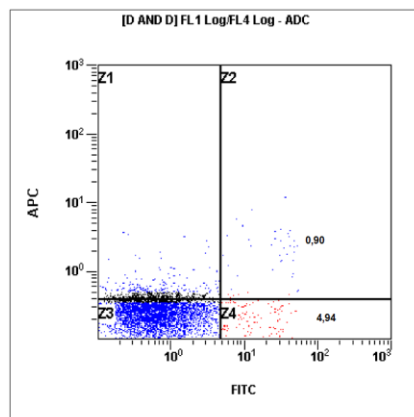
4.6.3. Резултати теста за квантификацију апоптозе (Annexin V/PI)

Нађено је да су комплекси платине(II) најефикаснији према CLL ћелијама, стога су даље коришћени у експериментима одређивањем типа ћелијске смрти. Тип ћелијске смрти је одређен анализирањем третираних ћелија обојених Анексином В и 7-ААД проточном цитометријом. Резултати су показали да сви комплекси платине(II) индукују апоптозу у ћелијама CLL (слика 25(a) и 25(b)). CLL ћелије третиране су 24 h са концентрацијом комплекса платина(II) од 25, 125 и 250 μМ. Дозна зависност цитотоксичног ефекта комплекса платине(II) према CLL ћелијама је такође потврђена овим тестом. При концентрацији од 25 μМ комплекси [PtCl₂L1] и [PtCl₂L2] показују смањено дејство на ћелије и већи број ћелија не подлеже апоптози ([PtCl₂L1]: 78%; [PtCl₂L2]: 71%) (слика 25(a)). С друге стране, комплекси

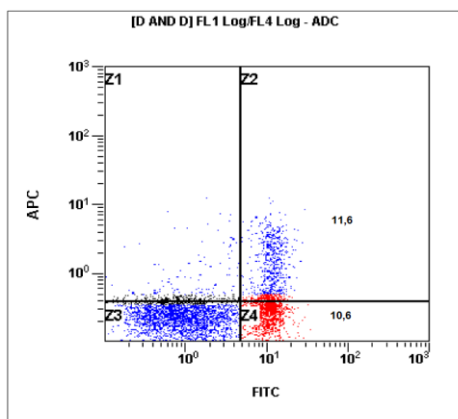
[PtCl₂L3] и [PtCl₂L4] са истом концентрацијом имају већи утицај на преживљавање CLL ћелија и индукују већи проценат апоптотских ћелија. Већа концентрација (125 μM) комплекса [PtCl₂L1] и [PtCl₂L2] је изазвала апоптозу већег процента CLL ћелија са приближно истим процентом ћелија у раној и касној апоптози ([PtCl₂L1]: 29, ~ [PtCl₂L2]: 40) (слика 25(б)). Сва четири комплекса при концентрацији од 250 μM су високо токсични за ћелије. Концентрација од 250 μM на комплексе платине(II) изазива високи проценат некротичних ћелија (Анексин В (-); 7-ААД (+)), са потпуним губитком плазме мембране.



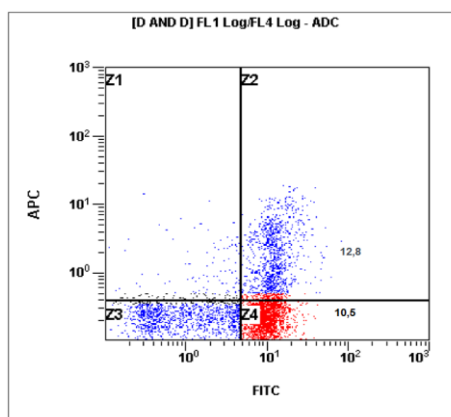
Слика 25(а). Процент ране апоптозе, касне апоптозе и живих ћелија након 24 h третмана CLL ћелија комплексима платине(II)



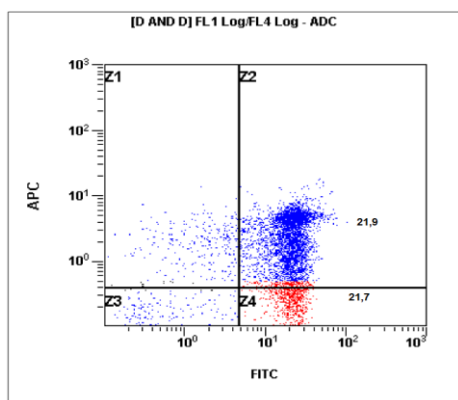
контрола



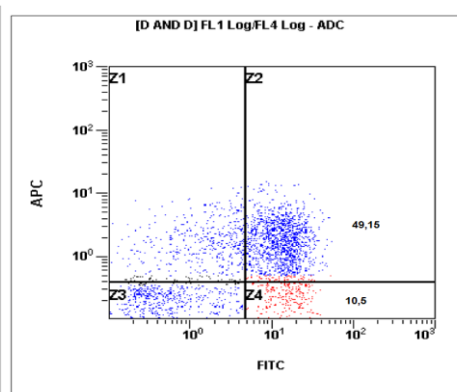
[PtCl₂L1]



[PtCl₂L2]



[PtCl₂L3]



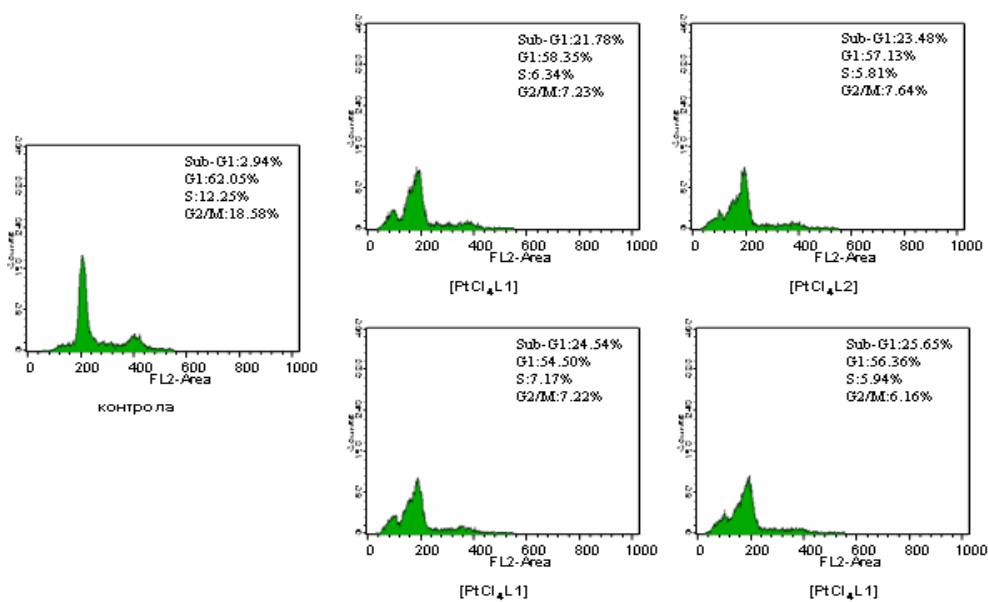
[PtCl₂L4]

Слика 25(б). Контролне ћелије и ћелије третиране са 125 μ M комплекса платине(II) обојене анексин В и 7-ААД.

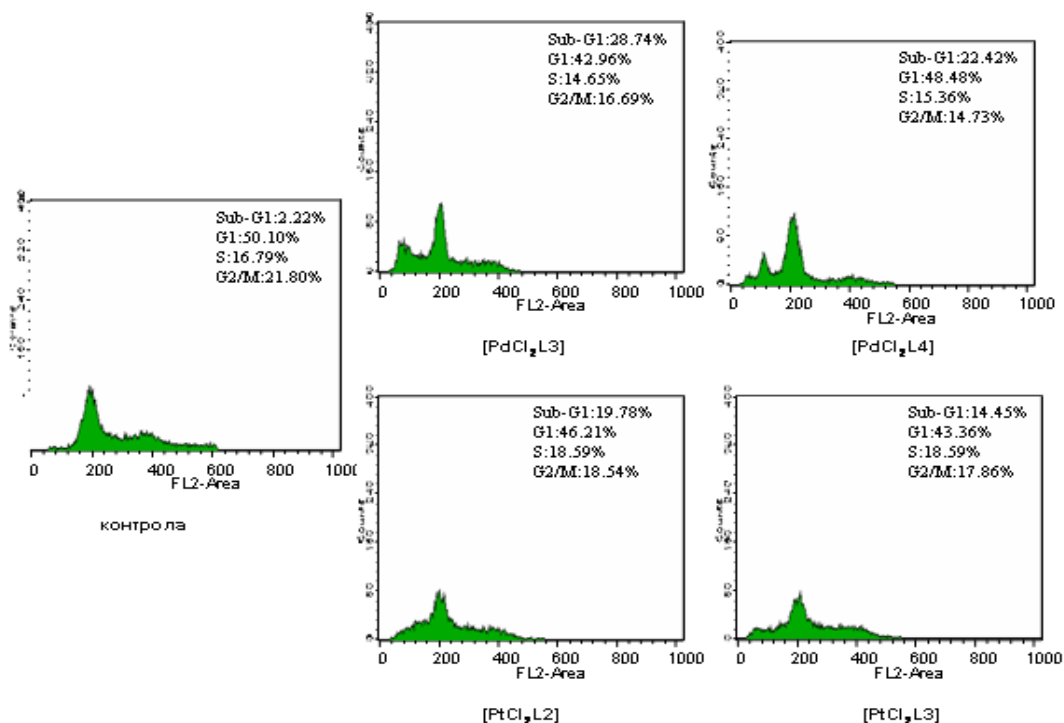
4.6.4. Ћелијски циклус

Анализиран је ефекат лиганата прекурсора и њихових комплекса паладијума(II), платине(II) и платине(IV) на промене ћелијског циклуса циљних малигних ћелија [120]. Ефекат анализираних једињења праћен је након третмана ћелија одговарајућим концентрацијама комплекса. На Сликама 26 и 27 приказана је дистрибуција фаза ћелијског циклуса MDA-MB-361, односно MDA-MB-453 ћелија након 24 h, инкубације при концентрацији IC₅₀ испитиваних најактивнијих једињења.

Показано је да је *in vitro* цитотоксична активност удружена са значајном акумулацијом ћелија у sub-G1 фази ћелијског циклуса уз опадање процента ћелија у S и G2/M фази ћелијског циклуса. Ово јасно указује на то да анализирана једињења индукују апоптозу.



Слика 26. Цитофлуорометријски профил дејства комплекса платине(IV) на MDA-MB-361 ћелије. Y оса: релативан број ћелија, X оса: DNK садржај утврђен пропиридијум јодидом. MDA-MB-361 ћелије су инкубиране 24 h у присуству или одсуству једињења (IC₅₀) и припремљене за анализу фаза ћелијског циклуса проточним цитометром. Процент ћелија у G1, S и G2/M је преузет из једног репрезентативног експеримента.



Слика 27. Цитофлуорометријски профил дејства најактивнијих комплекса паладијум(II) и платина(II) на MDA-MB-453 ћелије. Y оса: релативан број ћелија, X оса: DNK садржај утврђен пропидијум јодидом. MDA-MB-453 ћелије су инкубиране 24 h у присуству или одсуству једињења (IC₅₀) и припремљене за анализу фаза ћелијског циклуса проточним цитометром. Процент ћелија у G1, S и G2/M је преузет из једног репрезентативног експеримента.

5. ЗАКЉУЧАК

У овој докторској дисертацији описана је синтеза, карактеризација и потенцијална цитотоксичност *O,O'*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине, [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂, као и одговарајућих паладијум(II), платина(II) и платина(IV) комплекса.

Синтетисано је и окарактерисано четири нова естра и то: (*S,S*)-Et₂eddl·2HCl, (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl, (*S,S*)-Bu₂eddl·2HCl, (*S,S*)-Pe₂eddl·2HCl; четири нова комплекса паладијума(II): [PdCl₂{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PdCl₂{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PdCl₂{(*S,S*)-Bu₂eddl}] и [PdCl₂{(*S,S*)-Pe₂eddl}]; четири нова комплекса платине(II): [PtCl₂{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PtCl₂{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PtCl₂{(*S,S*)-Bu₂eddl}] и [PtCl₂{(*S,S*)-Pe₂eddl}] као и четири нова комплекса платине(IV): [PtCl₄{(*S,S*)-Et₂eddl}], [PtCl₄{(*S,S*)-Pr₂eddl}], [PtCl₄{(*S,S*)-Bu₂eddl}] и [PtCl₄{(*S,S*)-Pe₂eddl}].

Сва добијена једињења окарактерисана су елементалном анализом, инфрацрвеном и NMR спектроскопијом, а у случају (*S,S*)-Pr₂eddl·2HCl, структура је потврђена и рендгенском структурном анализом. DFT прорачуни рађени су за синтетисане комплексе платине(II) и платине(IV).

На основу ових анализа потврђено је следеће:

1. Резултати елементалних анализа су у сагласности са претпостављеном стехиометријом једињења.
2. Инфрацрвени спектри упућују на бидентатну координацију преко азотових атома за централни метални јон.
3. NMR спектри су такође у сагласности са структурама свих једињења. На свим спектрима комплекса примећује се померање сигнала метилених протона етилендиаминског дела молекула према вишем магнетном пољу (у односу на спектре лиганата), што указује на бидентатну координацију преко азотових атома. У случају комплекса платине(II) и платине(IV) примећен је један сет сигнала, док се у случају паладијум(II) комплекса могу приметити по два сета сигнала, што указује на формирање диастереоизомера услед настајања нових стереоцентра на азотовим атомима.

4. Дифракцијом X-зрака потврђена је претпостављена структура за (S,S)-Pr₂eddl·2HCl.
5. DFT прорачуни рађени су за синтетисане комплексе платине(II) и платине(IV) при чему је установљено да је (R,R)-N,N'-конфигурациони изомер најстабилнији, што је у сагласности са NMR спектроскопијом.
6. Цитотоксична активност синтетисаних једињења одређена је на ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (CLL) и хуманим ћелијским линијама: колоректалног карцинома SW480, карцинома дојки (MDA-MB-361 и MDA-MB-453), акутној Т лимфоцитној леукемији Јуркат и хроничној мијелоидној леукемији K562 у поређењу са активношћу цисплатине, као референтним антиканцерогеним леком. Сва једињења показују активност већу од цисплатине према CLL ћелијама. Нађено је да најактивније једињење комплекс платине(II) са *n*-Ви групом у естарском ланцу. Комплекси платине(IV) имају одличну цитотоксичну активност у инхибицији Јуркат и K562 ћелијских линија која је веома слична оној коју показује активност цисплатине.

Резултати ове докторске дисертације су верификовани објављивањем у облику четири научна рада у часописима са импакт фактором (два M21, један M22 и један M23) и већег броја саопштења на домаћим и међународним конференцијама.

6. ЛИТЕРАТУРА

-
- [1] B. Rosenberg, L. VanCamp, T. Krigas, *Nature (London)* **205** (1965) 698.
- [2] B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature (London)* **222** (1969) 385.
- [3] M. Peyrone, *Ann. Chem. Pharm.* **51** (1845) 1.
- [4] I. Piel, D. Meyer, C. Perlia, V. Wolf, *Cancer Chemother. Rep. pt 1* **58** (1974) 871.
- [5] F. Cavelli, R. Sonntag, H. Ryssel, L. Tscxopp, K. Brunner, *Schweuz. Med. Wochenschr.* **106** (1976) 754.
- [6] C. Merrin, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **17** (1976) 243.
- [7] H. Bruckner, C. Cohen, R. Wallach, B. Kabakow, G. Deppe, E. Greenspan, S. Gusberg, J. Holland, *Cancer Treat. Rep.* **62** (1978) 555.
- [8] K. Briscoe, M. Pasmanteir, J. Brown, B. Kennedy, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19** (1978) 378.
- [9] R. Young, B. Chabner, S. Hubbard, R. Fischer, R. Bender, T. Anderson, V. de Vita, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19** (1978) 393.
- [10] J. Hill, E. Loeb, A. MacLellan, N. Hill, A. Khan, *Cancer Chemother. Rep.* **59** (1975) 647.
- [11] W. Hong, S. Shapshay, R. Bhutani, M. Craft, V. Alptekin, K. Yamaguchi, C. Vaughan, M. Strong, *Cancer Res.* **44** (1979) 26.
- [12] M. Soloway, J. de Kernion, D. Rose, L. Persky, *Surg. Forum.* **13** (1973) 542.
- [13] L. Kvols, R. Eagan, E. Creagan, R. Dalton, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **19** (1978) 82.
- [14] M.A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, *Dalton Trans.* (2008) 183.
- [15] K.M. Comess, C.E. Costello, S.J. Lippard, *Biochemistry* **29** (1990) 2102.
- [16] N. Farrell, T.T.B. Ha, J.P. Souchard, F.L. Wimmer, S. Cros, N.P. Johnson, *J. Med.Chem.* **32** (1989) 2240.
- [17] M. Leng, D. Locker, M.J. Giraud-Panis, A. Schwartz, F.P. Intini, G. Natile, C. Pisano, A. Boccarelli, D. Giordano, M. Coluccia, *Mol. Pharmacol.* **58** (2000) 1525.
- [18] U. Kalinowska-Lis, J. Ochocki, K. Matlawska-Wasowska, *Coord. Chem. Rev.* **252** (2008) 1328.
- [19] S. Arandelović, Z.L. Tešić, S.S. Radulović, *Med. Chem. Rev. Online* **2** (2005) 415.
- [20] L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer* **7** (2007) 573.

- [21] H. Choy, *Exper. Rev. Anticancer Ther.* **6** (2006) 973.
- [22] M. Galanski, V.B. Arion, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, *Curr. Pharm. Des.* **9** (2003) 2078.
- [23] C.X. Zxang, S.J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7** (2003) 481.
- [24] M.D. Hall, T.W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.* **232** (2002) 49.
- [25] P.D. Braddock, T.A. Connors, M. Jones, A.R. Khokhar, D.H. Melzack, M.L. Tobe, *Chem-Biol. Interact.* **11** (1975) 145.
- [26] P.J. O'Dwyer, J.P. Stevenson, S.W. Johnson, In: *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*; L.R. Kelland, N.P. Farrell, Ed.; *Cancer Drug Discovery and Development*; Humana Press: New Jersey, USA, 2000, 231.
- [27] T.J. Sabo, S.R. Grgurić-Šipka, S.R. Trifunović, *Synth. React. Inorg. Met.-org. Chem.* **32** (2002) 1661.
- [28] F.C. Bersworth, British Patent, **316** (1955) 723.
- [29] D.B. Haydock, T.P.C. Mulholland, *J. Chem. Soc. C* (1971) 2389.
- [30] C.F. Liu, *Inorg. Chem.* **3** (1964) 680.
- [31] J.N. Jolley, A.I. Yanovsky, L.R. Kelland, K.B. Nolan, *J. Inorg. Biochem.* **83** (2001) 91.
- [32] M. Mullaney, S.C. Chang, R.E. Norman, *Inorg. Chim. Acta.* **265** (1997) 275.
- [33] G.N. Kaluđerović, G.A. Bogdanović, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* **55** (2002) 817.
- [34] V.M. Đinović, G.A. Bogdanović, S. Novaković, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* **57** (2004) 535.
- [35] T.J. Sabo, G.N. Kaluđerović, D. Poleti, Lj. Karanović, A. Boccarelli, F. Cannito, G. Natile, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 1378.
- [36] V.M. Đinović, L.T. Mančić, G.A. Bogdanović, P.J. Vulić, G. del Rosario, T.J. Sabo, O. B. Milošević, *J. Mater. Res.* **20** (2005) 102.
- [37] G.N. Kaluđerović, V.M. Đinović, Z. Juranić, T. Stanojković, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* **59** (2006) 815.
- [38] G.N. Kaluđerović, T. J. Sabo, *Polyhedron* **21** (2002) 2277.
- [39] T.J. Sabo, G.N. Kaluđerović, S.R. Grgurić-Šipka, F.W. Heinemann, S.R. Trifunović, *Inorg. Chem. Comm.* **7** (2004) 241.
- [40] G.N. Kaluđerović, H. Schmidt, S. Schwieger, Ch. Wagner, R. Paschke, A. Dietrich, T. Mueller, D. Steinborn, *Inorg. Chim. Acta.* **361** (2008) 1395.

- [41] M. Kaplun, M. Sandström, D. Boström, A. Shchukarev, P. Peresson, *Inorg. Chim. Acta* **358** (2005) 527.
- [42] D.J. Robinson, C.H.L. Kennard, *J. Chem. Soc. A* (1970) 1008.
- [43] X.-M. Luo, X.-H. Chen, S. Shanmuga Sundara Raj, H.-K. Fun, L.-G. Zhu, *Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **55** (1999) 1220.
- [44] S. Baggio, L.M. Amzel, L.N. Becka, *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **26** (1970) 1698.
- [45] J.R. Wiesner, E.C. Lingafelter: *Inorg. Chem.* **5** (1966) 1770.
- [46] I.A. Baidina, N.V. Podberezskaya, V.V. Bakakin, E.V. Golubovskaya, N.A. Shestakova, G. D. Malchikov, *J. Struct. Chem.* **20** (1979) 463.
- [47] I.A. Baidina, N.V. Podberezskaya, S.V. Borisov, *J. Struct. Chem.* **21** (1980), 659.
- [48] V.Z. Pletnev, Yu.A. Zolotarev, N.M. Galitskii, A.I. Verenich, *J. Struct. Chem.*, **33** (1992) 98.
- [49] G.N. Kaluđerović, H. Schmidt, Ch. Wagner, K. Merzweiler, D. Steinborn, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **72** (2007) 560.
- [50] D. Lebwohl, R. Canetta, *Eur. J. Cancer* **33** (1998) 1522.
- [51] D.P. Gately, S.B. Howell, *Br. J. Cancer* **67** (1993) 1171.
- [52] G. Chu, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 787.
- [53] K. Wang, J. Lu, R. Li, *Coord. Chem. Rev.* **151** (1996) 53.
- [54] T. Hambley, *Coord. Chem. Rev.* **166** (1997) 181.
- [55] E.R. Jamieson, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2467.
- [56] P. Jordan, M. Carmo-Fonseca, *Cell. Mol. Life Sci.* **57** (2000) 1299.
- [57] S.E. Miller, D.A. House, *Inorg. Chim. Acta* **166** (1989) 189.
- [58] T.G. Appleton, J.R. Hall, S. F. Ralph, C.S.M. Thompson, *Inorg. Chem.* **28** (1989) 1989.
- [59] S.J. Berners-Price, T. A. Frenkiel. U. Frey, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* (1992) 789.
- [60] S.E. Miller, D.A. House, *Inorg. Chim. Acta* **187** (1991) 125.
- [61] J. Reedijk, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2499.
- [62] B. Lippert (Ed.), *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading. Anticancer Drug*; VHCA, Zürich; Wiley-VCH, Weinheim **8** (1999) 563.
- [63] G.N. Kaluđerović, R. Paschke, *Current Med. Chem.* **18** (2011) 4738.

- [64] R.P. Pérez, *Eur. J. Cancer* **34** (1998) 1535.
- [65] M.A. Jakupec, M. Galanski, B.K. Keppler, *Rev. Phys. Biochem. Pharm.* **146** (2003) 1.
- [66] T. Soldatović, Ž.D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 1472.
- [67] M.A. Fuertes, C. Alonso and J.M. Pérez, *Chem. Rev.* **103** (2003) 3.
- [68] G. Hacker, The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **301** (2000) 5.
- [69] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, *Br J Cancer* **26** (1972) 239.
- [70] J. Savill, V. Fadok, Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407** (2000) 784.
- [71] K. Kurosaka, M. Takahashi, N. Watanabe, Y. Kobayashi, *J Immunol* **171** (2003) 4672.
- [72] A.G. Renehan, C. Booth, C.S. Potten. What is apoptosis, and why is it important? *Brit. Med. Journal* **322** (2001) 1536.
- [73] D. Nijhawan, N. Honarpour, X. Wang, Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* **23** (2000) 73.
- [74] G.N. Kaluđerović, V.M. Đinović, Z.D. Juranić, T.P. Stanojković, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 488.
- [75] G.N. Kaluđerović, Dj. Miljković, M. Momčilović, V.M. Đinović, M. Mostarica Stojković, T.J. Sabo, V. Trajković, *Int. J. Cancer.* **116** (2005) 479.
- [76] L. Potters, Y. Cao, E. Calugaru, T. Torre, P. Fearn, X.H.Wang, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50** (2001) 605.
- [77] S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanović, J. Radović, Dj. Miljković, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, V. Trajković, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62** (2005) 1275.
- [78] G.N. Kaluđerović, H. Kommera, S. Schwieger, A. Paethanom, M. Kunze, H. Schmidt, R. Paschke, D. Steinborn, *Dalton Trans.* **48** (2009) 10720.
- [79] J.L. Butour, S. Wimmer, F. Wimmer, P. Castan, *Chem. Biol. Inter.* **104** (1997) 165.
- [80] J. Ruiz, J. Lorenzo, L. Sanglas, N. Cutillas, C. Vicente, M.D. Villa, F. X. Avilés, G. López, V. Moreno, J. Pérez, D. Bautista, *Inorg. Chem.* **45** (2006) 6347.
- [81] E.R. Jamieson, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2467.
- [82] C. Navarro-Ranninger, J.M. Pérez, F. Zamora, V.M. González, J.R. Masaguer, C. Alonso, *J. Inorg. Biochem.* **52** (1993) 37.
- [83] S. Ray, R. Mohan, J.K. Singh, M.K. Samantaray, M.M. Shaikh, D. Panda, P. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 15042.

- [84] T. Storr, K.H. Thompson, C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.* **35** (2006) 534.
- [85] N.N. Stone, P.G. Stock, *Eur. Urol.* **41** (2002) 427.
- [86] L. Potters, Y. Cao, E. Calugaru, T. Torre, P. Fearn, X. H. Wang, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50** (2001) 605.
- [87] B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, S. Gómez-Ruiz, Ž. Žižak, D. Steinborn, H. Schmidt, R. Paschke, Z. D. Juranić, T.J. Sabo, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3452.
- [88] B.B. Krajčinović, G.N. Kaluđerović, D. Steinborn, Ch. Wagner, K. Merzweiler, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* **74** (2009) 389.
- [89] B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, S. Gómez-Ruiz, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* **74** (2009) 1335.
- [90] L.N. Schoenberg, D.W. Cooke, C.F. Liu, *Inorg. Chem.* **7** (1968) 2386.
- [91] Oxford Diffraction, CrysAlis CCD and CrysAlis RED Versions 1.171.34.41, Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, England, 2008.
- [92] M.C. Burla, M. Camalli, B. Carrozzini, G.L. Cascarano, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna, *J. Appl. Crystallog.* **36** (2003) 1103.
- [93] R.C. Clark and J.S. Reid, *Acta Crystallogr.* **A51** (1995) 887.
- [94] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.* **A64** (2008) 112.
- [95] M. Nardelli, *Comput. Chem.* **7** (1983) 95.
- [96] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **30** (1997) 565.
- [97] C.F. Macrae, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G.P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. van de Streek, *J. Appl. Crystallogr.* **39** (2006) 453.
- [98] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, Jr.T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A.

- Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, GAUSSIAN 03, Revision C.02, Gaussian, J.A. Pople, Inc., Wallingford CT, 2004.
- [99] C. Adamo, V. Barone, *Chem. Phys. Lett.* **274** (1997) 242.
- [100] T.H. Dunning Jr., P.J. Hay, *Modern Theoretical Chemistry*, 3rd ed., Vol. 3, Plenum, New York, 1976, pp. 1–28; D. Andrae, U. Häußermann, M. Dolg, H. Stoll, H. Preuß, *Theor. Chem. Acc.* **77** (1990) 123.
- [101] S.J. Gardai, K.A. McPhillips, S.C. Frasch, W.J. Janssen, A. Starefeldt, J.E. Murphy-Ullrich, D.L. Bratton, P.A. Oldenborg, M. Michalak, P.M. Henson, Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* **123** (2005) 321.
- [102] R.M. Locksley, .Killeen, M.J. Lenardo, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104** (2001) 487.
- [103] A. Ashkenazi, V.M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281** (1998) 1305.
- [104] Y. Chicheportiche, P.R. Bourdon, H. Xu, Y.M. Hsu, H. Scott, C. Hession, I. Garcia, J.L. Browning, TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 32401.
- [105] G. Hacker, The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **301** (2000) 5.
- [106] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J Cancer* **26** (1972) 239.
- [107] J. Savill, V. Fadok, Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407** (2000) 784.
- [108] K. Kurosaka, M. Takahashi, N. Watanabe, Y. Kobayashi, Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* **171** (2003) 4672.
- [109] J.M. Vujić, M. Cvijović, G.N. Kaluđerović, M. Milovanović, B.B. Zmejkovski, V. Volarević, N. Arsenijević, T.J. Sabo, S.R. Trifunović, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 3601.

- [110] J.M. Vujić, G.N. Kaluđerović, M. Milovanović, B.B. Zmejkovski, V. Volarević, D. Živić, P.M. Đurđević, N. Arsenijević, S.R. Trifunović, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 4559.
- [111] J.M. Vujić, G.N. Kaluđerović, B.B. Zmejkovski, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević, T.P. Stanojković, S.R. Trifunović, *Inorg. Chim. Acta* **390** (2012) 123.
- [112] J.M. Vujić, S. García-Granda, L. Menéndez-Taboada, S.B. Novaković, S.R. Trifunović, *J. Serb. Chem. Soc.* **77** (2012) 1.
- [113] Ž.D. Bugarčić, B. Petrović, Z.M. Bugarčić, S.M. Janković, S.V. Janković, G. Lukić, M. Novaković, V. Kostović, S. Popović, P. Đurđević, D. Baskić, N. Arsenijević, *Toxicol. in Vitro* **22** (2008) 1878.
- [114] B.D Cheson, *Hematol. Cell Ther.* **42** (2000) 1269.
- [115] I. Kivekäs, G. Tobin, U. Thunberg, L. Vilpo, C. Sundström, R. Rosenquist, J. Vilpo, *Leukemia Res.* **27** (2003) 337.
- [116] I. Kivekäs, L. Vilpo, J. Vilpo, *Leukemia Res.* **26** (2002) 1035.
- [117] W. Su, S. Chang, T. Chen, J. Chen and C. Tsao *Jpn. J. Clin. Oncol.* **30** (2000) 562.
- [118] H. Varbanov, S.M. Valiahdi, A.A. Legin, M.A. Jakupec, A. Roller, M. Galanski, B.K. Keppler, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 5456.
- [119] C. Liedtke, J. Wang, A. Tordai, W.F. Symmans, G.N. Hortobagyi, L. Kiesel, K. Hess, K.A. Baggerly, K.R. Coombes, L. Pusztai, *Breast Cancer Res. Treat.* **121** (2010) 301.
- [120] T. Drewa, A. Wozniak, G. Drewa, *Med. Sci. Monit.* **7** (2001) 680.

БИОГРАФИЈА

Јелена М. Вујић рођена је 11.08.1983. године у Крагујевцу. Основну школу завршила је у Крагујевцу са одличним успехом. После Прве крагујевачке гимназије, природно-математички смер, 2002. године уписала је Природно-математички факултет у Крагујевцу, студијска група Хемија, општи смер. Дипломирала је 27.10.2006. године са просечном оценом 9,37.

На Докторске студије, смер Неорганска хемија, на Институту за хемијске науке Природно-математичког факултета у Крагујевцу уписала се школске 2006/07. године. За изузетан успех у току студија добитник је награде Српског Хемијског Друштва 2007. године. Изабрана је у звање истраживач-приправник 25.04.2007. године на ПМФ-у у Крагујевцу и водила вежбе на предметима: Општа и неорганска хемија II, Бионеорганска хемија и Неоргански индустријски загађивачи.

У периоду 2007-2010. била је ангажована као млади истраживач на Пројекту број 142008 „Синтеза нових комплексних јона прелазних метала и механизам њихових реакција са биолошки значајним лигандима“, Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије.

Од 01.10.2008. ради као асистент на Агрономском факултету у Чачку за ужу научну област Хемија при чему активно учествује у раду са студентима изводећи вежбе из предмета Општа и неорганска хемија на свим смеровима.

За период 2011-2014. ангажована је као истраживач на Пројекту број 172016 „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала“ Министарства просвете и науке Републике Србије.

РАДОВИ У КОЈИМА СУ ШТАМПАНИ РЕЗУЛТАТИ ОБЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. J.M. Vujić, M. Cvijović, G.N. Kaluđerović, M. Milovanović, B.B. Zmejkovski, V. Volarević, N. Arsenijević, T.J. Sabo and S.R. Trifunović,

Palladium(II) complexes with R₂edda derived ligands. Part IV. O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells,

Eur. J. Med. Chem. **45** (2010) 3601–3606;

ISSN:0223-5234; DOI:10.1016/j.ejmech.2010.05.005;

M21

2. J.M. Vujić, G.N. Kaluđerović, M. Milovanović, B.B. Zmejkovski, V. Volarević, D. Živić, P.M. Đurđević, N. Arsenijević and S.R. Trifunović,

Stereospecific ligands and their complexes. Part VII. Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity of platinum(II) complexes with O,O' -dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoic acid,

Eur. J. Med. Chem. **46** (2011) 4559-4565;

ISSN: 0223-5234; DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.07.034;

M21

3. J.M. Vujić, G.N. Kaluđerović, B.B. Zmejkovski, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević, T.P. Stanojković and S.R. Trifunović,

Stereospecific ligands and their complexes. Part X. Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity of platinum(IV) complexes with O,O'-dialkyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoate ligands

Inorg. Chim. Acta **390** (2012) 123-128;

ISSN: 0020-1693; DOI:10.1016/j.ica.2012.03.048;

M22

4. J.M. Vujić, S. Garcia-Granda, L. Menendez-Taboada, S.B. Novaković and S.R. Trifunović

Stereospecific ligands and their complexes. Part XIV. Crystal structure of O,O'-dipropyl ester of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride

J. Serb. Chem. Soc. **77** (2012) 1-11;

ISSN: 0352-5139; DOI:10.2298/JSC120208041V

M23

НАУЧНО-ИСТРАЖИВАЧКИ РАД

1. Списак радова

1. J.M. Vujić, M. Cvijović, G.N. Kaluđerović, M. Milovanović, B.B. Zmejkovski, V. Volarević, N. Arsenijević, T.J. Sabo and S.R. Trifunović,

Palladium(II) complexes with R₂edda derived ligands. Part IV. O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells,

Eur. J. Med. Chem. **45** (2010) 3601–3606;

ISSN:0223-5234; DOI:10.1016/j.ejmech.2010.05.005;

M21

2. J.M. Vujić, G.N. Kaluđerović, M. Milovanović, B.B. Zmejkovski, V. Volarević, D. Živić, P.M. Đurđević, N. Arsenijević and S.R. Trifunović,

Stereospecific ligands and their complexes. Part VII. Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity of platinum(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoic acid,

Eur. J. Med. Chem. **46** (2011) 4559-4565;

ISSN: 0223-5234; DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.07.034;

M21

3. J.M. Vujić, G.N. Kaluđerović, B.B. Zmejkovski, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević, T.P. Stanojković and S.R. Trifunović,

Stereospecific ligands and their complexes. Part X. Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity of platinum(IV) complexes with O,O'-dialkyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoate ligands

Inorg. Chim. Acta **390** (2012) 123-128;

4. J.M. Vujić, S. Garcia-Granda, L. Menendez-Taboada, S.B. Novaković and S.R. Trifunović
Stereospecific ligands and their complexes. Part XIV. Crystal structure of O,O'-dipropyl ester of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride
J. Serb. Chem. Soc. **77** (2012) 1-11;

ISSN: 0352-5139; DOI:10.2298/JSC120208041V

M23

5. D. Ilić, J.M. Vujić, I.D. Radojević, O.D. Stefanović, Lj.R. Čomić, D.D. Banković and S.R. Trifunović,
Stereospecific ligands and their complexes. Part VIII. Antimicrobial activity of palladium(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid
Hem. Ind. (2011)

ISSN:0367-598X; DOI:10.2298/HEMIND110928096I

M23

6. I.D. Radojević, V.V. Glođović, G.P. Radić, J.M. Vujić, O.D. Stefanović, Lj.R. Čomić and S.R. Trifunović,
From Synthesis to Antibacterial Activity of Some New Palladium(II) and Platinum(IV) Complexes, Chapter in "Antibacterial Agents/Book1"

ISBN: 979-953-307-281-3;

M14

2. Списак саопштења на међународним научним конференцијама штампаним у целости

2.1. J.M. Vujić, G.N. Kaluđerović, B.B. Zmejkovski, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević and S.R. Trifunović,
Synthesis, characterisation and in vitro antitumoral activity of platinum(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 2010; str. 609;

M33

3. Spisak saopšteња na međunarodnim naučnim konferencijama štampanim u izvodu

3.1. J.M. Vujić, G.N. Kaluđerović, B.B. Zmejkovski, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević, S.R. Trifunović

In vitro antitumoral activity of platinum(IV) complex with O,O'-dipropyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoate ligand,

Thirteenth Annual Conference YUKOMAT 2011, Herceg-Novi, 2011, str. 159; **M34**

3.2. J.M. Vujić, D.R. Ilić, I.D. Radojević, O.D. Stefanović, Lj.R. Čomić, D.D. Banković, S.R. Trifunović

Antimicrobial activity of palladium(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid

VII International Conference on Mechanochemistry and Mechanical Alloying, INCOME 2011, Herceg Novi, August 31-September 3, 2011; **M34**

3.3. J. Vujić, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević and S. Trifunović

Antitumoral activity of platinum(IV) complexe with O,O'-diethyl ester of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride

Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research with International Symposium on Anti-cancer Agents, Cardiotoxicity and Neurotoxicity, Kragujevac, 2011, str. 54; **M34**

3.4. J.M. Vujić, D. Dimitrijević, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević and S.R. Trifunović

Antitumor activity of palladium(II) complexes with O,O'-dialyl-ethylenediamine-N,N'-di-(S,S)-2-(4-methyl)-pentanoate ligand

7th International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries Romania, 2010 str. 189; **M34**

3.5. J.M. Vujić, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević and S.R. Trifunović

Antitumor activity of platinum(II) complex with O,O'-dipentyl-ethylenediamine-N,N'-di-(S,S)-2-(4-methyl)-pentanoate ligand

7th International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Romania, 2010, str. 190; **M34**

3.6. J.M. Vujić, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević and S.R. Trifunović,
Synthesis, characterization and antitumoral activity of the platinum(II) complex with O,O'-dibutyl-ethylenediamine-N,N'-di-(S,S)-2(4-methyl)-pentanoate ligand,
7th International Conference on Nanosciences and Nanotechnologies-NN10, Ouranopolis Halkidiki, 2010, str. 208; **M34**

3.7. J.M. Vujić, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević, M. Cvijović and S.R. Trifunović,
Synthesis, characterisation and antitumoral activity of the platinum(II) complexes with O,O'-diethyl-ethylenediamine-N,N'-di-(S,S)-2(4-methyl)-pentanoate ligand,
Eleventh Annual Conference YUKOMAT 2009, Herceg-Novi, 2009, str. 191; **M34**

3.8. Jelena M. Vujić, Bojana B. Krajčinović, Tibor J. Sabo and Srećko R. Trifunović,
Synthesis and characterisation of the platinum(II) complex with O,O'-dipropyl-ethylenediamine-N,N'-di-(S,S)-2(4-methyl)-pentanoate ligand,
Sixth International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Bulgaria, 2008. p.333; **M34**

4. Списак саопштења на домаћим научним конференцијама штампаним у изводу

4.1. Jelena M. Vujić, S. Garcia-Granda, L.Menendez Taboada and S.R. Trifunović
Crystal structure of dichlorido-di(trihydroxychloro)-palladium(II) complex
XVIII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Andrijevica, Fruška Gora, 2011. **M64**

4.2. D.P. Dimitrijević, J. Vujić, S. Garcia-Granda, L.Menendez Taboada and S.R. Trifunović
Synthesis and crystal structure of O,O'-dipropyl-ethylenediamine-N,N'-di-(S,S)-(2,2'-dibenzyl)-acetate dihydrochloride
XVII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Ivanjica 2010, 48; **M64**

7. ПРИЛОГ



Original article

Palladium(II) complexes with R₂edda derived ligands. Part IV. *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: Synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells

Jelena M. Vujić^{a,b}, Milica Cvijović^b, Goran N. Kaluđerović^{c,d,*}, Marija Milovanović^e,
Bojana B. Zmejovski^c, Vladislav Volarević^e, Nebojša Arsenijević^e, Tibor J. Sabo^f, Srećko R. Trifunović^a

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

^b Faculty of Agronomy, University of Kragujevac, Cara Dušana 34, 32000, Čačak, Serbia

^c Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Studentski Trg 14, 11000 Belgrade, Serbia

^d Institut für Chemie, Martin-Luther-Universität Helle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Straße 2, 06120 Halle, Germany

^e The Medical Faculty, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^f Faculty of Chemistry, University of Belgrade, P.O. Box 158, 11001 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2009

Received in revised form

9 April 2010

Accepted 5 May 2010

Available online 12 May 2010

Keywords:

Palladium(II) complexes

Edda-type ligands

Antitumoral activity

Chronic lymphocytic leukemia cells

ABSTRACT

Four novel bidentate *N,N'*-ligand precursors, including *O,O'*-dialkyl esters (alkyl = ethyl, *n*-propyl, *n*-butyl and *n*-pentyl), L1·2HCl–L4·2HCl, of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂ and the corresponding palladium(II) complexes **1–4**, were prepared and characterized by IR, ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy and elemental analysis. *In vitro* cytotoxicity of all compounds was determined against chronic lymphocytic leukemia cells (CLL). The compounds were found to exhibit higher antitumoral activity than cisplatin. The most active compound **2**, [PdCl₂{(*S,S*)-*n*Pr₂eddl}], was found to be 13.6 times more active than cisplatin on CLL cells.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The simple and well known platinum(II) complex cisplatin has been the most commonly used antitumor platinum-based drug for several decades. The antitumor activity of platinum based drugs still captures the attention of scientists worldwide, and new potential drugs are being synthesized and investigated [1–5]. To date, apart from cisplatin, metal-based anticancer agents that are in worldwide clinical use include carboplatin and oxaliplatin [6].

Complexes with other central metal ions such as palladium [7–9], ruthenium [10,11], gold [12,13], titanium [14,15] and tin [16,17] have been investigated as potential antitumor agents. In principle, the aim of developing non-platinum anticancer

complexes is that of overcoming the main limits of platinum drugs: narrow range of activity, acquired resistance after treatment, and severe toxicity on healthy tissue [1–5]. Non-platinum complexes may exhibit anticancer activity and toxic side-effects markedly different from that of platinum based drugs for a number of obvious reasons, as they are expected to have different chemical behaviour, hydrolytic rates, and mechanism(s) of action.

Research on palladium(II) complexes should be pointed out due to their structural analogy with platinum(II) complexes. The use of Pd(II) and its complexes in medicine is limited. The only application is of ¹⁰³Pd as a radioactive isotope in the treatment of rapidly growing high-grade prostate cancer [18,19].

Initially, palladium complexes showed lower *in vitro* antitumoral activity when compared with platinum(II) complexes. This could be correlated to the more labile nature of palladium(II) relative to platinum(II) complexes [20,21]. As a consequence of rapid ligand exchange, the probability of palladium(II) complexes to reach the biological target in organisms unchanged is low. Several reports have indicated that using chelating ligands may

* Corresponding author. Institut für Chemie, Martin-Luther-Universität Helle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Straße 2, 06120 Halle, Germany. Tel.: +49 345 5525678/+381 11 3336736; fax: +49 345 5527028/+381 11 2636061.

E-mail addresses: goran.kaluderovic@chemie.uni-halle.de, goran@chem.bg.ac.rs (G.N. Kaluđerović).

reduce the reactivity of the palladium ion [22]. The proper choice of ligands is crucial, as they play an important role in modifying reactivity and lipophilicity, in stabilizing specific oxidation states and in imparting substitution inertness [23,24].

Nowadays, some palladium(II) complexes are found to have high cytotoxicity comparable to cisplatin and carboplatin. It has been reported that one of the complexes is many times more active than carboplatin [25,26]. A number of palladium(II) complexes with neutral ligands such as pyridine derivatives [27,28], phosphonate derivatives of quinoline [29,30] or pyrazole derivatives [31] have been investigated and their significant cytotoxic activity has been proved. With bulky and more lipophilic ligands palladium (II) complexes tend to exert better antitumoral activity.

In our earlier work we investigated a number of platinum(II/IV) complexes with bis(carboxyalkylamino)ethane and -propane ligands, and their derivatives [32–36]. *In vitro* antitumor activity of some complexes was compared to that of cisplatin [37–39], and as a result of these findings *N,N* bidentate esters, R_2 edda-type ligands, are now mostly used in our studies.

Recently, we have reported on the synthesis and characterization of the palladium(II) complexes with R_2 edda-type esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid dihydrochloride, [(*S,S*)- H_2R_2 eddi]Cl₂ (Fig. 1. A, B) [7,40] and isobutyl ester of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride, [(*S,S*)- H_2iBu_2 eddi]Cl₂ (Fig. 1. C) [41]. Furthermore, esters of (*S,S*)- H_2R_2 eddi]Cl₂ as well corresponding palladium(II) complexes, [PdCl₂{(*S,S*)- R_2 eddi}], (*R* = *iPr*, *iBu*, *cPe*, *Cy*; Fig. 1. A) have been used in the study of *in vitro* antitumoral investigations [7].

This study is focused on the synthesis, characterization and antiproliferative activity of four novel R_2 edda-type ligand precursors: *O,O'*-diethyl- (**L1**·2HCl) *O,O'*-dipropyl- (**L2**·2HCl) *O,O'*-dibutyl- (**L3**·2HCl) *O,O'*-dipentyl- (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate dihydrochlorides (**L4**·2HCl) and their corresponding palladium(II) complexes: dichloro(*O,O'*-diethyl- (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate)palladium (II), (**1**), dichloro(*O,O'*-dipropyl- (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate)palladium(II) (**2**), dichloro(*O,O'*-dibutyl- (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate)palladium (II) (**3**), dichloro(*O,O'*-dipentyl- (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate)palladium(II) (**4**).

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Esters **L1**·2HCl–**L4**·2HCl and neutral palladium(II) complexes **1–4** were prepared by using appropriate modifications of known methods [7,33–38]. These esters are not soluble in chloroform, but rather in water, methanol, dimethyl sulfoxide and hot alcohols used in individual esterification reactions. Complexes were synthesized by combining aqueous solutions of K₂[PdCl₄] and the

corresponding esters (Scheme 1). The resulting complexes are soluble in chloroform and dimethyl sulfoxide, but not in water.

2.2. Spectroscopic measurements

IR spectra are similar to those of the previously reported compounds [40,41]. Absorption bands for secondary amino groups were found for **1–4** at 3088, 3143, 3133, 3139 cm⁻¹, respectively, indicating coordination *via* nitrogen atoms (for ligand precursors only bands for secondary ammonium groups can be observed; **L1**·2HCl–**L4**·2HCl: $\nu(R_2NH_2^+)$ at 3457, 3453, 3455, 3452 cm⁻¹). All other specific bands were found at similar positions for corresponding ligand precursors and complexes, thus indicating that no other atom was coordinated to the palladium center. This is shown by the following data – for complexes **1–4**: $\nu(C=O)$ at 1739, 1739, 1740, 1741 cm⁻¹, $\nu(C-O)$ at 1194, 1195, 1197, 1197 cm⁻¹ and $\nu(CH_3)$ at 2960, 2961, 2960, 2959 cm⁻¹, respectively. As compared to ligand precursors **L1**·2HCl–**L4**·2HCl, the following bands were found: $\nu(C=O)$ at 1737, 1735, 1736, 1736 cm⁻¹, $\nu(C-O)$ at 1216, 1210, 1209, 1211 cm⁻¹ and $\nu(CH_3)$ at 2975, 2966, 2963, 2960 cm⁻¹.

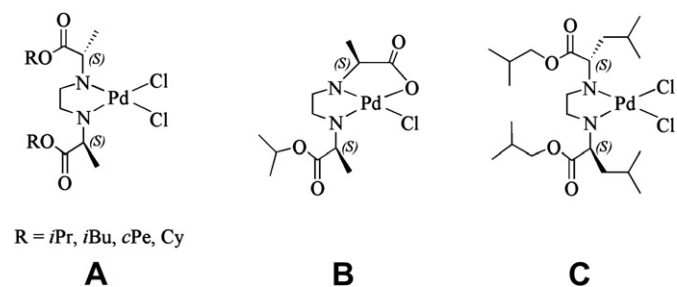
The expected signals were found in ¹H and ¹³C NMR spectra. In the ¹H NMR spectra of **1–4**, the broad signals of hydrogen atoms belonging to secondary amino groups occur between 5.8 and 6.6 ppm (comparing with **L1**·2HCl–**L4**·2HCl: 9.5–10.5 ppm). The signals of CH₂ protons of the ethylenediamine bridge showed coordination induced shifts in spectra of **1–4** (up to 0.9 ppm) giving a clear indication of nitrogen coordination. Signals for all methyl protons were found within the range of 0.86–1.13 ppm for all compounds.

In ¹³C NMR spectra ester carbon atom resonances were found as expected, at around 170 ppm for all compounds verifying that oxygen is not a ligating atom. For the complexes NMR spectroscopic measurements uphold their constitution. Two sets of signals were found for complexes **1–4** (in an almost equal ratio except in the case of complex **4**, ratio 3:2) indicating the formation of diastereoisomers. Coordination of **L1**·2HCl–**L4**·2HCl to the PdCl₂ fragment induced formation of two extra chiral centers on ligating N atoms. Thus, three diastereoisomers should be expected for [PdCl₂{(*S,S*)- R_2 eddi}] (*R* = Et, *nPr*, *nBu*, *nPe*; (*R,R*), (*R,S*≡*S,R*) and (*S,S*), Fig. 2). Two of the three possible diastereoisomers, (*S,S*) and (*R,R*), will give rise to (due to C₂ symmetry) one set of resonances. The third diastereoisomer, (*R,S*), should give rise to two sets of signals since the ester branches are inequivalent. These signals may overlap by chance.

2.3. Cytotoxicity

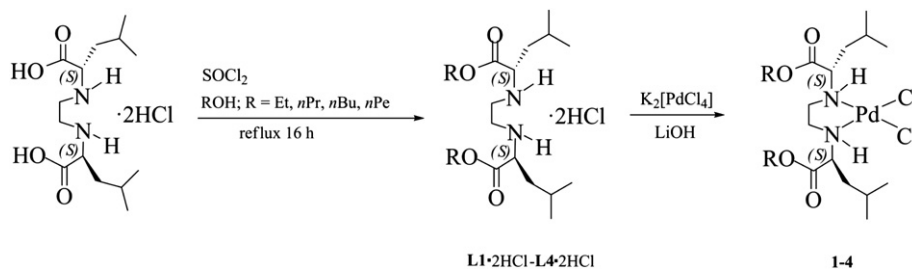
Ligand precursors **L1**·2HCl–**L4**·2HCl and corresponding palladium(II) complexes **1–4** along with cisplatin, for comparison purposes, were tested for cytotoxic activity on chronic lymphocytic leukemia cells (CLL). The tested compounds showed a dose-dependent antiproliferative effect toward CLL cells (Fig. 3).

Ligand precursors showed cytotoxicity dependence on the chain length (Fig. 3, Table 1). Namely, as the ester chain was longer the higher activity was observed. The compounds **L1**·2HCl–**L3**·2HCl had low to medium activity against the selected cell type (IC₅₀ = 70.2–114.6 μM), but **L4**·2HCl exhibited the activity considerably higher than that of other ligand precursors (IC₅₀ = 29.1 μM). In general, it seems that as the lipophilicity of the ester groups increases (Et < *nPr* < *nBu* < *nPe*), cytotoxicity becomes higher. On the other hand, different behavior was noticed for the corresponding palladium (II) complexes. Complexes **1** and **3** with Et and *nBu* groups, respectively, in ester chains showed lower activity by 2.8–4.8 times than complexes having *nPr* (**2**) or *nPe* groups (**4**). Taking in consideration standard deviations of the compounds, no change in the *in vitro* cytotoxic activities of parental ligand **L1**·2HCl and corresponding



R = *iPr*, *iBu*, *cPe*, *Cy*

Fig. 1. Palladium complexes containing R_2 edda-derived ligands.



Scheme 1. Synthesis of the esters **L1**·2HCl–**L4**·2HCl and palladium(II) complexes **1–4**.

palladium(II) complex (**1**) was observed, nor in the case of **L3**·2HCl/**3** and **L4**·2HCl/**4**. Conversely, upon coordination of ester with *n*Pr chains (**L2**·2HCl, **2**) cytotoxicity was found to be 4.2 times higher. All the tested compounds, ligand precursors and palladium(II) complexes showed higher activity than cisplatin ($IC_{50} = 263.7 \mu\text{M}$). The previously reported results are in agreement with our findings on the cytotoxicity of cisplatin [42–46]. In order to confirm the results obtained with MTT assay, the cytotoxicity test was repeated with a crystal violet assay for the compound **4** and cisplatin. The IC_{50} values calculated using the crystal violet assay (IC_{50} : **4**, $27.62 \pm 9.16 \mu\text{M}$; cisplatin, $218.58 \pm 30.78 \mu\text{M}$) were not significantly different from the values calculated by the MTT assay (Table 1).

Recently was reported that palladium complexes with the similar ligands (*S,S*)- R_2 eddip (esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid; $R = i\text{Pr}, i\text{Bu}, \text{Cy}, c\text{Pe}$ – cyclopentyl) expressed generally lower activity than ligand precursors [7]. Some structure–activity relationships were concluded: the order of activity is related to the *R* substituent in (*S,S*)- R_2 eddip, namely on raising the lipophilicity of the ester groups ($\text{Cy} > c\text{Pe} > i\text{Bu} > i\text{Pr}$) the cytotoxic activity increases in both, esters and in the palladium complexes, ($R = \text{Cy} > c\text{Pe} > i\text{Bu} > i\text{Pr}$); when the central metal ion is changed from palladium(II) to platinum(II/IV) cytotoxic action increase significantly [7,36]. For the ligand precursors from this study the same was noted regarding cytotoxicity–lipophilicity relation, but in the case of palladium(II) complexes irregularity was observed what at the moment cannot be explained. On the other hand, improvement of the cytotoxicity of palladium complexes was demonstrated here, which was similar or higher than that for ligand precursors. Further studies will focus on the corresponding platinum(II/IV) complexes and structure–activity relationships for R_2 eddip compounds.

3. Conclusions

Ligand precursors **L1**·2HCl–**L4**·2HCl and corresponding palladium(II) complexes **1–4** were synthesized and characterized. NMR spectroscopy showed the presence of two diastereoisomeric forms.

The cytotoxic activity of all the synthesized compounds was determined on chronic lymphocytic leukemia cells (CLL). The esters and their corresponding palladium(II) complexes exhibited moderate to low cytotoxic activity against selected CLL cell line. As for ligand precursors, it seems that increasing lipophilicity of the ester groups ($\text{Et} < n\text{Pr} < n\text{Bu} < n\text{Pe}$) resulted in higher cytotoxicity (IC_{50} from 114 to $29 \mu\text{M}$). Complexes with Et (**1**) and *n*Bu (**3**) groups in ester chains exhibited 2.8–4.8-fold lower activity than complexes having *n*Pr (**2**) or *n*Pe groups (**4**). The most active compounds are **L4**·2HCl ($IC_{50} = 29 \pm 2 \mu\text{M}$) and **2** ($IC_{50} = 19 \pm 6 \mu\text{M}$). All compounds exhibited higher activity than cisplatin ($IC_{50} = 263.7 \mu\text{M}$).

4. Experimental

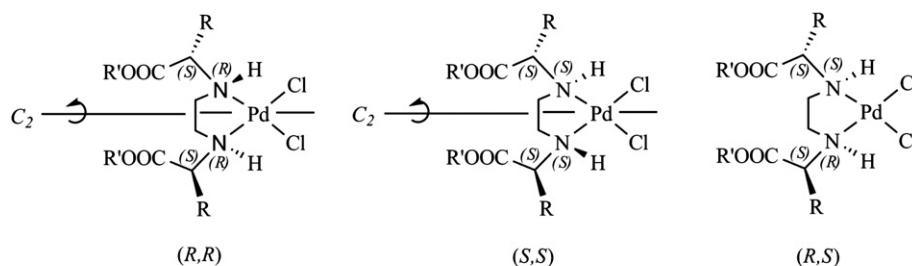
4.1. Materials and measurements

(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride, [(*S,S*)- H_4 eddI] Cl_2 , was prepared using similar methods described in literature [47]. $K_2[PdCl_4]$ was purchased from Merck and used without further purification. Alcohols were dried by standard methods. Infrared spectra were recorded by a Perkin–Elmer FTIR 31725-X and Perkin–Elmer Spectrum One FTIR spectrophotometer using the KBr pellet technique ($4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded by a Varian “Gemini 2000” (200 MHz) spectrometer in D_2O (ligand precursors) and $CDCl_3$ (palladium(II) complexes) using tetramethylsilane as internal standard. Elemental analyses for C, H and N were performed by a Vario EL III C, H, N, S Elemental Analyzer.

4.2. Chemical synthesis

4.2.1. Synthesis of *O,O'*-dialkyl esters of [(*S,S*)- H_4 eddI] Cl_2 , **L1**·2HCl–**L4**·2HCl

The esters were prepared using the esterification reaction previously described [48,49]. Thionyl chloride (4 cm^3 , 55 mmol) was introduced into a flask containing 50 cm^3 of corresponding ice



$R = i\text{Bu}; R' = \text{Et}, n\text{Pr}, n\text{Bu}, n\text{Pe}$

Fig. 2. Diastereoisomers of palladium(II) complexes **1–4**.

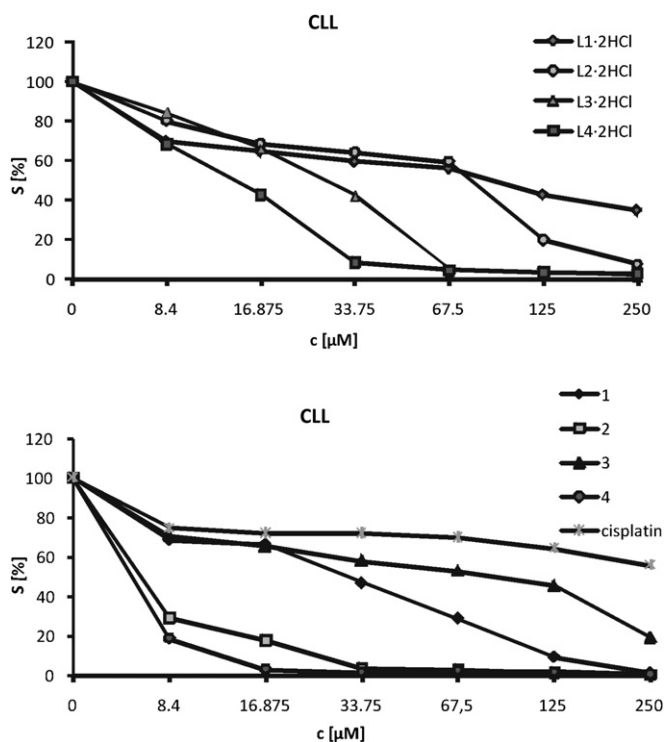


Fig. 3. Representative graphs of CLL cell survival after 72 h of cell growth (MTT assay) in the presence of ligand precursors **L1**·2HCl–**L4**·2HCl, palladium(II) complexes (**1**–**4**) and cisplatin.

cooled alcohol (ethyl, *n*-propyl, *n*-butyl or *n*-pentyl; anhydrous conditions) for 1 h. After addition of the 2 g (5.54 mmol) [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂ the reaction mixture was refluxed for 16 h, filtered off and the filtrate was left for a few days in a refrigerator at 4 °C. The esters were recrystallized from the hot alcohol used for each reaction. Numbering of carbon atoms is shown in Fig. 4.

L1·2HCl·H₂O, yield 1.12 g, 48.78%. Anal. calcd. for C₁₈H₃₈N₂O₄Cl₂·H₂O: C, 49.65; H, 9.25; N, 6.43%. Found: C, 49.73; H, 8.79; N, 6.44%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0.96 (d, 12H, ³J_{H,H} = 5.68, C^{6,7}H₃), 1.31 (t, 6H, C⁹H₃), 1.65–2.00 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 3.49 (s, 4H, C¹H₂), 4.17 (m, 2H, C²H), 4.33 (q, 4H, C⁸H₂). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ ppm): 16.1 (C⁹H₃), 23.7 and 24.9 (C^{6,7}H₃), 27.1 (C⁵H), 41.2 (C⁴H₂), 45.3 (C¹H₂), 62.2 (C²H), 66.8 (C⁸H₂), 173.0 (COOR). IR (cm⁻¹): 3457, 2975, 2719, 2622, 2527, 2403, 1737, 1546, 1476, 1216, 1066, 1015, 803.

L2·2HCl·0.5H₂O, yield 0.98 g, 40.90%. Anal. calcd. for C₂₀H₄₂N₂O₄Cl₂·0.5H₂O: C, 52.86; H, 9.54; N, 6.16%. Found: C, 52.74; H, 9.21; N, 6.36%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0.93 (t, 1 6H, C¹⁰H₃), 0.95 (d, 12H, ³J_{H,H} = 6.10, C^{6,7}H₃), 1.60–2.00 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1.76 (m, 4H, C⁹H₂), 3.51 (s, 4H, C¹H₂), 4.15 (m, 2H, C²H), 4.25 (t,

Table 1

IC₅₀ (µM) for the 72 h of action of investigated compounds on CLL cells, as determined by MTT assay.

Compound	CLL cells
L1 ·2HCl	114.6 ± 27.34
L2 ·2HCl	81.93 ± 15.48
L3 ·2HCl	70.19 ± 19.58
L4 ·2HCl	29.11 ± 2.09
1	88.12 ± 25.69
2	19.34 ± 6.54
3	92.14 ± 11.68
4	31.18 ± 7.76
Cisplatin	263.75 ± 33.36

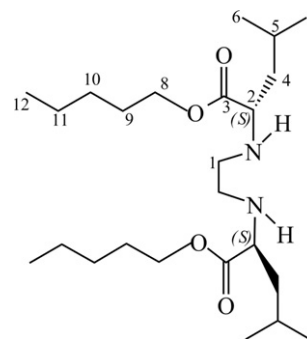


Fig. 4. Numbering of compounds used for NMR data.

4H, ³J_{H,H} = 6.48, C⁸H₂). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ ppm): 14.0 (C¹⁰H₃), 25.1 (C⁹H₂), 25.6 and 28.4 (C^{6,7}H₃), 28.7 (C⁵H), 42.6 (C⁴H₂), 46.6 (C¹H₂), 63.7 (C²H), 73.6 (C⁸H₂), 174.3 (COOR). IR (cm⁻¹): 3453, 2966, 2721, 2621, 2528, 2407, 1735, 1547, 1472, 1210, 1065, 927, 802.

L3·2HCl·H₂O, yield 1.02 g, 39.38%. Anal. calcd. for C₂₂H₄₆N₂O₄Cl₂·H₂O: C, 53.75; H, 9.84; N, 5.69%. Found: C, 53.29; H, 9.48; N, 5.78%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0.91 (t, 6H, C¹¹H₃), 0.95 (d, 12H, ³J_{H,H} = 5.04, C^{6,7}H₃), 1.38 (m, 4H, C¹⁰H₂), 1.60–2.00 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1.69 (m, 4H, C⁸H₂), 3.47 (s, 4H, C¹H₂), 4.15 (m, 2H, C²H), 4.30 (t, 4H, C⁸H₂). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ ppm): 15.8 (C¹¹H₃), 21.5 (C¹⁰H₂), 23.7 and 25.0 (C^{6,7}H₃), 27.2 (C⁹H₂), 32.7 (C⁵H), 41.3 (C⁴H₂), 45.4 (C¹H₂), 62.2 (C²H), 70.4 (C⁸H₂), 173.3 (COOR). IR (cm⁻¹): 3455, 2963, 2716, 2619, 2526, 2405, 1736, 1546, 1470, 1209, 1062, 925, 803.

L4·2HCl·H₂O, yield 0.96 g, 35.05%. Anal. calcd. for C₂₄H₅₀N₂O₄Cl₂·H₂O: C, 55.47; H, 10.08; N, 5.39%. Found: C, 55.32; H, 9.83; N, 5.14%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ ppm): 0.91 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7.20, C¹²H₃), 0.99 (d, 12H, ³J_{H,H} = 5.40, C^{6,7}H₃), 1.36 (m, 8H, C^{10,11}H₂), 1.60–2.00 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1.74 (m, 4H, C⁹H₂), 3.53 (s, 4H, C¹H₂), 4.22 (m, 2H, C²H), 4.32 (t, 4H, C⁸H₂). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ ppm): 10.8 (C¹²H₃), 14.5 (C¹¹H₂), 18.4 and 19.2 (C^{6,7}H₃), 19.6 (C¹⁰H₂), 21.9 (C⁹H₂), 25.0 (C⁵H), 35.9 (C⁴H₂), 40.0 (C¹H₂), 57.0 (C²H), 65.5 (C⁸H₂), 167.9 (COOR). IR (cm⁻¹): 3452, 2960, 2726, 2623, 2525, 2401, 1736, 1543, 1470, 1211, 1066, 956, 798.

4.2.2. Synthesis of the palladium(II) complexes, **1**–**4**

Complexes were obtained by mixing K₂[PdCl₄] (0.2 g, 0.61 mmol) and equimolar amount of the **L1**·2HCl·H₂O (0.267 g, 0.61 mmol), **L2**·2HCl·H₂O (0.277 g, 0.61 mmol), **L3**·2HCl·H₂O (0.301 g, 0.61 mmol) or **L4**·2HCl·H₂O (0.318 g, 0.61 mmol) esters. During the 2 h of stirring 10 cm³ of water solution of LiOH (0.0293 g, 1.22 mmol) was added in small portions to the reaction mixture. Within this period, pale yellow precipitates of the complexes **1**–**4** were obtained, filtered off, washed with cold water, ethanol and ether and air dried.

1·0.5H₂O: Yield 0.26 g, 80.00%. Anal. calcd. for C₁₈H₃₆N₂O₄Cl₂Pd·0.5H₂O: C, 40.73; H, 7.02; N, 5.27%. Found: C, 40.83; H, 6.93; N, 5.44%. Isomer A: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0.94 (d, 12H, ³J_{H,H} = 3.66, C^{6,7}H₃), 1.28 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7.10, C⁹H₃), 1.60–2.10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 2.52 (m, 4H, C¹H₂), 3.48 (q, 2H, C²H), 4.33 (m, 4H, C⁸H₂). 6.30–6.50 (broad s, 2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 14.1 (C⁹H₃), 21.7 (C^{6,7}H₃), 24.6 (C⁵H), 37.7 (C⁴H₂), 48.9 (C¹H₂), 59.6 (C²H), 61.6 (C⁸H₂), 169.6 (COOR). Isomer B: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0.92 (d, 12H, ³J_{H,H} = 3.66, C^{6,7}H₃), 1.39 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7.14, C⁹H₃), 1.60–2.10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 2.80 (m, 4H, C¹H₂), 3.73 (q, 2H, C²H), 4.19 (m, 4H, C⁸H₂), 5.85–6.05 (broad s, 2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 14.2 (C⁹H₃), 22.7 (C^{6,7}H₃), 24.6 (C⁵H), 38.9 (C⁴H₂), 49.3 (C¹H₂), 59.6 (C²H), 60.4 (C⁸H₂), 171.6 (COOR). IR (cm⁻¹): 3088, 2960, 2872, 1739, 1468, 1370, 1239, 1194, 1143, 1024, 934, 849, 774.

2 Yield 0.30 g, 89.45%. Anal. calcd. for $C_{20}H_{40}N_2O_4Cl_2Pd$: C, 43.68; H, 7.33; N, 5.09%. Found: C, 43.33; H, 7.12; N, 5.03%. Isomer A: 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.92 (d, 12H, $^3J_{H,H} = 3.74$, $C^{6,7}H_3$), 1.07 (t, 6H, $^3J_{H,H} = 6.82$, $C^{10}H_3$), 1.60–2.10 (m, 6H, C^4H_2 , C^5H), 1.70 (m, 4H, C^9H_2), 2.54 (m, 4H, C^1H_2), 3.48 (q, 2H, C^2H), 4.25 (m, 4H, C^8H_2), 6.30–6.50 (broad s, 2H, NH). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 10.4 ($C^{10}H_3$), 21.9 ($C^{6,7}H_3$), 22.7 (C^9H_2), 26.0 (C^5H), 37.8 (C^4H_2), 49.3 (C^1H_2), 60.3 (C^2H), 67.2 (C^8H_2), 171.5 (COOR). Isomer B: 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.92 (d, 12H, $^3J_{H,H} = 3.74$, $C^{6,7}H_3$), 1.25 (t, 6H, $^3J_{H,H} = 6.82$, $C^{10}H_3$), 1.60–2.10 (m, 6H, C^4H_2 , C^5H), 1.70 (m, 4H, C^9H_2), 2.82 (m, 4H, C^1H_2), 3.72 (q, 2H, C^2H), 4.08 (m, 4H, C^8H_2), 5.85–6.05 (broad s, 2H, NH). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 10.45 ($C^{10}H_3$), 21.6 ($C^{6,7}H_3$), 23.7 (C^9H_2), 24.7 (C^5H), 38.9 (C^4H_2), 48.9 (C^1H_2), 59.6 (C^2H), 67.1 (C^8H_2), 169.8 (COOR). IR (cm^{-1}): 3143, 2961, 2875, 1739, 1468, 1389, 1241, 1195, 1144, 1057, 946, 845, 775.

3 Yield 0.33 g, 93.19%. Anal. calcd. for $C_{22}H_{44}N_2O_4Cl_2Pd$: C, 45.72; H, 7.67; N, 4.84%. Found: C, 45.49; H, 7.78; N, 4.77%. Isomer A: 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.93 (d, 12H, $^3J_{H,H} = 6.60$, $C^{6,7}H_3$), 1.08 (t, 6H, $^3J_{H,H} = 7.40$, $C^{11}H_3$), 1.40 (sex, 4H, $C^{10}H_2$), 1.60–2.10 (m, 6H, C^4H_2 , C^5H), 1.70 (m, 4H, C^9H_2), 2.55 (m, 4H, C^1H_2), 3.20 (m, 2H, C^2H), 4.28 (t, 4H, C^8H_2), 6.20–6.60 (m, 2H, NH). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 13.6 ($C^{11}H_3$), 19.1 ($C^{6,7}H_3$), 21.6 ($C^{10}H_2$), 25.9 (C^5H), 30.4 (C^9H_2), 38.9 (C^4H_2), 48.9 (C^1H_2), 60.3 (C^2H), 65.5 (C^8H_2), 171.5 (COOR). Isomer B: 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.93 (d, 12H, $^3J_{H,H} = 6.60$, $C^{6,7}H_3$), 1.08 (t, 6H, $^3J_{H,H} = 7.40$, $C^{11}H_3$), 1.40 (sex, 4H, $C^{10}H_2$), 1.60–2.10 (m, 6H, C^4H_2 , C^5H), 1.70 (m, 4H, C^9H_2), 2.81 (m, 4H, C^1H_2), 3.20 (m, 2H, C^2H), 4.12 (t, 4H, C^8H_2), 5.60–6.10 (m, 2H, NH). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 13.7 ($C^{11}H_3$), 19.1 ($C^{6,7}H_3$), 22.6 ($C^{10}H_2$), 24.6 (C^5H), 30.5 (C^9H_2), 37.7 (C^4H_2), 49.1 (C^1H_2), 59.5 (C^2H), 65.3 (C^8H_2), 169.8 (COOR). IR (cm^{-1}): 3133, 2960, 2872, 1740, 1466, 1369, 1241, 1197, 1143, 1089, 938, 844, 736.

4.2.3H₂O: Yield 0.29 g, 72.72%. Anal. calcd. for $C_{24}H_{48}N_2O_4Cl_2Pd \cdot 2.5H_2O$: C, 44.27; H, 8.20; N, 4.30%. Found: C, 43.79; H, 8.01; N, 4.57%. Isomer A: 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.91 (t, 6H, $^3J_{H,H} = 6.60$, $C^{12}H_3$), 1.03 (d, 12H, $^3J_{H,H} = 6.60$, $C^{6,7}H_3$), 1.33 (m, 8H, $C^{10,11}H_2$), 1.60–2.20 (m, 6H, C^4H_2 , C^5H), 1.66 (m, 2H, C^9H), 3.20 (m, 4H, C^1H_2), 3.84 (m, 2H, C^2H), 4.19 (t, 4H, C^8H_2), 5.90–6.10 (broad s, 2H, NH). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 13.8 ($C^{12}H_3$), 22.1 ($C^{6,7}H_3$), 22.7 ($C^{11}H_2$), 24.9 ($C^{10}H_2$), 27.9 (C^9H_2), 28.0 (C^5H), 40.9 (C^4H_2), 42.8 (C^1H_2), 55.4 (C^2H), 66.0 (C^8H_2), 172.3 (COOR). Isomer B: 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.91 (t, 6H, $^3J_{H,H} = 6.60$, $C^{12}H_3$), 1.03 (d, 12H, $^3J_{H,H} = 6.60$, $C^{6,7}H_3$), 1.33 (m, 8H, $C^{10,11}H_2$), 1.60–2.20 (m, 6H, C^4H_2 , C^5H), 1.66 (m, 2H, C^9H), 3.64 (m, 4H, C^1H_2), 3.84 (m, 2H, C^2H), 4.23 (t, 4H, C^8H_2), 6.30–6.50 (broad s, 2H, NH). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 13.8 ($C^{12}H_3$), 22.1 ($C^{6,7}H_3$), 22.7 ($C^{11}H_2$), 24.9 ($C^{10}H_2$), 27.9 (C^9H_2), 28.0 (C^5H), 40.9 (C^4H_2), 42.8 (C^1H_2), 55.4 (C^2H), 66.0 (C^8H_2), 164.9 (COOR). IR (cm^{-1}): 3139, 2959, 2870, 1741, 1466, 1369, 1229, 1197, 1129, 1070, 971, 730.

4.3. In vitro activity

4.3.1. Preparation of drug solutions

Stock solutions of the tested palladium complexes and ligand precursors were made in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 20 mM, filtered through a 0.22 mm Millipore filter before use, and diluted by a nutrient medium to various working concentrations. The concentration of DMSO in the most concentrated working solutions was 1% (v/v). The nutrient medium used was HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) buffered RPMI-1640 supplemented with streptomycin (100 mg/ml), penicillin (100 IU/ml) and 10% fetal bovine serum (FBS). MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide was dissolved (5 mg/ml) in a phosphate buffer saline (PBS) having a pH of 7.2, and filtered through the 0.22 mm Millipore filter before use. All reagents were purchased from Sigma Chemicals.

4.3.2. Cell preparation

Chronic lymphocytic leukemia cells (CLL) were obtained from the heparinized whole blood of patients with chronic lymphocytic leukemia who had not received therapy during the previous six months. CLL cells were separated by density gradient centrifugation using Histopaque 1077 (Sigma). The cells were washed three times in haemaccel and resuspended in RPMI 1640 (10% FBS, 100 IU/ml penicillin G and 100 μ g/ml streptomycin). Cell number and viability were determined by trypan blue staining. The study was approved by the Ethics Committee of the Clinical Center "Kragujevac". Patients signed the informed consent forms.

4.3.3. Cytotoxicity assays

4.3.3.1. MTT assay. The effects of the test compounds on cell viability were determined using MTT colorimetric technique [50]. CLL cells were diluted with medium to 1×10^6 cells/ml and aliquots (5×10^5 cells/100 μ l) were placed in individual wells in 96-multiplates. In addition, each well received 100 μ l of different compounds, which had been serially diluted 2-fold in the medium to concentrations ranging from 250 μ M to 8.4 μ M. The cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 72 h. Upon incubation, multiplates were centrifuged, supernatant was removed, MTT solution (5 mg/ml in PBS, 10 μ l) was added to each well and the plates were incubated for additional 4 h. The multiplates were centrifuged, the cell-free supernatants were suctioned off, and DMSO (150 μ l) was added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm using microplate multimode detector Zenyth 3100. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula: % cytotoxicity = $100 - ((TS - BG_0) - E) / (TS - BG_0) \times 100$, where "BG₀" stands for background of medium alone, "TS" for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and "E" for experimental well.

4.3.3.2. Crystal violet assay. Cell viability after exposure to tested compounds was measured by the crystal violet assay. CLL cells were diluted with medium to 1×10^5 cells/ml, aliquots (5×10^4 cells/100 μ l) were placed in individual wells in 96-multiplates and incubated in the presence of different concentrations, ranging from 250 μ M to 8.4 μ M, of compounds at 37 °C in a 5% CO₂. After 72 h cells were washed twice with PBS to eliminate dead cells. Viable cells were then stained by addition of 50 ml of 0.05% crystal violet solution for 10 min. The wells were rinsed with water and dried and cells were lysed with 100 μ l of methanol. The optical density (OD) was measured at 595 nm using microplate multimode detector Zenyth 3100 and cytotoxicity was calculated using the same formula as for MTT assay.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia for financial support (Grant Nos. 142010, 142008 and 145065) and Project funded by EC under FP7 Research Potential Programme (CPCTAS).

References

- [1] S.D. Schaefer, J.D. Post, L.G. Close, C.G. Wright, Cancer 56 (1985) 1934–1939.
- [2] M.P. Goren, R.K. Wright, M.E. Horowitz, Cancer Chemother. Pharmacol. 18 (1986) 69–73.
- [3] D.S. Alberts, J.K. Noel, Anticancer Drugs 6 (1995) 369–383.
- [4] M. Kartalou, J.M. Essigmann, Mutat. Res. 478 (2001) 23–43.
- [5] M.A. Fuertes, M. Alonso, J.M. Pérez, Chem. Rev. 103 (2003) 645–662.
- [6] M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, Ch.G. Hartinger, B.K. Keppler, Dalton Trans. (2008) 183–194.

- [7] B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluderović, S. Gómez-Ruiz, Ž. Žizak, D. Steinborn, H. Schmidt, R. Paschke, Z.D. Juranić, T.J. Sabo, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 3452–3458.
- [8] E. Budzisz, M. Malecka, B.K. Keppler, V.B. Arion, G. Andrijewski, U. Krajewska, M. Rozalski, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 3728–3735.
- [9] G.N. Kaluderović, H. Schmidt, Ch. Wagner, K. Merzweiler, D. Steinborn, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 72 (2007) 560–568.
- [10] S. Grgurić-Šipka, M.A.A.M. Alshtewi, D. Jeremić, G.N. Kaluderović, S. Gómez-Ruiz, Ž. Žizak, Z. Juranić, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* 73 (2008) 619–630.
- [11] S. Grgurić-Šipka, C.R. Kowol, S. Valiahdi, R. Eichinger, M.A. Jakupec, A. Roller, S. Shova, V.B. Arion, B.K. Keppler, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 2870–2878.
- [12] A. Casini, Ch. Hartinger, Ch. Gabbiani, E. Mini, P.J. Dyson, B.K. Keppler, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 564–575.
- [13] S.Y. Ho, E.R.T. Tiekink, in: M. Gielen, E.R.T. Tiekink (Eds.), *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*, John Wiley & Sons Ltd, 2005, pp. 507–527.
- [14] S. Gómez-Ruiz, G.N. Kaluderović, S. Prashar, D. Polo-Cerón, M. Fajardo, Ž. Žizak, T.J. Sabo, Z.D. Juranić, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1558–1570.
- [15] S. Gómez-Ruiz, G.N. Kaluderović, D. Polo-Cerón, S. Prashar, M. Fajardo, Ž. Žizak, Z.D. Juranić, T.J. Sabo, *Inorg. Chem. Commun.* 10 (2007) 748–752.
- [16] S. Gómez-Ruiz, G.N. Kaluderović, S. Prashar, E. Hey-Hawkins, A. Erić, Ž. Žizak, Z. D. Juranić, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 2087–2096.
- [17] M. Gielen, E.R.T. Tiekink, in: M. Gielen, E.R.T. Tiekink (Eds.), *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*, John Wiley & Sons Ltd, 2005, pp. 421–439.
- [18] N.N. Stone, P.G. Stock, *Eur. Urol.* 41 (2002) 427–433.
- [19] L. Potters, Y. Cao, E. Calugaru, T. Torre, P. Fearn, X.H. Wang, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 50 (2001) 605–614.
- [20] J. Ruiz, J. Lorenzo, L. Sanglas, N. Cutillas, C. Vicente, M.D. Villa, F.X. Avilés, G. López, V. Moreno, J. Pérez, D. Bautista, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 6347–6360.
- [21] E.R. Jamieson, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2467–2498.
- [22] C. Navarro-Ranninger, J.M. Pérez, F. Zamora, V.M. González, J.R. Masaguer, C. Alonso, *J. Inorg. Biochem.* 52 (1993) 37–49.
- [23] S. Ray, R. Mohan, J.K. Singh, M.K. Samantaray, M.M. Shaikh, D. Panda, P. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 15042–15053.
- [24] T. Storr, K.H. Thompson, C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.* 35 (2006) 534–544.
- [25] E. Budzisz, B.K. Keppler, G. Giester, M. Woźniczka, A. Kufelnicki, B. Nawrot, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2004) 4412–4419.
- [26] E. Budzisz, U. Krajewska, M. Rozalski, *Pol. J. Pharmacol.* 56 (2004) 473–478.
- [27] G. Zhao, H. Lin, P. Yu, H. Sun, S. Zhu, X. Su, Y. Chen, *J. Inorg. Biochem.* 73 (1999) 145–149.
- [28] F. Huq, H. Tayyem, P. Beale, J.Q. Yu, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 30–35.
- [29] L. Tušek-Božić, J. Matijašić, G. Bocelli, P. Sgarbotto, A. Furlani, V. Scarcia, A. Papaioannou, *Inorg. Chim. Acta* 185 (1991) 229–237.
- [30] L. Tušek-Božić, J. Matijašić, G. Bocelli, G. Calestani, A. Furlani, V. Scarcia, A. Papaioannou, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 195 (1991).
- [31] T.A.K. Al-Allaf, L.J. Rashan, *Boll. Chim. Farm.* 140 (2001) 205–210.
- [32] G.N. Kaluderović, H. Schmidt, D. Steinborn, T.J. Sabo, in: J.G. Hughes, A. J. Robinson (Eds.), *Inorganic Biochemistry: Research Progress*, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2008, pp. 305–326.
- [33] G.N. Kaluderović, H. Schmidt, S. Schwieger, Ch. Wagner, R. Paschke, A. Dietrich, T. Mueller, D. Steinborn, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 1395–1404.
- [34] T.J. Sabo, G.N. Kaluderović, S.R. Grgurić-Šipka, F.W. Heinemann, S.R. Trifunović, *Inorg. Chem. Commun.* 7 (2004) 241–244.
- [35] G.N. Kaluderović, V.M. Đinović, Z.D. Juranić, T.P. Stanjoković, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 488–496.
- [36] B.B. Krajinović, G.N. Kaluderović, D. Steinborn, H. Schmidt, Ch. Wagner, Ž. Žizak, Z.D. Juranić, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 892–900.
- [37] G.N. Kaluderović, D. Miljković, M. Momčilović, V.M. Đinović, M. Mostarica-Stojković, T.J. Sabo, V. Trajković, *Int. J. Cancer* 116 (2005) 479–486.
- [38] S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanić, J. Radović, D. Miljković, G.N. Kaluderović, T.J. Sabo, V. Trajković, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 1275–1282.
- [39] G.N. Kaluderović, H. Kommera, S. Schwieger, A. Paethanom, M. Kunze, H. Schmidt, R. Paschke, D. Steinborn, *Dalton Trans.* (2009) 10720–10726.
- [40] B.B. Krajinović, G.N. Kaluderović, D. Steinborn, Ch. Wagner, K. Merzweiler, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* 74 (2009) 389–400.
- [41] B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluderović, S. Gómez-Ruiz, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* 74 (2009) 1249–1258.
- [42] Ž.D. Bugarčić, B. Petrović, Z.M. Bugarčić, S.M. Janković, S.V. Janković, G. Lukić, M. Novaković, V. Kostović, S. Popović, P. Djurdjević, D. Baskić, N. Arsenijević, *Toxicol. in Vitro* 22 (2008) 1878–1882.
- [43] B.D. Cheson, *Hematol. Cell Ther.* 42 (2000) 41–47.
- [44] I. Kivekäs, G. Tobin, U. Thunberg, L. Vilpo, C. Sundström, R. Rosenquist, J. Vilpo, *Leuk. Res.* 27 (2003) 337–341.
- [45] I. Kivekäs, L. Vilpo, J. Vilpo, *Leuk. Res.* 26 (2002) 1035–1041.
- [46] W. Su, S. Chang, T. Chen, J. Chen, C. Tsao, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 30 (2000) 562–567.
- [47] L.N. Schoenberg, D.W. Cooke, C.F. Liu, *Inorg. Chem.* 7 (1968) 2386–2393.
- [48] G.N. Kaluderović, T.J. Sabo, *Polyhedron* 21 (2002) 2277–2282.
- [49] D.B. Haydock, T.P.C. Mulholland, *J. Chem. Soc. C* (1971) 2389–2395.
- [50] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.



Original article

Stereospecific ligands and their complexes. Part VII. Synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity of platinum(II) complexes with *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoic acid

Jelena M. Vujić^{a,b}, Goran N. Kaluđerović^{c,d,*}, Marija Milovanović^e, Bojana B. Zmejkovski^c, Vladislav Volarević^e, Danijela Živić^e, Predrag Đurđević^e, Nebojša Arsenijević^e, Srećko R. Trifunović^{a,**}

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

^b Faculty of Agronomy, University of Kragujevac, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia

^c Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Studentski Trg 14, 11000 Belgrade, Serbia

^d Institut für Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Straße 2, 06120 Halle, Germany

^e The Medical Faculty, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2011

Received in revised form

18 July 2011

Accepted 20 July 2011

Available online 27 July 2011

Keywords:

Platinum(II) complexes

Edda-type ligands

Antitumoral activity

Chronic lymphocytic leukemia cells

ABSTRACT

Platinum(II) complexes (**1–4**) with bidentate *N,N'*-ligands, *O,O'*-dialkyl esters (alkyl = ethyl, *n*-propyl, *n*-butyl and *n*-pentyl), of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoic acid were synthesized and characterized by IR, ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy and elemental analysis. DFT calculations were performed for the complexes and it was found that only one diastereoisomer could be formed. Cytotoxic activity of complexes **1–4** was determined against chronic lymphocytic leukemia cells (CLL) and compared to the activity of ligand precursors **L1**·2HCl–**L4**·2HCl and corresponding palladium(II) complexes, [PdCl₂L] (L = **L1–L4**). The complexes were found to exhibit significantly higher antitumor activities than cisplatin on CLL cells. Cytotoxic effect of platinum(II) complexes on CLL cells was higher compared to corresponding palladium(II) complexes. In addition the mode of cell death induced by platinum(II) complexes was determined.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The starting point of the ever increasing field of bioinorganic chemistry of platinum(II) complexes was Rosenberg's accidental discovery of antitumor activity of cisplatin, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] [**1–3**]. As a drug, cisplatin was established against diverse tumor types including testicular, ovarian, head and neck, bladder, esophageal, and small lung cancer cells (SCLC) [**4**]. However, cisplatin exhibits only limited activity against tumors like colon and breast cancer, and in time resistance frequently occurs [**5**]. Also cisplatin does not differentiate between normal and cancerous tissues, resulting in emphasized side effects including potentially fatal renal failure, bone marrow suppression and compromised immunity, severe nausea and toxicity [**6**].

* Corresponding author. Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Studentski Trg 14, 11000 Belgrade, Serbia. Tel.: +49 345 5525678, +381 11 3336735; fax: +49 345 5527028, +381 11 636061.

** Corresponding author. Tel.: +381 34 300263; fax: +381 34 335040.

E-mail addresses: goran@chem.bg.ac.rs, goran.kaluderovic@chemie.uni-halle.de (G.N. Kaluđerović), srecko@kg.ac.rs (S. R. Trifunović).

The next generation of platinum(II)-based drugs used in the clinical treatments includes carboplatin, with similar cytotoxicity but less side effects than cisplatin, and oxaliplatin, with anti-proliferative effects even in cancers insensitive to cisplatin (for example, advanced colorectal tumors [**7**]). Because of the proven cytotoxicity of these platinum(II) compounds, a great number of new platinum complexes are continuously being prepared and tested for antitumor activity [**8–10**].

The synthesis and characterization of platinum(IV) complexes with *NN* bidentate ester ligands, R₂eddp (eddp = ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate; R = *n*-Bu, *n*-Pe; Fig. 1A), have recently been reported [**11**]. The antitumoral investigation was carried out on human adenocarcinoma HeLa cells, human myelogenous leukemia K562 cells and normal immunocompetent cells (PBMC) and when used [PtCl₄(*n*-Bu₂eddp)] cytotoxicity was actually comparable to that of cisplatin. A powerful *in vitro* antitumoral activity of these two compounds was shown on L929 fibrosarcoma and U251 astrocytoma tumor cells [**12**]. The kinetics of the tumor cell death process induced by using these platinum(IV) complexes was considerably faster in comparison to the classical platinum(II)-based drug cisplatin [**13**]. Furthermore, the complexes of

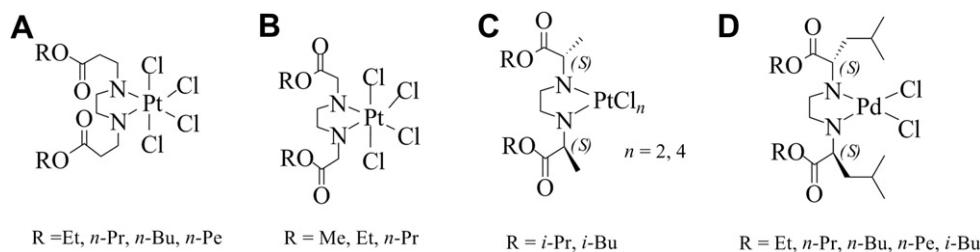


Fig. 1. Complexes of Pt(IV), Pt(II) and Pd(II) with R₂edda-type ligands.

ethylenediamine-*N,N'*-diacetato esters [PtCl₄(R₂edda)] (R = Me, Et, *n*-Pr; Fig. 1B) were tested on human tumor cell lines 1411HP, H12.1 (both testicular germ tumor cells), DLD-1 (colon carcinoma), 518A2 (melanoma), A549 (lung carcinoma) and liposarcoma [14,15]. The complexes showed mild activity against the tested tumor cell lines. Furthermore, the mode of cell death, kinetics, platinum uptake and interaction of [PtCl₄(Et₂eddp)] and [PtCl₄(*n*-Pr₂eddp)] (Fig. 1A) with pBR322 plasmid DNA were studied and compared to that of cisplatin [16].

Chiral ligand precursors [(*S,S*)-H₂R₂eddp]Cl₂ [(*S,S*)-eddp = (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate; R = *i*-Pr and *i*-Bu] and the corresponding dichloroplatinum(II) and tetrachloroplatinum(IV) complexes, [PtCl_{*n*}{(*S,S*)-R₂eddp}] (*n* = 2, 4; Fig. 1C), were tested for *in vitro* antiproliferative activity against tumor cell lines of human adenocarcinoma HeLa, human myelogenous leukemia K562, human malignant melanoma Fem-x and normal immunocompetent cells, i.e., mononuclear PBMC cells in human peripheral blood [17]. High selectivity was observed for the complex [PtCl₄{(*S,S*)-*i*-Pr₂eddp}] against K562 and Fem-x cell lines although it was some 2–4 times less active on the investigated cell lines than [PtCl₄(*n*-Pe₂eddp)]. However, the antitumoral activity of [PtCl₄{(*S,S*)-*i*-Pr₂eddp}] against K562 is half that of [PtCl₄(*n*-Pe₂eddp)], possessing activity comparable to cisplatin, as stated above.

Due to these findings investigations progressed resulting in synthesis of more lipophilic chiral R₂edda-type ligands precursors and their complexes. Thus, four novel *NN* bidentate ligand precursors, (R = Et, *n*-Pr, *n*-Bu, *n*-Pe) of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoic acid dihydrochloride [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂ and the corresponding palladium(II) complexes (Fig. 1D) were prepared and characterized [18]. *In vitro* cytotoxicity of all compounds was determined against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells [18]. The palladium(II) compounds were found to exhibit higher antitumoral activity against CLL cells than cisplatin. The most active compound, with *n*-Pr ester, was found to be remarkably 14 times more active than cisplatin on CLL cells. CLL is convenient for *in vitro* studies as shown with the good correlation between *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* response in CLL patients when chlorambucil is used [19]. The standard first line therapy includes purine analog-based combinations (fludarabine, cladribine, pentostatin) e.g. fludarabine, cyclophosphamide with or without

rituximab (FC or FCR; in physically fit patients) or alkylating agent (chlorambucil in co-morbid patients). The other protocols for CLL treatment include steroids, vincristine, doxorubicine, mitoxantrone and monoclonal antibodies (alemtuzumab), but not cisplatin [20].

Since palladium(II) complexes with these esters provided surprising results, the next step was to change the central metal atom and use platinum(II) in order to investigate the possibility of even greater cytotoxic action.

Herein, the synthesis, characterization and cytotoxic activity against CLL cells of four novel platinum(II) complexes: dichloro(*O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoate)platinum(II), (**1**), dichloro(*O,O'*-dipropyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoate)platinum(II) (**2**), dichloro(*O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoate)platinum(II) (**3**), dichloro(*O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoate)-platinum(II) (**4**) were described.

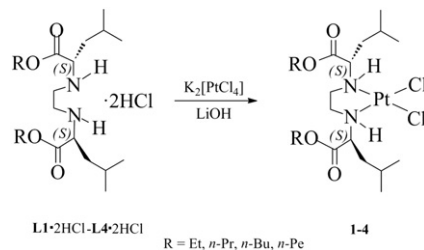
2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Ligand precursors **L1**·2HCl–**L4**·2HCl were obtained by reported procedure [18]. Platinum(II) complexes **1**–**4** were prepared by using appropriate modifications of known methods [13–18,21,22]. Complexes were synthesized by combining aqueous solutions of K₂[PtCl₄] and the corresponding esters (Scheme 1). The complexes are soluble in chloroform and dimethylsulfoxide, but not in water.

2.2. Spectroscopic measurements

The previously reported complexes of R₂edda-type ligands in the IR spectra showed some characteristic absorption for aliphatic esters (COOR strong absorption stretching bands $\nu(\text{C}=\text{O})$: 1710–1745 cm⁻¹ and asymmetric CH₃ stretching vibrations $\nu(\text{CH}_3)$: 2950–2990 cm⁻¹) [18,21]. A similarity is found among the IR spectra of complexes **1**–**4** and those of the previously reported compounds [18,21]. Absorption bands for secondary amino groups for **1**–**4** at 3138, 3144, 3139 and 3131 cm⁻¹, respectively, are assigned to the complexes, suggesting coordination via nitrogen atoms (ligand precursors show only bands for secondary



Scheme 1. Synthesis of the platinum(II) complexes **1**–**4**.

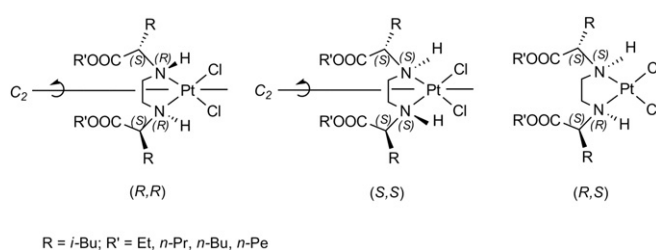


Fig. 2. Diastereoisomers of complexes **1**–**4**.

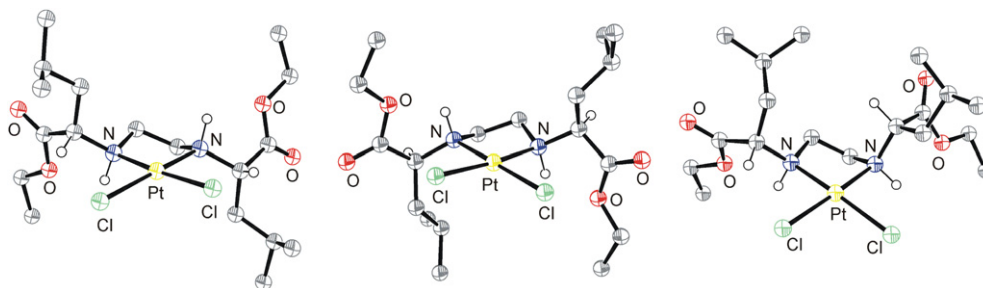


Fig. 3. Calculated structures **1c**: (*R,R*); (*S,S*); (*R,S*) (from left to right) of complex **1**.

ammonium groups; **L1**·2HCl–**L4**·2HCl: $\nu(\text{R}_2\text{NH}_2^+)$ at 3457, 3453, 3455, 3452 cm^{-1} , respectively). All other specific bands are observed at similar positions for corresponding ligand precursors and complexes, thus implying the absence of coordination of any other atom to the platinum(II) ion, as indicated by the following data for complexes **1–4**: $\nu(\text{C}=\text{O})$ at 1737, 1737, 1736, 1735 cm^{-1} , 2960, 2958 cm^{-1} , respectively. In comparison to ligand precursors **L1**·2HCl–**L4**·2HCl, the following bands are observed: $\nu(\text{C}=\text{O})$ at 1737, 1735, 1736, 1736 cm^{-1} , $\nu(\text{C}-\text{O})$ at 1216, 1210, 1209, 1211 cm^{-1} and $\nu(\text{CH}_3)$ at 2975, 2966, 2963, 2960 cm^{-1} .

The expected signals are detected in ^1H and ^{13}C NMR spectra. In the ^1H NMR spectra of **1–4**, hydrogen atoms of secondary amino groups show broad signals at 6.1–6.8 ppm (as compared to **L1**·2HCl–**L4**·2HCl: 9.5–10.5 ppm). Coordination induced shifts in **1–4** spectra (of up to 0.9 ppm) are referenced to the signals of CH_2 protons of the ethylenediamine bridge, clearly showing nitrogen coordination. All methyl protons show signals at 0.86–1.13 ppm for all compounds. In the ^{13}C NMR spectra, ester carbon atom resonances are found at the expected position, at around 170 ppm for all compounds, confirming the fact that oxygen is not a ligating atom and that the ester moiety is conserved.

2.3. Quantum chemical calculations

The coordination of the (*S,S*)-*R*₂edda-type ligands, through $\kappa^2\text{N,N}'$ coordination mode, to the dichloroplatinum(II) moiety yield chiral N atoms and formation of three diastereoisomers may be expected: (*R,R*), (*S,S*) and (*R,S*) (Fig. 2). In order to determine which isomer is formed for **1–4**, quantum chemical calculations were employed. DFT calculations were conducted for the isomers arising from coordination of **L1–L4** to dichloroplatinum(II) fragment.

Table 1

IC_{50} (μM)^a for the 72 h of action of investigated compounds, ligand precursors and palladium(II) complexes [18] on CLL cells, as determined by MTT assay.

Compound	CLL cells
L1 ·2HCl	114.6 ± 27.34
L2 ·2HCl	81.93 ± 15.48
L3 ·2HCl	70.19 ± 19.58
L4 ·2HCl	29.11 ± 2.09
[PdCl ₂ L1]	88.12 ± 25.69
[PdCl ₂ L2]	19.34 ± 6.54
[PdCl ₂ L3]	92.14 ± 11.68
[PdCl ₂ L4]	31.18 ± 7.76
1	22.35 ± 5.62
2	9.85 ± 1.55
3	5.39 ± 1.12
4	10.37 ± 4.78
Cisplatin	263.75 ± 33.36

^a Mean values ± SD (standard deviation) from three experiments.

Calculated structures of complex **1** (defined as **1c**), as example, are shown in Fig. 3. The structures were fully optimized without any symmetry constraints and were found to represent equilibrium structures. The calculated structures showed that (*R,R*) (configuration of N atoms) diastereoisomer appeared to be structurally and synthetically feasible for all complexes. For all calculated structures the (*S,S*) and (*R,S*) diastereoisomers are higher in energy than (*R,R*), $\Delta E_{(S,S)-(R,R)} = 4.3\text{--}4.4$; $\Delta E_{(R,S)-(R,R)} \approx 4.9$ kcal/mol, and formation of these isomers should not be expected. Differences in energy between (*S,S*) and (*R,S*) isomers are 0.5–0.6 kcal/mol (**1c–4c**), being within the error of DFT calculations. The results from NMR spectroscopy (within the sensitivity limits of NMR spectroscopy) show the presence of only one isomer of **1–4** and DFT calculations may indicate that (*R,R*) configuration of the N atoms could be assigned to this isomer. The introduction of one $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ group in aminocarboxylate arm seems to influence the diastereoselectivity in the reaction between $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ and *R*₂edda-type ligands compared to the related compounds [22].

2.4. Cytotoxicity

In order to investigate *in vitro* cytotoxic potential of the platinum(II) complexes various concentrations of complexes were applied to freshly isolated CLL cells and the cell survival was determined after 72 h action by MTT assay. The results on the cytotoxicity of ligand precursors, **L1**·2HCl–**L4**·2HCl, as well as corresponding palladium(II) complexes and cisplatin are included for comparison (Table 1). All complexes showed a dose-dependent cytotoxic effect against CLL cells (Fig. 4).

By coordination of ligands to dichloropalladium(II) moiety, an increase in cytotoxicity has been observed [18]. On the other hand, when palladium(II) is exchanged with platinum(II) ion, higher cytotoxic activity is achieved. The IC_{50} value of platinum(II) complexes **1–4** is 2–17 times lower than that of corresponding palladium(II) complexes. From the investigated platinum(II) complexes the lowest activity was observed for the compound with the shortest ester chain (**1**). Changing Et by *n*-Pr or *n*-Bu group in

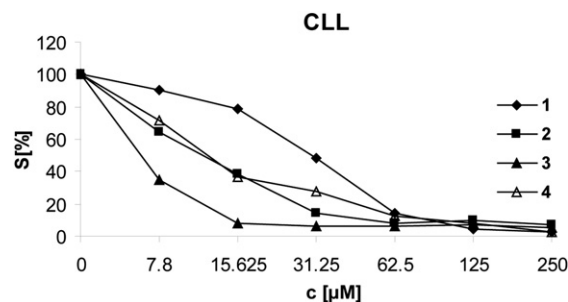


Fig. 4. Representative graph of CLL cell survival after 72 h cell growth in the presence of platinum (II) complexes **1–4**.

ester chain of the platinum(II) complexes (1 → 2 → 3) cytotoxic activity increased. The compound **4** having *n*-Pe group in ester chain showed similar activity as **2** and **3**, when standard deviations are taken in consideration. It is interesting to observe that the increased length of the ligands alkyl side chain is apparently associated with the higher activity of complexes 2–4 relative to complex **1**. Thus, it seems that impact of larger (*S,S*)-R₂eddL ligand coordinated to dichloroplatinum(II) moiety has positive influence on the *in vitro* antitumor activity. The higher activity was noted for compound **3** with the *n*-Bu group in ester chain. It may be possible that the highest activity of **3** could be associated with the higher intercellular accumulation what was found for the similar complexes recently reported [23]. Activity of **1–4** toward CLL cells was significantly higher in comparison to cisplatin. Low activity of cisplatin against CLL cells is in agreement with earlier investigations [24–28]. Some structure–activity relationships could be observed, which is in accordance with previous studies [22]: the *in vitro* activity is increasing in the following order $L \cdot 2HCl \leq [PdCl_2L] < [PtCl_2L]$ ($L = L1-L4$).

2.5. Mode of cell death induced with complexes 1–4 on CLL cell line

The mode of cell death was determined by flow cytometric analysis of treated cells stained with Annexin V FITC and 7-AAD. Results showed that all platinum(II) complexes induced apoptosis in CLL cells (Figs. 5 and 6). The CLL cells were treated for 24 h with 25, 125 and 250 μM concentration of complexes 1–4. The dose-dependent cytotoxic effect of platinum(II) complexes against CLL cells was also confirmed by this assay. At a concentration of 25 μM, complexes 1 and 2 had low impact on the cells and most of them were viable (**1**: 78%; **2**: 71%). On the other hand, complexes **3** and **4** with the same concentration had greater influence on CLL cells and induced larger number of apoptotic cells (Fig. 5). The higher applied concentration (125 μM) of complexes **1** and **2** induced superior apoptotic effect with approximately the same number of cells in early and late apoptosis (**1**: ~29, **2**: 40) (Fig. 6). Most cells treated with the same concentration of complexes **3** and **4** were in late apoptosis (Fig. 6). All four complexes at a concentration of 250 μM were highly toxic for cells. The concentration of 250 μM of **1–4** induced a high percentage of necrotic cells (Annexin V (–); 7-AAD (+)), with the complete loss of plasma membrane.

3. Conclusions

Four novel platinum(II) complexes **1–4** were synthesized and characterized by IR, ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy and elemental analysis. DFT calculations indicate that the most stable isomer with (*R,R*) configuration of N atoms could explain diastereoselectivity of the reaction between K₂[PtCl₄] and L1·2HCl – L4·2HCl ligand precursors. All investigated compounds were tested for *in vitro* cytotoxic activity against chronic lymphocytic leukemia cells (CLL). *In vitro* activity is increasing in following order $L \cdot 2HCl \leq [PdCl_2L] < [PtCl_2L]$ ($L = L1-L4$). The platinum(II) complexes exhibit higher activity than cisplatin. The most active compound is complex **3** (IC₅₀ = 5 ± 1 μM). Compounds **1–4** are able to induce apoptosis on CLL cells with concentrations up to 125 μM, but they are highly toxic at concentration of 250 μM.

4. Experimental

4.1. Materials and measurements

Dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoic acid dihydrochloride, (L1·2HCl–L4·2HCl), were prepared as previously reported [17,18,29]. K₂[PtCl₄] was obtained

by Merck and used without further purification. Infrared spectra were recorded by a Perkin–Elmer FTIR 31725-X and Perkin–Elmer Spectrum One FTIR spectrophotometer using the KBr pellet technique (4000–400 cm⁻¹). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded by a Varian “Gemini 2000” (200 MHz) spectrometer in CDCl₃ using tetramethylsilane as internal standard. Elemental analyses for C, H and N were performed by a Vario EL III C, H, N, S Elemental Analyzer.

4.2. Synthesis of the platinum(II) complexes, 1–4

K₂[PtCl₄] (0.1 g, 0.24 mmol) was dissolved in 10 mL water and equimolar amount of the L1·2HCl·H₂O (0.105 g, 0.24 mmol), L2·2HCl·H₂O (0.109 g, 0.24 mmol), L3·2HCl·H₂O (0.118 g, 0.24 mmol) or L4·2HCl·H₂O (0.125 g, 0.24 mmol) esters were added. During 2 h of stirring, 10 mL of water solution of LiOH (0.0115 g, 0.48 mmol) was added in small portions to the reaction mixture. If necessary, acetone was added to prevent it from sticking. For several days at room temperature, pale yellow precipitates of the complexes **1–4** were obtained, filtered off, washed with water, and dried on air. Numbering of carbon atoms is shown in Fig. 7.

1·(CH₃)₂CO: Yield 0.065 g, 44.46%. Anal. calcd. for C₁₈H₃₆N₂O₄Cl₂Pt·(CH₃)₂CO: C, 37.73; H, 6.33; N, 4.19%. Found: C, 37.40; H, 5.84; N, 4.52%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0.97 (d, 12H, ³J_{H,H} = 4.40, C^{6,7}H₃), 1.29 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6.80, C⁹H₃), 1.70–2.10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 2.38 (m, 4H, C¹H₂), 3.01 (q, 2H, C²H), 4.29 (m, 4H, C⁸H₂), 6.15–6.75 (broad s, 2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13.9 (C⁹H₃), 22.3 (C^{6,7}H₃), 25.7 (C⁵H), 30.3 (C⁴H₂), 51.7 (C¹H₂), 61.6 (C²H), 68.2 (C⁸H₂), 171.5 (COOR). IR (cm⁻¹): 3138, 2959, 2872, 1737, 1469, 1369, 1241, 1195, 1136, 1025, 934, 853, 775.

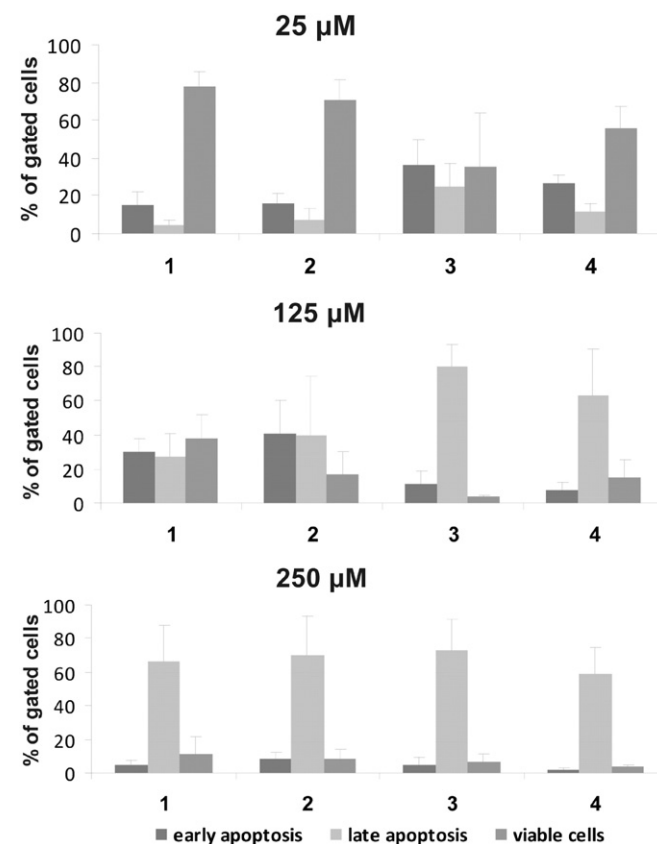


Fig. 5. Percentages of early apoptotic, late apoptotic and viable cells after 24 h of treatment with platinum (II) complexes **1–4** (concentrations: 25, 125 and 250 μM) determined by flow cytometry. Data from the three experiments.

2: Yield 0.067 g, 43.95%. Anal. calcd. for $C_{20}H_{40}N_2O_4Cl_2Pt$: C, 37.62; H, 6.31; N, 4.39%. Found: C, 37.87; H, 5.95; N, 4.29%. 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.93 (d, 12H, $^3\delta_{H,H} = 4.82$, $C^{6,7}H_3$), 1.03 (t, 6H, $^3\delta_{H,H} = 7.34$, $C^{10}H_3$), 1.60–2.10 (m, 6H, C^4H_2 , C^5H), 1.71 (m, 4H, C^9H_2), 2.41 (m, 4H, C^1H_2), 3.48 (q, 2H, C^2H), 4.15 (m, 4H, C^8H_2), 6.10–6.70 (broad s, 2H, NH). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 10.4 ($C^{10}H_3$), 21.9 ($C^{6,7}H_3$), 23.7 (C^9H_2), 25.8 (C^5H), 29.6 (C^4H_2), 51.3 (C^1H_2), 60.3 (C^2H), 67.2 (C^8H_2), 171.5 (COOR). IR (cm^{-1}): 3144, 2961, 2874, 1737, 1468, 1385, 1238, 1193, 1137, 1057, 932, 839, 743.

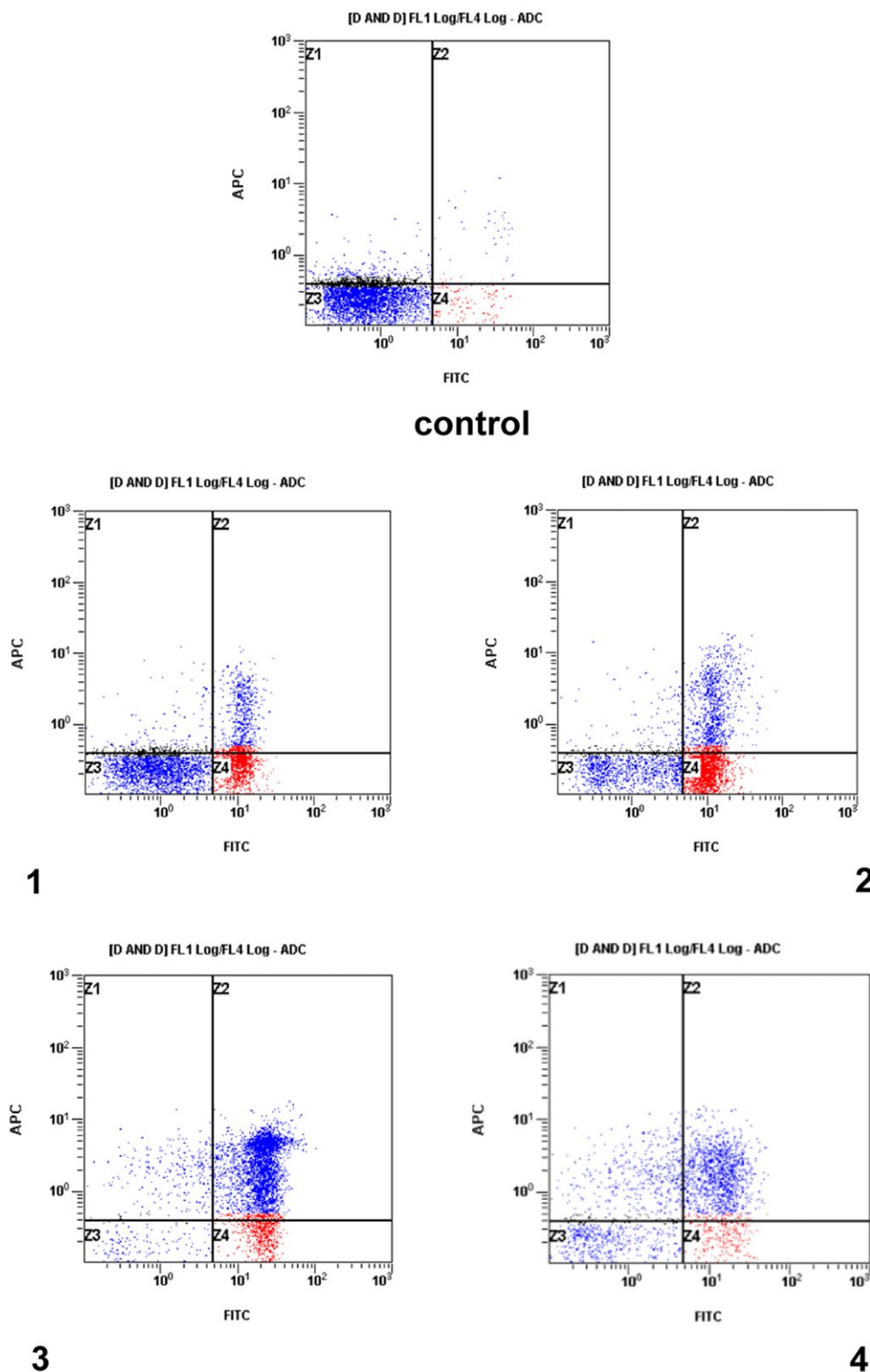


Fig. 6. Representative FACS dot plots show control cells and cells treated with 125 μM platinum complexes stained with annexin V and 7-AAD. Z2 region represents cells in late stages of apoptosis (blue), Z4 region represents cells in early stages of apoptosis (red). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

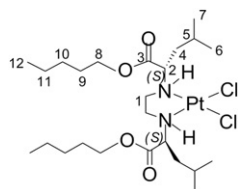


Fig. 7. Numbering of compounds used for NMR data.

3: Yield 0.058 g, 36.63%. Anal. calcd. for $C_{22}H_{44}N_2O_4Cl_2Pt$: C, 39.64; H, 6.65; N, 4.20%. Found: C, 39.37; H, 6.70; N, 4.16%. **1H NMR** (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.90 (d, 12H, $^3\delta_{H,H} = 4.40$, $C^{6,7}H_3$), 0.98 (t, 6H, $^3\delta_{H,H} = 6.60$, $C^{11}H_3$), 1.34 (m, 4H, $C^{10}H_2$), 1.57–2.04 (m, 6H, C^4H_2 , C^5H), 1.66 (m, 4H, C^9H_2), 3.05 (m, 4H, C^1H_2), 4.13 (m, 2H, C^2H), 4.24 (t, 4H, C^8H_2), 6.10–6.70 (m, 2H, NH). **^{13}C NMR** (50 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 13.5 ($C^{11}H_3$), 18.9 ($C^{6,7}H_3$), 21.5 ($C^{10}H_2$), 23.1 (C^5H), 24.9 (C^9H_2), 30.2 (C^4H_2), 38.9 (C^1H_2), 60.8 (C^2H), 66.5 (C^8H_2), 168.9 (COOR). **IR** (cm^{-1}): 3139, 2960, 2872, 1736, 1468, 1388, 1244, 1195, 1135, 1061, 938, 846, 737.

4·2H₂O: Yield 0.056 g, 32.24%. Anal. calcd. for $C_{24}H_{48}N_2O_4Cl_2Pt \cdot 2H_2O$: C, 39.45; H, 7.17; N, 3.83%. Found: C, 39.34; H, 7.31; N, 4.18%. **1H NMR** (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.91 (t, 6H, $^3\delta_{H,H} = 6.20$, $C^{12}H_3$), 1.00 (d, 12H, $^3\delta_{H,H} = 4.80$, $C^{6,7}H_3$), 1.33 (m, 8H, $C^{10,11}H_2$), 1.63–1.95 (m, 6H, C^4H_2 , C^5H), 1.75 (m, 2H, C^9H), 3.08 (m, 4H, C^1H_2), 4.12 (m, 2H, C^2H), 4.23 (t, 4H, C^8H_2), 6.10–6.80 (broad s, 2H, NH). **^{13}C NMR** (50 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 13.9 ($C^{12}H_3$), 21.7 ($C^{6,7}H_3$), 22.2 ($C^{11}H_2$), 23.7 ($C^{10}H_2$), 25.1 (C^9H), 25.9 (C^5H), 28.1 (C^4H_2), 51.3 (C^1H_2), 61.0 (C^2H), 65.8 (C^8H_2), 171.5 (COOR). **IR** (cm^{-1}): 3131, 2958, 2871, 1735, 1467, 1398, 1244, 1193, 1137, 1046, 967, 729.

4.3. Computational details

Geometry optimizations were performed by the Gaussian 03 package [30]. All structures were optimized using the MPW1PW91 functional [31]. The SDD basis set for all atoms was employed in the calculations [32,33]. All systems have been optimized without symmetry restrictions. The resulting geometries were characterized as equilibrium structures by the analysis of the force constants of normal vibrations. Supplementary data associated with quantum chemical calculations can be obtained from the authors upon request.

4.4. In vitro studies

4.4.1. Preparation of drug solutions

Platinum complexes were dissolved in DMSO at a concentration of 20 mM and filtered through a 0.22 mm Millipore filter. These stock solutions were diluted in culture medium immediately before use. The nutrient medium used was RPMI-1640 supplemented with streptomycin (100 mg/mL), penicillin (100 IU/mL) and 10% fetal bovine serum (FBS). MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide was dissolved (5 mg/mL) in a phosphate buffer saline having a pH of 7.2, and filtered through the 0.22 mm Millipore filter before use. All reagents were purchased from Sigma Chemicals.

4.4.2. Cell preparation

Chronic lymphocytic leukemia cells (CLL) were isolated from the heparinized blood samples of patients with chronic lymphocytic leukemia who had not received therapy during the previous six months. CLL cells were separated by single step continuous density-gradient centrifugation with Histopaque1077 (Sigma). The cells were washed three times with culture medium RPMI 1640 and finally resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10%, 100 IU/

mL penicillin G and 100 mg/mL streptomycin. Cell number and viability were determined by trypan blue staining. The study was approved by the Ethics Committee of the Clinical Center "Kragujevac". Patients signed the informed consent forms.

4.4.3. Cytotoxicity assay (MTT)

The cytotoxic effects of the four platinum complexes and ligands on CLL lymphocytes were determined using MTT colorimetric technique. MTT assay is suitable for the detection of alterations in cellular metabolism or proliferation. It evaluates the mitochondrial dehydrogenase activity and depends on the percent of live cells [34,35]. MTT is converted to formazan by living cells, and the color intensity is directly proportional to the mitochondrial activity. Briefly, CLL cells (5×10^5 cells/100 μ L) were placed in individual wells in 96-multiplates in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and incubated in the presence of 100 μ L of platinum complexes in various concentrations (0–250 μ M) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 24 and 72 h. Upon incubation, multiplates were pelleted, supernatant was removed, MTT solution (5 mg/mL in PBS, 10 μ L) was added to each well and the plates were incubated for additional 4 h. The multiplates were pelleted, the cell-free supernatants were suctioned off, and DMSO (150 μ L) was added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm using microplate multimode detector Zenyth 3100. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula: % cytotoxicity = $100 - ((TS - BGO) - E) / (TS - BGO) \times 100$ where "BGO" stands for background of medium alone, "TS" for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and "E" for experimental well. IC50 values were calculated from dose–response curves using representative triplicate assays.

4.4.4. Apoptosis detection assay (Annexin V/7-AAD)

Apoptotic cells were detected using The Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Beckman Coulter). Annexin V-FITC is a fluorescent probe which binds to phosphatidylserine. At the onset of apoptosis, phosphatidylserine, normally found on the internal part of the plasma membrane becomes translocated to the external portion of the membrane and becomes available to bind to the annexin V-FITC. 7-AAD bind to the cellular DNA in cells where the cell membrane has been totally compromised [36]. It is considered that annexin V-FITC (–); 7-AAD (–) cells are viable, annexin V-FITC (+); 7-AAD (–) cells are in early stages of apoptosis and annexin V-FITC (+); 7-AAD (+) cells are in late stages of apoptosis. After 24 h of treatment with platinum complexes at concentrations 25, 125 and 250 μ M cells (0.5×10^6 /mL) were collected, washed in PBS and resuspended in ice cold binding buffer. AnnexinV–FITC and 7-AAD were added to each sample and incubated in the dark for 15 min. Twenty thousand events were analyzed on FC500 Beckman Coulter flow cytometer and percentage of early and late apoptotic cells was determined using and CXP Cytometer software.

Acknowledgments

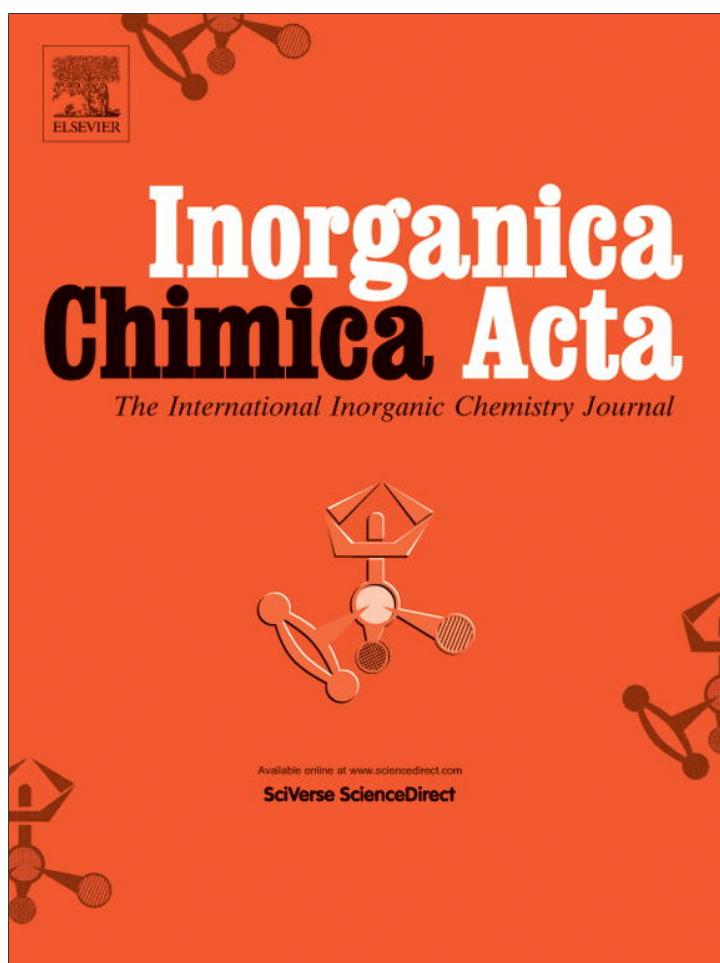
The authors are grateful to the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia for financial support (Grant Nos. 175069, 172016 and 172035) and Project funded by EC under FP7 Research Potential Programme (CPCTAS).

References

- [1] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, Nature 205 (1965) 698–699.
- [2] B. Rosenberg, L. Van Camp, E.B. Grimley, A.J. Thomson, J. Biol. Chem. 242 (1967) 1347–1352.
- [3] B. Rosenberg, Platinum Met. Rev. 15 (1971) 42–51.
- [4] T. Boulikas, M. Vougiouka, Oncol. Rep. 10 (2003) 1663–1682.
- [5] C.A. Rabik, M.E. Dolan, Cancer Treat. Rev. 33 (2007) 9–23.

- [6] A.W. Prestayko, J.C. D'Aoust, B.F. Issell, S.T. Crooke, *Cancer Treat. Rev.* 6 (1979) 13–39.
- [7] L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007) 573–584.
- [8] J. Reedijk, *Chem. Commun.* (1996) 801–806.
- [9] G. Natile, M. Coluccia, *Coord. Chem. Rev.* 216 (2001) 383–410.
- [10] M. Viale, S. Minetti, M. Ottone, R. Lerza, B. Parodi, I. Pannacchilli, *Anti-Cancer Drugs* 14 (2003) 163–166.
- [11] T.J. Sabo, G.N. Kaluderović, S.R. Grgurić-Šipka, F.W. Heinemann, S.R. Trifunović, *Inorg. Chem. Commun.* 7 (2004) 241–244.
- [12] G.N. Kaluderović, D. Miljković, M. Momčilović, V.M. Đinović, M. Mostarica-Stojković, T.J. Sabo, V. Trajković, *Int. J. Cancer* 116 (2005) 479–486.
- [13] S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanić, J. Radović, Dj. Miljković, G.N. Kaluderović, T.J. Sabo, V. Trajković, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 1275–1282.
- [14] G.N. Kaluderović, H. Schmidt, S. Schwieger, Ch. Wagner, R. Paschke, A. Dietrich, T. Mueller, D. Steinborn, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 1395–1404.
- [15] G.N. Kaluderović, H. Schmidt, D. Steinborn, T.J. Sabo, in: J.G. Hughes, A.J. Robinson (Eds.), *Inorganic Biochemistry: Research Progress*, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2008, pp. 305–326.
- [16] G.N. Kaluderović, H. Kommera, S. Schwieger, A. Paethanom, M. Kunze, H. Schmidt, R. Paschke, D. Steinborn, *Dalton Trans.* (2009) 10720–10726.
- [17] B.B. Krajinović, G.N. Kaluderović, D. Steinborn, H. Schmidt, Ch. Wagner, Ž. Žizak, Z.D. Juranić, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 892–900.
- [18] J.M. Vujić, M. Cvijović, G.N. Kaluderović, M. Milovanović, B.B. Zmejovski, V. Volarević, N. Arsenijević, T.J. Sabo, S.R. Trifunović, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3601–3606.
- [19] L.C. Panasci, J.P. Paiement, G. Christodouloupoulos, A. Belenkov, A. Malapetsa, R. Aloyz, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 454–461.
- [20] B. Eichhorst, M. Hallek, M. Dreyling, *Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*, *Ann. Oncol.* 20 (Suppl. 4) (2009) iv102–iv104.
- [21] B.B. Krajinović, G.N. Kaluderović, D. Steinborn, Ch. Wagner, K. Merzweiler, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* 74 (2009) 389–400.
- [22] B.B. Zmejovski, G.N. Kaluderović, S. Gómez-Ruiz, Ž. Žizak, D. Steinborn, H. Schmidt, R. Paschke, Z.D. Juranić, T.J. Sabo, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 3452–3458.
- [23] J.M. Lazić, Lj. Vučićević, S. Grgurić-Šipka, K. Janjetović, G.N. Kaluderović, M. Misirkić, M. Gruden-Pavlović, D. Popadić, V. Trajković, R. Paschke, T.J. Sabo, *ChemMedChem* 5 (2010) 881–889.
- [24] Ž.D. Bugarić, B. Petrović, Z.M. Bugarić, S.M. Janković, S.V. Janković, G. Lukić, M. Novaković, V. Kostović, S. Popović, P. Djurdjević, D. Baskić, N. Arsenijević, *Toxicol. Vitro* 22 (2008) 1878–1882.
- [25] B.D. Cheson, *Hematol. Cell Ther.* 42 (2000) 1269–1286.
- [26] I. Kivekäs, G. Tobin, U. Thunberg, L. Vilpo, C. Sundström, R. Rosenquist, J. Vilpo, *Leuk. Res.* 27 (2003) 337–341.
- [27] I. Kivekäs, L. Vilpo, J. Vilpo, *Leuk. Res.* 26 (2002) 1035–1041.
- [28] W. Su, S. Chang, T. Chen, J. Chen, C. Tsao Jpn, *J. Clin. Oncol.* 30 (2000) 562–567.
- [29] L.N. Schoenberg, D.W. Cooke, C.F. Liu, *Inorg. Chem.* 7 (1968) 2386–2393.
- [30] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, *GAUSSIAN 03, Revision C.02*. Gaussian, J.A. Pople, Inc., Wallingford CT, 2004.
- [31] C. Adamo, V. Barone, *Chem. Phys. Lett.* 274 (1997) 242–250.
- [32] T.H. Dunning Jr., P.J. Hay, *Modern Theoretical Chemistry*, vol. 3, Plenum, New York, 1976, 1–28.
- [33] D. Andrae, U. Häusermann, M. Dolg, H. Stoll, H. Preus, *Theor. Chem. Acc.* 77 (1990) 123–141.
- [34] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [35] D. Gerlier, N. Thomasset, *J. Immunol. Methods* 94 (1986) 57–63.
- [36] Y. Shounan, X. Feng, P.J. O'Connell, *J. Immunol. Methods* 217 (1998) 61–70.

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



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

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

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

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

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



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Inorganica Chimica Acta

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

Stereospecific ligands and their complexes. Part X: Synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity of platinum(IV) complexes with *O,O'*-dialkyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoate ligands

Jelena M. Vujić^{a,b}, Goran N. Kaluđerović^{c,*}, Bojana B. Zmejtkovski^d, Marija Milovanović^e, Vladislav Volarević^e, Nebojša Arsenijević^e, Tatjana P. Stanojković^f, Srećko R. Trifunović^{a,*}

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

^b Faculty of Agronomy, University of Kragujevac, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia

^c Institut für Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Straße 2, 06120 Halle, Germany

^d Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Studentski Trg 14, 11000 Belgrade, Serbia

^e The Medical Faculty, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^f Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2011

Received in revised form 1 March 2012

Accepted 24 March 2012

Available online 11 April 2012

Keywords:

Platinum(IV) complexes

EDDA-type ligands

Antitumoral activity

Cell cycle

Apoptosis

ABSTRACT

Synthesis of four new platinum(IV) complexes **1–4**, with bidentate *N,N'*-ligand precursors *O,O'*-dialkyl esters (alkyl = ethyl, *n*-propyl, *n*-butyl and *n*-pentyl), of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoic acid dihydrochloride [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂ were reported. The composition of the novel platinum complexes was determined by elemental analysis and characterizations were performed by infrared, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. DFT calculations indicate formation one (*R,R*) from three possible diastereoisomers (*S,S*; *R,S*). Complexes **1–4** displayed potent anticancer activity. IC₅₀ values range from 0.74 to 70 μM, against tested cell lines, except for CLL cells. The antitumoral activity of **2–4** was found to be considerably stronger to Jurkat and K562. Cell cycle analysis of cell lines showed G1 arrest in the presence of analyzed complexes.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Many platinum complexes have been synthesized not only in order to investigate their chemistry but also to identify novel complexes with improved antitumoral properties in comparison to the drug cisplatin [1,2]. The antitumor activity of cisplatin has been proved over many years in the treatment of various types of cancer [3–8]. Platinum(II) based anticancer drug cisplatin has been considered as one of the most effective chemotherapeutic agents, displaying clinical activity against a wide variety of solid tumors [9–11].

There has been a special interest in platinum(IV) complexes, as their greater inertness in comparison with platinum(II) complexes [12,13] may allow for the oral administration of the drugs, reduce the toxicities associated with platinum-based chemotherapy and decrease the amount of the complex lost or deactivated through reactions on the way to the target site [2,8]. One of the likely candidates for clinical application is the first orally available platinum(IV)-containing anticancer drug satraplatin (JM216) [14].

The selection of satraplatin for clinical studies was based on its potent *in vitro* growth-inhibitory properties against several tumor cell types, and its *in vivo* oral anticancer activity that was largely comparable to that of administered cisplatin or carboplatin in a variety of murine tumor models [8,15]. Satraplatin entered clinical trials in 1992 and is now undergoing phase 3 evaluation [8,15].

Earlier, cytotoxicity of platinum(IV) complexes with ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoate (eddp) ligand, *trans*-[Pt(eddp)Cl₂] and *trans*-[Pt(eddp)Br₂] (configuration index OC-6-13; Fig. 1A) has been investigated [15,16] against A2780 and A2780cisR cells and found to be low. In order to increase the antitumor action ONNO-tetradetrate ligands were substituted with *NN*-bidentates by esterification of the H₂eddp·2HCl. Synthesis and characterization of platinum(IV) complexes with *NN* bidentate esters, R₂eddp (R = *n*-Bu, *n*-Pe; Fig. 1B) ligands was reported [17]. Furthermore, the complexes of ethylenediamine-*N,N'*-diacetate esters [PtCl₄(R₂edda)] (R = Me, Et, *n*-Pr; Fig. 1C) were tested on human tumor cell lines 1411HP, H12.1 (both testicular germ cell tumors), DLD-1 (colon carcinoma), 518A2 (melanoma), A549 (lung carcinoma) and liposarcoma [18,19].

Herein the synthesis, characterization and antiproliferative activity against human breast cancer (MDA-MB-361 and MDA-MB-453), T-leukemia (Jurkat), chronic myelogenous leukaemia

* Corresponding authors. Tel.: +49 345 5525678; fax: +49 345 5527028 (G.N. Kaluđerović), tel.: +381 34 300263; fax: +381 34 335040 (S.R. Trifunović).

E-mail addresses: goran.kaluderovic@chemie.uni-halle.de, goran@chem.bg.ac.rs (G.N. Kaluđerović), srecko@kg.ac.rs (S.R. Trifunović).

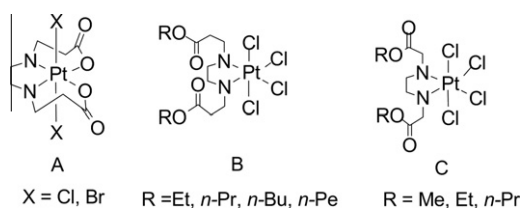


Fig. 1. Complexes of Pt(IV) with edda/R₂edda-type ligands.

(K562), colorectal cancer (SW480) cell lines and CLL cells, of four novel platinum(IV) complexes: tetrachlorido[O,O'-dialkyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoate]platinum(IV) (alkyl = ethyl, **1**; n-propyl, **2**; n-butyl, **3** and n-pentyl, **4**) are described. The cell cycle distribution was determined by cytofluorometric analysis.

2. Experimental

2.1. Materials and measurements

Potassium hexachloroplatinate(IV) was obtained from Merck and used without further purification. (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoic acid dihydrochloride [(S,S)-H₄eddl]Cl₂, was prepared as previously reported [20]. Synthesis of O,O'-dialkyl esters of [(S,S)-H₄eddl]Cl₂, **L1**·2HCl–**L4**·2HCl were prepared using the esterification reaction previously described [21,22].

Elemental analyses for C, H and N were performed by a Vario EL III C, H, N, S Elemental Analyzer. Infrared spectra were recorded by a Perkin–Elmer FTIR 31725-X and Perkin–Elmer Spectrum One FTIR spectrophotometer using the KBr pellet technique (4000–400 cm⁻¹). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded by a Varian “Gemini 2000” (200 MHz) spectrometer in CDCl₃ using tetramethylsilane as internal standard.

2.2. Chemical synthesis

2.2.1. Synthesis of the platinum(IV) complexes, 1–4

K₂[PtCl₆] (0.1 g, 0.206 mmol) was dissolved in 10 ml water and equimolar amount of the **L1**·2HCl·H₂O (0.086 g, 0.206 mmol), **L2**·2HCl·H₂O (0.092 g, 0.206 mmol), **L3**·2HCl·H₂O (0.097 g, 0.206 mmol) or **L4**·2HCl·H₂O (0.103 g, 0.206 mmol) esters were added. The reaction mixture was heated on a steam bath for 12 h during with period 10 cm³ of water solution of LiOH (0.0099 g, 0.412 mmol) was added in small portions. The solution was then filtered and evaporated on a steam bath until precipitation starts. After cooling, the precipitate was filtered off, washed thoroughly with water, and air dried. Numeration of atoms is presented in Fig. 2.

1: Yield 87.52 mg, 62.42%. Anal. Calc. for C₁₈H₃₆N₂O₄Cl₄Pt: C, 31.73; H, 5.33; N, 4.11%. Found: C, 31.40; H, 5.50; N, 4.42%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.97 (d, 12H, ³J_{H,H} = 5.60, C^{6,7}H₃), 1.29 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7.20, C⁹H₃), 1.60–2.10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 2.97 (m, 4H, C¹H₂), 3.46 (q, 2H, C²H), 4.29 (m, 4H, C⁸H₂). 6.65–6.95 (broad s, 2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 13.8 (C⁹H₃), 21.4 (C^{6,7}H₃),

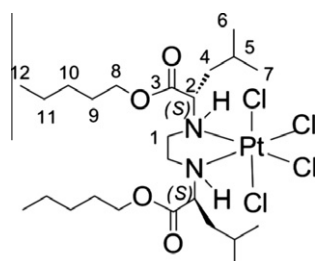


Fig. 2. Numbering of complexes used for NMR data.

23.6 (C⁵H), 38.9 (C⁴H₂), 50.4 (C¹H₂), 62.2 (C²H), 63.1 (C⁸H₂), 171.9 (COOR). IR (cm⁻¹): 3132, 2961, 2872, 1731, 1470, 1371, 1329, 1247, 1198, 1126, 1027, 909, 852, 744.

2·H₂O: Yield 92.43 mg, 61.75%. Anal. Calc. for C₂₀H₄₀N₂O₄Cl₄Pt·H₂O: C, 33.02; H, 5.82; N, 3.85%. Found: C, 32.84; H, 5.70; N, 4.03%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.95 (d, 12H, ³J_{H,H} = 7.80, C^{6,7}H₃), 1.01 (t, 6H, ³J_{H,H} = 4.60, C¹⁰H₃), 1.60–2.10 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1.71 (m, 4H, C⁹H₂), 3.02 (m, 4H, C¹H₂), 3.46 (q, 2H, C²H), 4.22 (m, 4H, C⁸H₂), 6.10–6.70 (broad s, 2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 10.4 (C¹⁰H₃), 21.6 (C^{6,7}H₃), 23.2 (C⁹H₂), 24.9 (C⁵H), 25.9 (C⁴H₂), 38.7 (C¹H₂), 59.9 (C²H), 68.9 (C⁸H₂), 168.8 (COOR). IR (cm⁻¹): 3133, 2962, 2874, 1734, 1472, 1395, 1329, 1254, 1197, 1128, 1058, 933, 744.

3: Yield 98.74 mg, 65.07%. Anal. Calc. for C₂₂H₄₄N₂O₄Cl₄Pt: C, 35.83; H, 6.01; N, 3.80%. Found: C, 35.75; H, 5.53; N, 4.00%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.91 (d, 12H, ³J_{H,H} = 5.60, C^{6,7}H₃), 0.98 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6.20, C¹¹H₃), 1.38 (m, 4H, C¹⁰H₂), 1.58–2.04 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1.67 (m, 4H, C⁹H₂), 3.05 (m, 4H, C¹H₂), 4.24 (m, 2H, C²H), 4.54 (t, 4H, C⁸H₂), 6.60–6.90 (m, 2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 13.5 (C¹¹H₃), 18.9 (C^{6,7}H₃), 21.4 (C¹⁰H₂), 23.1 (C⁵H), 24.9 (C⁹H₂), 30.1 (C⁴H₂), 39.1 (C¹H₂), 62.3 (C²H), 66.8 (C⁸H₂), 172.1 (COOR). IR (cm⁻¹): 3129, 2960, 2872, 1731, 1466, 1390, 1330, 1250, 1196, 1126, 1064, 937, 834, 743.

4: Yield 94.52 mg, 60.01%. Anal. Calc. for C₂₄H₄₈N₂O₄Cl₂Pt: C, 37.66; H, 6.32; N, 3.66%. Found: C, 37.27; H, 6.43; N, 3.89%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.91 (t, 6H, ³J_{H,H} = 6.60, C¹²H₃), 1.00 (d, 12H, ³J_{H,H} = 4.80, C^{6,7}H₃), 1.33 (m, 8H, C^{10,11}H₂), 1.63–1.95 (m, 6H, C⁴H₂, C⁵H), 1.68 (m, 2H, C⁹H), 2.77 (m, 4H, C¹H₂), 4.16 (m, 2H, C²H), 4.20 (t, 4H, C⁸H₂), 6.10–6.80 (broad s, 2H, NH). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 13.9 (C¹²H₃), 22.1 (C^{6,7}H₃), 22.2 (C¹¹H₂), 22.3 (C¹⁰H₂), 24.6 (C⁹H₂), 27.8 (C⁵H), 28.0 (C⁴H₂), 39.5 (C¹H₂), 52.3 (C²H), 66.9 (C⁸H₂), 170.0 (COOR). IR (cm⁻¹): 3231, 2959, 2871, 1739, 1467, 1401, 1228, 1193, 1133, 1046, 961, 729.

2.3. Computational details

Geometry optimizations were performed by the GAUSSIAN 03 package [23]. All structures were optimized using the MPW1PW91 functional [24]. The SDD basis set for all atoms was employed in the calculations [25,26]. All systems have been optimized without symmetry restrictions. The resulting geometries were characterized as equilibrium structures by the analysis of the force constants of normal vibration. Supplementary data associated with quantum chemical calculations can be obtained from the authors upon request.

2.4. Biological experiments

2.4.1. Complexes and solutions

Stock solutions of investigated complexes, were prepared in DMSO at concentrations of 20 mM and afterwards they were diluted with complete nutrient medium (RPMI-1640 without phenol red) supplemented with 3 mM L-glutamine, 100 µg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin, 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), and 25 mM: 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazino]ethanesulfonic acid (Hepes) adjusted to pH 7.2 by bicarbonate solution. RPMI-1640, FBS, Hepes, and L-glutamine were products of Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. The MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) was dissolved (5 mg/ml) in phosphate buffer saline pH 7.2 and filtered (0.22 µm) before use. The RPMI 1640 cell culture medium, fetal bovine serum (FBS), and MTT, were purchased from Sigma Chemical Company, USA.

2.4.2. Cell culture

Human breast cancer (MDA-MB-361 and MDA-MB-453), T-leukemia (Jurkat), chronic myelogenous leukaemia (K562) cells were grown in RPMI-1640 medium (Sigma). Human colorectal cancer

(SW480) cells were routinely maintained in DMEM medium (Gibco). Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine, and penicillin–streptomycin (Sigma). CLL lymphocytes were separated from the heparinized blood samples of patients with chronic lymphocytic leukemia and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS).

2.4.3. Treatment of cell lines

Target cells MDA-MB-361 (7000 cells/well), MDA-MB-453 (3000 cells/well), Jurkat 15000 cells/well, K562 (5000 cells/well) and SW480 cells (5000 cells/well) were seeded into wells of a 96-well flat-bottomed microtitre plate. Twenty-four hours later, after the cell adherence, five different concentrations of investigated complexes were added to the wells, except for the control cells to which a nutrient medium was added only. Final concentrations achieved in treated wells were 5, 10, 25, 50 and 100 μM ; exceptionally, for SW 480 cells were 1.60, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μM . The final concentration of DMSO solvent never exceeded 0.5%, which was non-toxic to the cells. Especially, complexes were applied to the suspension of Jurkat and K562 cells 2 h after the cell seeding. All concentrations were set up in triplicate. Nutrient medium with corresponding concentrations of investigated complexes, but without cells, was used as a blank, also in triplicate. The cultures were incubated for 72 h.

2.4.4. Determination of cell survival

The effect of the four platinum complexes on cancer cell survival was determined by the microculture tetrazolium test (MTT) according to Mosmann [27] with modification by Ohno and Abe [28], 72 h after addition of the complexes, as described earlier. Briefly, 20 μL of MTT solution (5 mg/mL phosphate-buffered saline) was added to each well. Samples were incubated for a further 4 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO_2 (v/v). Then 100 μL of 100 g/L sodium dodecyl sulfate was added to extract the insoluble product formazan resulting from conversion of the MTT dye by viable cells. The number of viable cells in each well was proportional to the intensity of the absorbance of light, which was read in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader at 570 nm. The absorbance (A) at 570 nm was measured 24 h later. To determine cell survival (%), the A of a sample with cells grown in the presence of various concentrations of the investigated complexes was divided by the control optical density (the A of control cells grown only in nutrient medium) and multiplied by 100. It was implied that the A of the blank was always subtracted from the A of the corresponding sample with target cells. IC_{50} was defined as the concentration of an agent inhibiting cell survival by 50% compared with a vehicle-treated control. As a positive control, cisplatin was used. All experiments were done in triplicate.

2.4.5. Patients with CLL, cell isolation and cell survival detection

Samples from 3 patients with CLL were studied. Primary leukemic lymphocytes from patients diagnosed with CLL according to the World Health Organization classification were isolated by Ficoll/Hypaque sedimentation (Seromed) and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Informed consent was obtained from three patients in accordance with the Declaration of Helsinki and the Institutional Ethics Committee of the Hospital Clinic (Kragujevac, Serbia). The cytotoxic effects of the four platinum complexes on CLL lymphocytes and SW480 cell line were determined using MTT colorimetric technique [29]. A 100 μL of CLL cells suspension (5×10^5 cells/well) were placed in 96-multiplates and incubated in the presence of 100 μL of platinum complexes and cisplatin in various concentrations (0–100 μM) at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a 5% CO_2 incubator for 72 h. Upon incubation, supernatant was removed. MTT solution was added. After additional 4 h of incubation medium with MTT was removed and DMSO (150 μL)

with glycine buffer (20 μL) was added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 570 nm.

2.4.6. Flow cytometry analysis

Cellular DNA content and cell distribution were quantified by flow cytometry using propidium iodide (PI). Cells (3×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates and incubated with or without $2 \times \text{IC}_{50}$ concentration of investigated complexes for 24 h. After treatment, the cells were collected by trypsinization, and fixed in ice-cold 70% ethanol at -20°C overnight. After fixation, the cells were washed in PBS and pellets obtained by centrifugation was treated with RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37 $^{\circ}\text{C}$ temperature for 30 min and then incubated with PI (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for at least 30 min. DNA content and cell cycle distribution were analyzed using a Becton Dickinson FAC-Scan flow cytometer. Flow cytometry analysis was performed using a CellQuestR (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), on a minimum of 1×10^4 cells per sample [30].

3. Results and discussion

3.1. Chemistry

Complexes were synthesized by combining aqueous solutions of $\text{K}_2[\text{PtCl}_6]$ and the corresponding ester dihydrochlorides (*S,S*)- $\text{R}_2\text{eddl} \cdot 2\text{HCl}$ (Scheme 1). The resulting complexes are soluble in chloroform and dimethylsulfoxide, but not in water.

3.2. Spectroscopic measurements

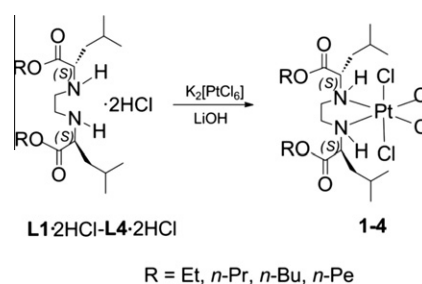
The IR spectrum shows specific absorption bands $\nu(\text{C}=\text{O})$ at 1731, 1734, 1731, 1739 cm^{-1} (strong), (typical absorption for aliphatic esters), $\nu(\text{C}-\text{O})$ at 1198, 1197, 1196, 1193 cm^{-1} and $\nu(\text{CH}_3)$ at 2962, 2961, 2960, 2959 cm^{-1} , respectively.

The expected chemical shifts for such class of platinum(IV) complexes are observed in ^1H and ^{13}C NMR spectra. In the ^1H NMR spectra of **1–4**, hydrogen atoms of secondary amino groups show broad signals at 6.1–6.9 ppm. Coordination-induced shifts in spectra of **1–4** (of up to 0.9 ppm) are referenced to the signals of CH_2 protons of the ethylenediamine bridge, clearly implying nitrogen coordination to platinum(IV). All methyl protons are observed between 0.86 and 1.13 ppm for all complexes.

In the ^{13}C NMR spectra, ester carbon atom resonances are found at the expected position, at around 170 ppm for all complexes (at the similar positions of the ligand precursors), confirming that oxygen is not a ligating atom and that ester bond is preserved. For the complexes, NMR spectroscopy confirmed their constitution.

3.3. Quantum chemical calculations

(*S,S*)- R_2eddl ligand by coordination to platinum(IV) ion additionally form chiral centers on nitrogen atoms and might yield three diastereoisomers: (*R,R*), (*R,S*) and (*S,S*) (Fig. 3). However,



Scheme 1. Synthesis of the platinum(IV) complexes **1–4**.

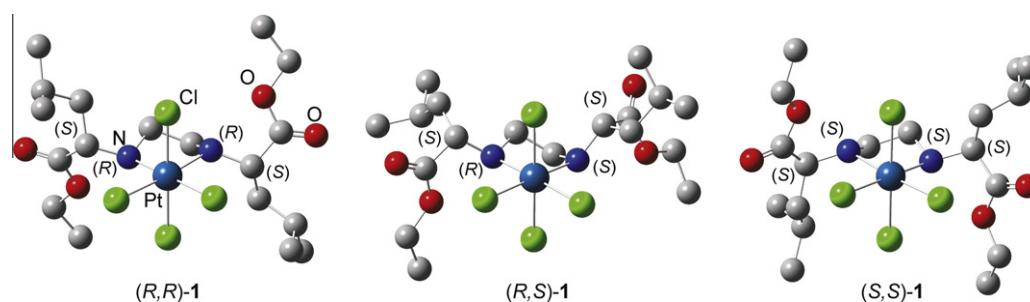


Fig. 3. Equilibrium structures of diastereoisomers of complex **1** (hydrogen atoms are omitted because of clarity).

Table 1

Energies of the calculated structures relative to the most stable (*R,R*)-*N,N* configured diastereoisomer.

Complex	<i>R,R</i>	<i>R,S</i>	<i>S,S</i>
1	0.00	3.21	8.14
2	0.00	3.18	8.15
3	0.00	2.91	8.03
4	0.00	3.02	8.18

our efforts to crystallize the platinum(IV) complexes were unsuccessful and in order to circumvent this problem, density functional theory (DFT) calculations were carried out for diastereoisomers of **1–4**. In case of all complexes the most stable is found to be (*R,R*)-*N,N*-configured isomer by 2.9–3.2 and 8.0–8.2 kcal/mol than (*R,S*) and (*S,S*) isomers (Table 1), respectively. Results obtained from DFT calculations are consistent with NMR spectra in which only one diastereoisomer was observed.

3.4. Biological evaluation

3.4.1. In vitro antitumor activity

The complexes **1–4** were evaluated for their cytotoxic activity against human breast cancer (MDA-MB-361 and MDA-MB-453),

Table 2

Concentrations of complexes **1–4** that decreased by 50% cell survival, IC_{50} (μM)^a after 72 h of incubation, in MDA-MB 361, MDA-MB-453, Jurkat, K562, SW480 and CLL cells.

Compound	MDA-MB-361	MDA-MB-453	Jurkat	K562	SW480	CLL cells
1	70.06 ± 1.19	44.98 ± 1.19	25.51 ± 2.19	22.53 ± 3.41	5.09 ± 4.44	>100
2	29.14 ± 0.51	16.42 ± 0.58	9.61 ± 0.87	8.51 ± 1.67	2.32 ± 0.18	96.56 ± 10.59
3	25.95 ± 1.26	23.19 ± 1.48	9.93 ± 0.42	12.68 ± 1.39	3.95 ± 0.76	63.70 ± 8.88
4	24.03 ± 0.21	22.75 ± 3.81	11.41 ± 0.68	13.15 ± 0.58	0.74 ± 0.20	>100
cisplatin	14.74 ± 0.36	3.75 ± 0.12	7.79 ± 0.83	8.52 ± 0.09	31.92 ± 13.86	>100

^a Mean value ± SD.

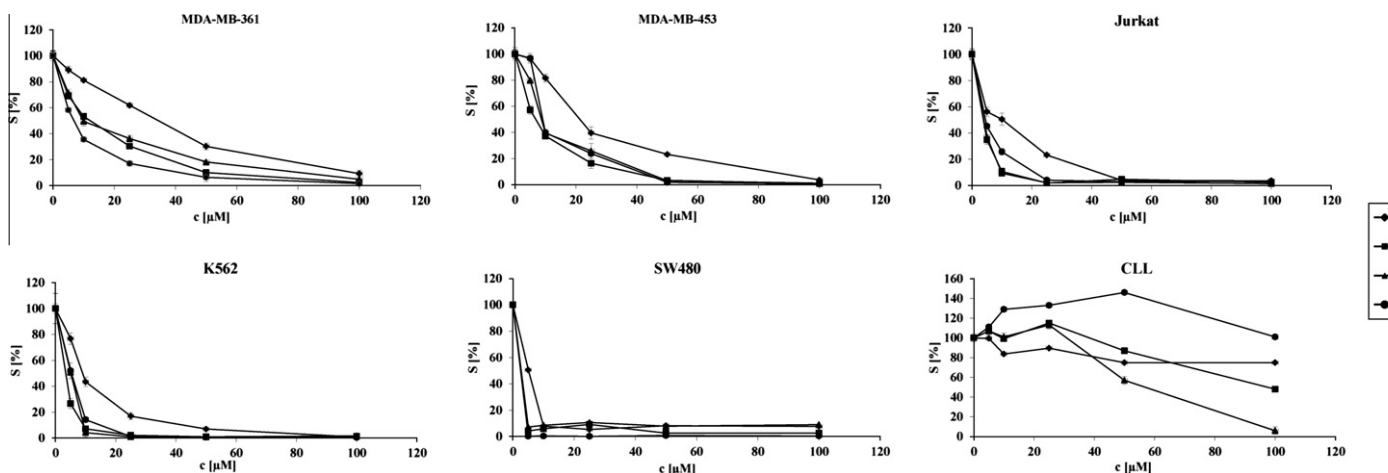


Fig. 4. Representative graph of MDA-MB-361, MDA-MB-453, Jurkat, K562, SW480 and CLL cells survival after 72 h cell growth in the presence of platinum(IV) complexes **1–4**.

T-leukemia (Jurkat), chronic myelogenous leukemia (K562), colorectal cancer (SW480) cells and CLL lymphocytes along with cisplatin as referent cytostatic. The IC_{50} values of the studied complexes are presented in Table 2, while Fig. 4 depicts the cytotoxic curves from MTT assay showing the survival of cell grown for 72 h in the presence of increasing concentrations of complexes **1–4**. Results showed that the complexes demonstrated excellent cytotoxic activity, IC_{50} values range from 0.74 to 70 μM against all the tested cell lines, except for CLL cells. Complexes **2–4** exhibited stronger cytotoxicity against Jurkat and K562 cell lines, thus to be very similar to that observed for cisplatin. On the other hand slightly lower activity of complexes **1–4** toward MDA-MB-361 (resistant toward widely used cytostatic drugs such as paclitaxel, doxorubicin and 5-fluorouracil) [31] and MDA-MB-453 cells was noticed. Nevertheless, it is evident that complex **1** shows a two to three times lower cytotoxicity of **2, 3** and **4**. The cytotoxicity increases upon introduction of *n*-propyl (**2**), *n*-butyl (**3**) or *n*-pentyl (**4**) groups. On the other hand, no significant difference in the activity of complexes **2–4** was noted.

Furthermore, obtained data indicate that compound **1–4** exhibited stronger cytotoxicity in cisplatin resistant SW480 type cell line. Nevertheless, the obtained values are comparable to those reported for other platinum(IV) complexes [32]. Contrary, our

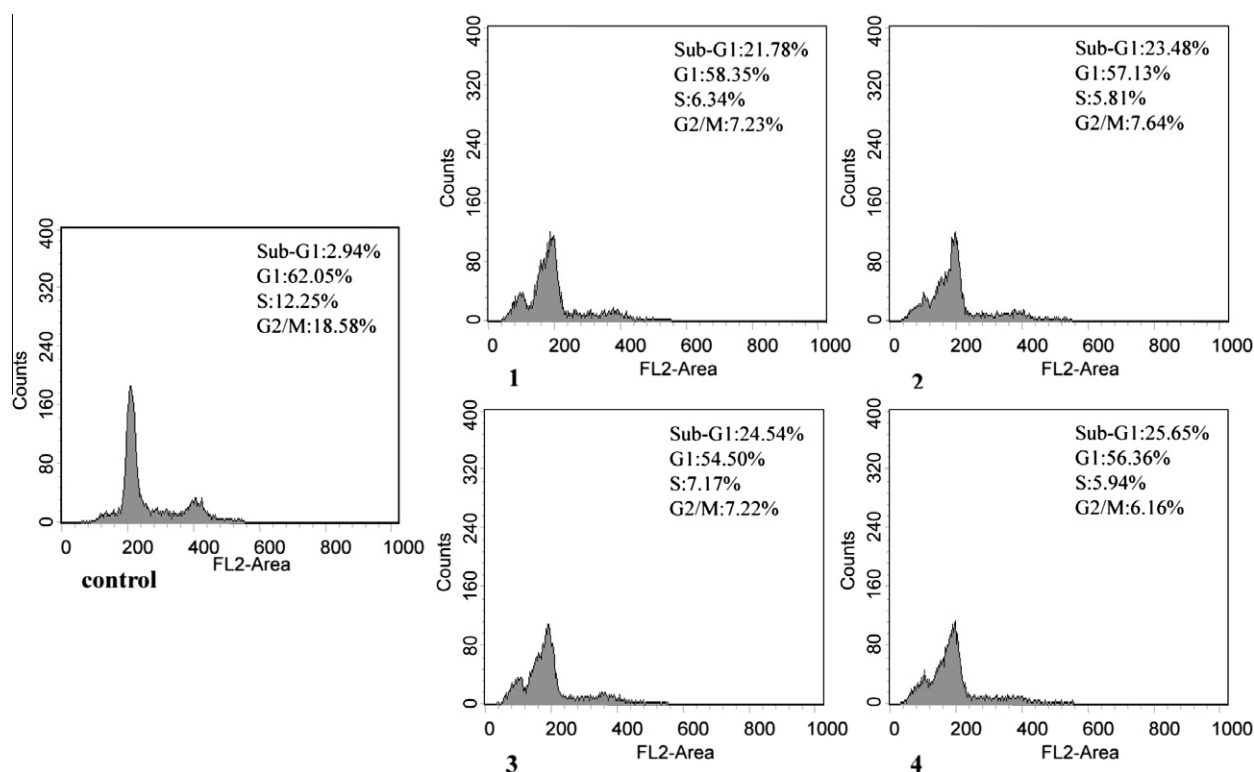


Fig. 5. Cell cycle distribution after 24 h of continuous action of platinum(IV) complexes **1–4** in MDA-MB-361 cell lines (as an example).

Table 3
Effect of platinum(IV) complexes **1–4** on cell cycle phase distribution.

	Apoptotic cells sub-G1	G1	S	G2/M
<i>MDA-MB-361</i>				
Control	2.94	62.05	12.25	18.58
1	21.78	58.35	6.34	7.23
2	23.48	57.13	5.81	7.64
3	24.54	54.50	7.17	7.22
4	25.65	56.36	5.94	6.16
<i>MDA-MB-453</i>				
Control	2.22	50.10	16.79	21.80
1	17.11	44.84	18.23	13.98
2	16.35	44.55	18.69	14.37
3	18.21	39.31	18.24	17.58
4	14.88	45.82	18.46	15.50
<i>Jurkat</i>				
Control	1.69	52.67	12.60	29.05
1	12.42	51.55	16.27	14.93
2	28.93	41.28	13.62	10.21
3	28.56	45.23	13.53	6.91
4	25.54	42.90	14.52	11.29
<i>K562</i>				
Control	2.87	51.33	20.18	20.72
1	13.28	58.17	14.62	7.42
2	24.99	49.93	13.72	4.51
3	18.23	53.96	15.34	4.87
4	15.96	57.20	14.87	4.91

Effect of compounds on cell cycle phase distribution. MDA-MB-361, MDA-MB-453, Jurkat and K562 cell lines were exposed to compounds ($2 \times IC_{50}$) for 24 h and then collected for analysis of cell cycle phase distribution using flow cytometry. Percentage of cells under different stages of cell cycles (sub-G1, G1, S, G2/M) is shown.

preliminary data on the CLL cells isolated from three patients show that complexes do not induce a significant cytotoxic effect on CLL cells. Surprisingly corresponding palladium(II) complexes exhibited higher antiproliferative activity against same cells (32.1 ± 7.8 – 92.1 ± 11.7) [20] than complexes **1–4**.

3.4.2. Cell cycle analysis

As a result of the observed cytotoxic action of investigated cells (with exception CLL cells), it is tested whether complexes **1–4** would alter or interrupt the cell cycle status of malignant cells. Cell cycle was assessed by cytofluorimetric analysis, using propidium iodide to label DNA and results are given in Fig. 5 and Table 3. After treatment of MDA-MB-361, MDA-MB-453, Jurkat and K562 cells with **1–4** ($2 \times IC_{50}$), the cells were harvested and analyzed with a FACScalibur flow cytometer. It is observed that *in vitro* cytotoxic activity was accompanied by an important sub-G1 fraction of all cell lines after treatment with complexes. Namely, treatment of **1–4** leads to an increase in sub-G1 phase along with concomitant decrease in S and G2/M, supporting a G1 phase arrest. Thus, indicating that the tested compounds might induce apoptosis. In general, the cytotoxicity of platinum compounds in cancer cells can be related to the inhibition of DNA synthesis or to saturation of the cellular capacity to repair Pt-DNA adducts. Covalent bindings between platinum complexes and DNA decrease rate of replication, transcription and following translation. DNA can be additionally destroyed in secondary process by free radicals, which are also responsible for apoptosis induction after treatment with platinum compounds [33]. Our data suggest that the G1 phase cell cycle arrest, observed in treated cell lines, most likely involved engagement of the G1 checkpoint that is mediated by p53. It seems that **1–4** complexes act in this manner.

4. Conclusion

Four novel platinum(IV) complexes **1–4** were synthesized and characterized by IR, 1H NMR and ^{13}C NMR spectroscopy and elemental analysis. All investigated complexes were tested for *in vitro* cytotoxic activity against panel of malignant cell lines. All complexes showed significant cytotoxic activity, against all cell lines tested, except for CLL cells. In the cell growth inhibition of Jurkat and K562 cells compounds **2**, **3** and **4** showed a cytotoxic

potential comparable to cisplatin. *In vitro* antitumor activity was accompanied by an important apoptotic fraction of tested cell lines after treatment with complexes **1–4**.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia for financial support (Grant Nos. 175069, 172016, 172035 and 175011) and Project funded by EC under FP7 Research Potential Program (CPCTAS).

References

- [1] E. Wong, C.M. Giandomenico, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2451–2466.
- [2] G. Natile, M. Coluccia, *Coord. Chem. Rev.* 383 (2001) 216–217.
- [3] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* 205 (1965) 698–699.
- [4] B. Rosenberg, L. Van Camp, E.B. Grimley, A.J. Thomson, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 1347–1352.
- [5] B. Rosenberg, *Platinum Met. Rev.* 15 (1971) 42–51.
- [6] G. Natile, M. Coluccia, *Coord. Chem. Rev.* 216 (2001) 383–410.
- [7] J. Reedijk, *Chem. Commun.* 7 (1996) 801–806.
- [8] M.D. Hall, T.W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 49–67.
- [9] Z.H. Siddik, *Oncogene* 22 (2003) 7265–7279.
- [10] M. Galanski, V.B. Arion, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 2078–2089.
- [11] C.X. Zhang, S.J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 481–489.
- [12] L.R. Kelland, in: B. Lippert (Ed.), *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of Leading Anticancer Drug*, VHC/Wiley-VCH, Weinheim, 1999, pp. 497–521.
- [13] T.W. Hambley, A.R. Battle, G.B. Decon, E.T. Lawrenz, G.D. Fallon, B.M. Gatehouse, L.K. Webster, S. Rainone, *J. Inorg. Biochem.* 77 (1999) 3–12.
- [14] G.N. Kaluderović, G.A. Bogdanović, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* 55 (2002) 817–822.
- [15] L.R. Kelland, *Expert. Opin. Invest. Drugs* 9 (2000) 1373–1382.
- [16] T.J. Sabo, G.N. Kaluderović, D. Poleti, Lj. Karanović, A. Boccarelli, F. Cannito, G. Natile, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1378–1384.
- [17] T.J. Sabo, G.N. Kaluderović, S.R. Grgurić-Šipka, F.W. Heinemann, S.R. Trifunović, *Inorg. Chem. Commun.* 7 (2004) 241–244.
- [18] G.N. Kaluderović, H. Schmidt, S. Schwiager, Ch. Wagner, R. Paschke, A. Dietrich, T. Mueller, D. Steinborn, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 1395–1404.
- [19] G.N. Kaluderović, H. Schmidt, D. Steinborn, T.J. Sabo, in: J.G. Hughes and A.J. Robinson (Eds.), *Inorganic Biochemistry, Research Progress*, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2008, pp. 305–326.
- [20] L.N. Schoenberg, D.W. Cooke, C.F. Liu, *Inorg. Chem.* 7 (1968) 2386–2393.
- [21] J.M. Vujić, M. Cvijović, G.N. Kaluderović, M. Milovanović, B.B. Zmekovski, V. Volarević, N. Arsenijević, T.J. Sabo, S.R. Trifunović, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3601–3606.
- [22] B.B. Krajčinović, G.N. Kaluderović, D. Steinborn, H. Schmidt, Ch. Wagner, Ž. Žižak, Z.D. Juranić, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 892–900.
- [23] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Allaham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, *GAUSSIAN 03, Revision C.02*, Gaussian, Pople, J.A. Inc., Wallingford CT, 2004.
- [24] C. Adamo, V. Barone, *Chem. Phys. Lett.* 274 (1997) 242–250.
- [25] T.H. Dunning Jr., P.J. Hay, in: *Modern Theoretical Chemistry*, vol. 3, Plenum, New York, 1976, pp. 1–28.
- [26] D. Andrae, U. Häusermann, M. Dolg, H. Stoll, H. Preus, *Theor. Chem. Acc.* 77 (1990) 123–141.
- [27] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [28] M. Ohno, T. Abe, *J. Immunol. Methods* 145 (1991) 199–203.
- [29] J.A. Plumb, in: *Cancer Cell Culture, Methods and Protocols. Cell Sensitivity Assays, The MTT Assay. Methods in Molecular Medicine*, vol. 88, 2003, pp. 165–169.
- [30] R.H. Clothier, *Methods Mol. Biol.* 43 (1995) 109–118.
- [31] C. Liedtke, J. Wang, A. Tordai, W.F. Symmans, G.N. Hortobagyi, L. Kiesel, K. Hess, K.A. Baggerly, K.R. Coombes, L. Pusztai, *Breast Cancer Res. Treat.* 121 (2010) 301–309.
- [32] H. Varbanov, S.M. Valiahdi, A.A. Legin, M.A. Jakupec, A. Roller, M. Galanski, B.K. Keppler, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 5456–5464.
- [33] T. Drewna, A. Wozniak, G. Drewna, *Med. Sci. Monit.* 7 (2001) 680–686.



ACCEPTED MANUSCRIPT

This is an early electronic version of an as-received manuscript that has been accepted for publication in the Journal of the Serbian Chemical Society but has not yet been subjected to the editing process and publishing procedure applied by the JSCS Editorial Office.

Please cite this article as: J. M. Vujić, S. Garsia-Granda, L. Menéndez-Taboada, S. B. Novaković, S. R. Trifunović, *J. Serb. Chem. Soc.* (2011), doi: 10.2298/JSC120208041V

This “raw” version of the manuscript is being provided to the authors and readers for their technical service. It must be stressed that the manuscript still has to be subjected to copyediting, typesetting, English grammar and syntax corrections, professional editing and authors’ review of the galley proof before it is published in its final form. Please note that during these publishing processes, many errors may emerge which could affect the final content of the manuscript and all legal disclaimers applied according to the policies of the Journal.

Stereospecific ligands and their complexes. Part XIV. Crystal structure of *O,O'*-dipropyl ester of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride

JELENA M. VUJIĆ¹, SANTIAGO GARCIA-GRANDA², LAURA MENÉNDEZ-TABOADA², SLAĐANA B. NOVAKOVIĆ³ and SREČKO R. TRIFUNOVIĆ^{4*#}

¹Faculty of Agronomy, University of Kragujevac, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia,

²University of Oviedo, Faculty of Chemistry, Spain, ³Vinča Institute of Nuclear Sciences, Condensed Matter Physics Laboratory, University of Belgrade, PO Box 522, 11001 Belgrade, Serbia and ⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

(Received 8 February, revised 24 April 2012)

Abstract: Bidentate *N,N'*-ligand precursor, *O,O'*-dipropyl ester of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride, [(*S,S*)-H₄eddl]Cl₂, was prepared and its crystal structure is given herein. It crystallizes in a *P4*₂ space group of tetragonal crystal system with *a* = 16.5620 (2) Å, *b* = 16.5620 (2) Å, *c* = 5.2240 (1) Å and *Z* = 2.

Keywords: crystal structure, tetragonal crystal system; *O,O'*-dipropyl ester of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride.

INTRODUCTION

R₂edda-type esters (edda = ion of ethylene-diamine-*N,N'*-diacetic acid) are of interest as ligands for a variety of opportunities for coordination of metal ions. Recently, synthesis and characterization of platinum(II) and platinum(IV) complexes with *N,N'*-bidentate R₂eddp (R₂eddp = *O,O'*-dialkyl-ethylene-diamine-*N,N'*-di-3-propionate) and halide ligands was reported.^{1–6} The work was extended by synthesizing chiral branched-chain esters, (*S,S*)-R₂eddp, and the corresponding platinum(II/IV) complexes.⁷ Furthermore, the most of the prepared have been used for the synthesis of the corresponding palladium(II) complexes.^{8–10} Some of complexes, specially platinum(II) and platinum(IV) with *NN* bidentates, have demonstrated significant antitumoral activity.^{2–7}

* Corresponding author. E-mail: srecko@kg.ac.rs

Serbian Chemical Society member.

doi: 10.2298/JSC120208041V

Although a large number of R₂edda-type esters has been synthesized up to now we were able to obtain the single crystals suitable for X-ray analysis only in the case of O,O'-diisopropyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoate.⁷

The preparation and spectral characterization O,O'-dipropyl ester of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride was published earlier.⁸ This paper reports single crystal X-ray structure determination of O,O'-dipropyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride, [(S,S)-H₂Pr₂eddl]Cl₂.

EXPERIMENTAL

Chemistry

All reagents were of grade purity. (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride, [(S,S)-H₄eddl]Cl₂, was prepared as previously reported.¹¹

Synthesis of O,O'-dipropyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride, [(S,S)-H₂Pr₂eddl]Cl₂

The ester was prepared using the esterification reaction previously described.⁸ The ester was recrystallized from the warm propanol and after cooling at room temperature and standing for several days, crystals suitable for X-ray measurements were obtained.

X-Ray crystal structure determination

The diffraction data from a selected single crystal of [(S,S)-H₂Pr₂eddl]Cl₂ were collected at room temperature on Oxford Diffraction Xcalibur Gemini S diffractometer equipped with CuK α radiation ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$). Data were processed with CrysAlis software¹² and corrected for absorption by analytical numeric method.¹³ Crystal structure was solved by direct methods, using Sir2002¹⁴ and refined using SHELXL.¹⁵ The refinement of the crystal structure revealed high isotropic displacement parameters for the carbon atoms of the propyl ester group indicating a severe disorder of this fragment. All attempts to model the disorder were unsuccessful and the temperature factors of the propyl ester C atoms were refined as isotropic. All H atoms were placed at geometrically calculated positions with the D–H distances fixed to 0.98, 0.97 and 0.96 \AA from methine, methylene and methyl C(sp³) respectively and 0.90 \AA from N atom. The corresponding isotropic displacement parameters of the hydrogen atoms were equal to 1.2 U_{eq} and 1.5 U_{eq} of the parent C and N atoms. Geometrical calculations were performed with PARST97¹⁶ and molecular graphics with ORTEP¹⁷ and Mercury.¹⁸ The details of the X-ray structural analysis are given in Table I.

RESULTS AND DISCUSSION

The title compound (Fig. 1) crystallizes in the chiral space group *P*4₂ with one-half of the molecule representing the asymmetric unit. The molecular halves are related by twofold axis which is passing through the mid-point of the central C10–C10ⁱ bond (*i* = $-x + 1, -y, z$). The charge of the protonated ester molecule is balanced by chloride anions. The selected geometrical parameters are given in Table II. According to the values of the torsion angles C7–C6–C5–N1, C6–C5–N1–C10, C5–N1–C10–C10ⁱ and N1–C10–C10ⁱ–N1ⁱ which are ranging from $-167.2(9)$ to $-178.8(8)^\circ$ the conformation of the aliphatic chain can be described as fully extended. The atoms of the C5/C6/C7/N1/C10 fragment are

co-planar within 0.037(6) Å. Similar extended conformation of the chain as well as the co-planarity of the constituent atoms have been observed in previously reported R₂edda-type esters.^{7,9,10} In the present compound the dihedral angle between the C5/C6/C7/N1/C10 best planes from the two molecular halves is equal to 32.6(5)° indicating a slight mutual twist through the molecular center. Although severe disorder prevents the clear localization of the C atoms of the propyl ester group one can observe that the planar ester fragment C5/C4/O1/O2 (rms deviation of fitted atoms is 0.01) takes a significant turn with respect to the C5/C6/C7/N1/C10 plane. The dihedral angle formed between the corresponding best planes is equal to 74.1(3)°.

The molecular conformation is stabilized by two rather weak and bent intramolecular hydrogen bonds formed between the diamine and isopropyl C–H groups as donors and the oxygens of the ester group as acceptors (Table III). The crystal packing is, as expected, dominated by the hydrogen bonds formed between the charged components, the protonated amino nitrogen and the Cl anion. Both available N–H fragments of the amino group are utilized in the hydrogen bonding. These two rather strong N–H...Cl interactions (Table III) connect the molecules into the ribbon. In addition to N–H...Cl hydrogen bonds the molecules are interconnected by C5–H...O1 interaction (Figure 2a). Although regarded as a secondary interaction the C5–H...O1 displays a favorable directionality (Table III). Owing to the twofold symmetry the molecules generate the identical set of interactions running in the opposite direction and reinforcing the connection between them. In general, two molecules inside the ribbon are connected with: four N–H...Cl interactions forming a motif described by Etter's graphset notation²⁰ as R⁴₂(14) and two C–H...O interactions forming a larger ring-like motif described as R²₂(18) (Fig 2a). The interactions link the parallel molecules in *c* direction; however taking into account the molecule length and its extended conformation, one can observe that the formed molecular ribbon expands through the entire *ac* plane. The described N–H...Cl hydrogen bonds, which engage the most polar parts of the molecules, are the main non-covalent interactions in this crystal structure. The similar contacts, leading to the similar molecular arrangement, were also observed in the crystal packing of two previously reported R₂edda·2HCl esters.^{7,9} In the present crystal structure the ribbons related by fourfold axis direct their propyl ester fragments each to another, maximizing the nonbonding C–H contacts. As a result one can observe a formation of three-dimensional porous structure, with the parallel non-polar channels extended in *c* direction (Fig 2b).

CONCLUSION

O,O'-dipropyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid was crystallized in the form of the dihydrochloride in a *P4*₂ space group of

tetragonal crystal system. The crystal form and the crystal packing are determined by strong intermolecular N1–H1A...C11, N1–H1B...C11 and C5–H5...O1 hydrogen bonds.

Supplementary data. CCDC 863095 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12, Union Road, Cambridge CB21EZ, UK; fax: +44 1223 336033).

Acknowledgements. The authors are grateful for the financial support to the Ministry of Education and Science (Project No. 172016).

ИЗВОД

СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНИ ЛИГАНДИ И ЊИХОВИ КОМПЛЕКСИ XIV. КРИСТАЛНА СТРУКТУРА *O,O'*-ДИПРОПИЛ ЕСТРА (*S,S*)-ЕТИЛЕНДИАМИН-*N,N'*-ДИ-2-(4-МЕТИЛ)-ПЕНТАНСКЕ КИСЕЛИНЕ ДИХЛОРИДРАТА

ЈЕЛЕНА М. ВУЈИЋ¹, SANTIAGO GARCIA-GRANDA², LAURA MENÉNDEZ-TABOADA², СЛАЂАНА Б. НОВАКОВИЋ³ И СРЕЂКО Р. ТРИФУНОВИЋ⁴

¹Агрономски факултет, Универзитет у Крагујевцу, Цара Душана 34, 32000 Чачак, ²University of Oviedo, Faculty of Chemistry, Spain, ³Институт за нуклеарне науке „Винча“, Лабораторија за физику кондензоване материје, Универзитет у Београду, п. бр. 522, 11001 Београд и ⁴Институт за хемију, Природно–математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац

Синтетисан је бидентатни *N,N'* лиганд прекурсор, *O,O'*-дипропил естар (*S,S*)-етиленамин-*N,N'*-ди-2-(4-метил)-пентанске киселине дихлорхидрата и испитивана је његова кристална структура. Наведени лиганд кристалише у просторној групи *P4*₂ тетрагоналног кристалног система са димензијама јединичне ћелије *a* = 16.5620 (2) Å, *b* = 16.5620 (2) Å, *c* = 5.2240 (1) Å и *Z* = 2.

(Примљено 8. фебруара, ревидирано 24. априла 2012)

REFERENCES

1. T. J. Sabo, G. N. Kaluderović, S. R. Grgurić-Šipka, F. W. Heinemann, S. R. Trifunović, *Inorg. Chem. Commun.* **7** (2004) 241
2. G. N. Kaluderović, D. Miljković, M. Momčilović, V. M. Đinović, M. Mostarica-Stojković, T. J. Sabo, V. Trajković, *Int. J. Cancer* **116** (2005) 479
3. S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanić, J. Radović, D. Miljković, G. N. Kaluderović, T. J. Sabo, V. Trajković, *Cell. Mol. Life Sci.* **62** (2005) 1275
4. G. N. Kaluderović, H. Schmidt, S. Schwieger, Ch. Wagner, R. Paschke, A. Dietrich, T. Mueller, D. Steinborn, *Inorg. Chim. Acta* **361** (2008) 1395
5. G. N. Kaluderović, H. Schmidt, D. Steinborn, T. J. Sabo, in: *Inorganic Biochemistry: Research Progress*, J. G. Hughes, A. J. Robinson, Eds., Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2008, pp. 305–326
6. G. N. Kaluderović, H. Kommera, S. Schwieger, A. Paethanom, M. Kunze, H. Schmidt, R. Paschke, D. Steinborn, *Dalton Trans.* **48** (2009) 10720

7. B. B. Krajčinović, G. N. Kaluđerović, D. Steinborn, H. Schmidt, Ch. Wagner, Ž. Žižak, Z. D. Juranić, S.R. Trifunović, T. J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 892
8. J. M. Vujić, M. Cvijović, G. N. Kaluđerović, M. Milovanović, B. B. Zmejkovski, V. Volarević, N. Arsenijević, T. J. Sabo, S. R. Trifunović, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 3601
9. B. B. Krajčinović, G. N. Kaluđerović, D. Steinborn, Ch. Wagner, K. Merzweiler, S. R. Trifunović, T. J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* **74** (2009) 389
10. B. B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, S. Gómez-Ruiz, Ž. Žižak, D. Steinborn, H. Schmidt, R. Paschke, Z. D. Juranić, T. J. Sabo, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3452
11. L.N. Schoenberg, D.W. Cooke, C.F. Liu, *Inorg. Chem.* **7** (11) (1968) 2386
12. Oxford Diffraction, CrysAlis CCD and CrysAlis RED Versions 1.171.32.24, Oxford Diffraction Ltd., Abington, England, 2008
13. R. C. Clark and J. S. Reid, *Acta Crystallogr., A* **51** (1995) 887
14. M. C. Burla, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.* **36** (2003) 1103
15. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., A* **64** (2008) 112
16. M. Nardelli, *Comput. Chem.* **7** (1983) 95
17. L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **30** (1997) 565
18. C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. an de Streek, *J. Appl. Crystallogr.* **39** (2006) 453
19. B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, S. Gómez-Ruiz, Ž. Žižak, D. Steinborn, H. Schmidt, R. Paschke, Z.D. Juranić, T.J. Sabo, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3452
20. M. C. Etter, *Acc. Chem. Res.* **23** (1990) 120.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Molecular structure of [(*S,S*)-H₂Pr₂eddl]Cl₂ with the atom labeling scheme. The displacement ellipsoids are plotted at the 40 % probability level. The twofold axis is passing through the middle of C10–C10' bond.

Fig. 2. (a) Intermolecular N–H...Cl and C–H...O hydrogen bonding relates the molecules into ribbons. (b) Segment of three-dimensional porous crystal structure.

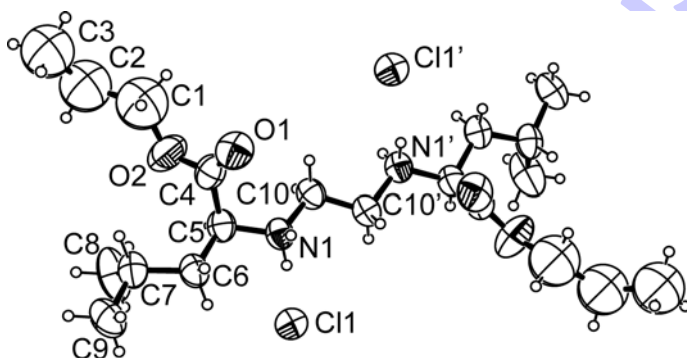
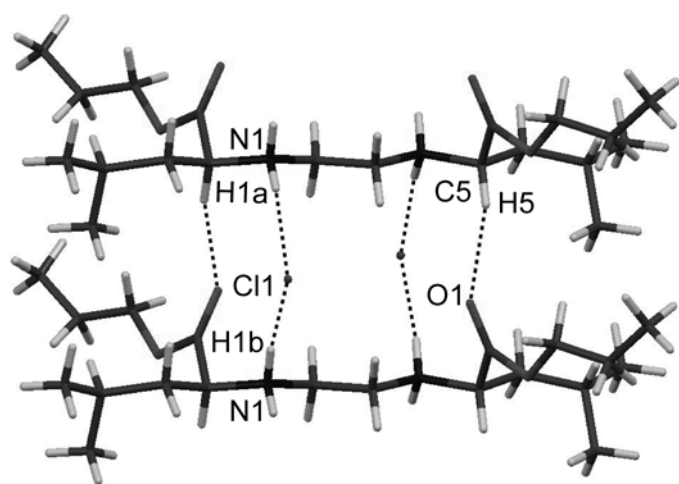
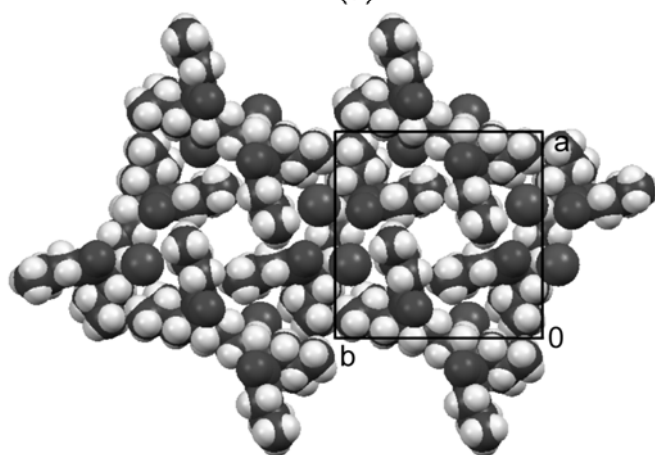


Fig. 1.



(a)



(b)

Fig. 2.

TABLE CAPTIONS

Table I. Crystal data and structure refinement for [(*S,S*)-H₂Pr₂eddl]Cl₂

Table II. Selected bond lengths and angles.

Table III. Hydrogen bonding geometry (Å, °).

Table 1. Crystal data and structure refinement for [(*S,S*)-H₂Pr₂eddl]Cl₂.

Empirical formula	C ₂₀ Cl ₂ H ₄₂ O ₄ N ₂
Formula weight	445.47
Wavelength / Å	1.54184
Crystal system	Tetragonal
Space group	<i>P4</i> ₂
Unit cell dimensions	
<i>a</i> = <i>b</i> / Å	16.562(2)
<i>c</i> / Å	5.224(1)
<i>V</i> / Å ³	1432.9(3)
<i>Z</i>	2
μ / mm ⁻¹	2.215
F(000)	484
<i>D</i> _{calc} / g cm ⁻³	1.032
Temperature / K	293
Crystal size / mm ³	0.07 x 0.02 x 0.01
Reflections collected	8570
Independent reflections	2869
Absolute structure parameter	0.05(6)
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	0.814
<i>R</i> _{int}	0.0663
<i>R</i> ₁ , <i>wR</i> ₂ [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0.0769, 0.1911

Table II. Selected bond lengths and angles.

Bond lengths (Å)		Bond angles (°)	
C4–O1	1.479(18)	C5–C6–C7	113.5(6)
C4–O2	1.324(10)	C4–C5–N1	107.0(6)
C5–N1	1.491(8)	C5–N1–C10	115.8(5)
C5–C6	1.541(9)	O1–C4–O2	125.7(9)
C6–C7	1.531(9)	C5–C4–O1	127.4(8)

Table III. Hydrogen bonding geometry (Å, °).

	D–H	D...A	H...A	D–H...A
C7–H7...O2 ⁱ	0.98	3.111(11)	2.57	114
C10–H10a...O1 ⁱ	0.97	3.119(10)	2.58	115
N1–H1a...Cl1 ⁱ	0.90	3.133(8)	2.25	166
N1–H1b...Cl1 ⁱⁱ	0.90	3.106(8)	2.25	158
C5–H5...O1 ⁱⁱ	0.98	3.303(10)	2.35	164

Symmetry codes: (i) = x, y, z; (ii) = x, y, z+1.