UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra anorganické chemie

Ruthenium jako centrální kov medicínsky zajímavých komplexů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:	Klára Míčková
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioanorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí bakalářské práce:	Mgr. Radka Křikavová, Ph.D.

Olomouc 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem Mgr. Radky Křikavové, Ph.D. a veškeré literární prameny, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne……..

…….

Klára Míčková

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala své vedoucí bakalářské práce Mgr. Radce Křikavové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, měření NMR spekter a věnovaný čas, Mgr. Lucii Hanouskové, Mgr. Jakubu Hutyrovi a Mgr. Marku Machatovi, kteří mi byly nápomocni v době nepřítomnosti vedoucí mé práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Pavle Richterové za měření elementární analýzy, Mgr. Aleně Klanicové, Ph.D. za naměření infračervených spekter a RNDr. Bohuslavu Drahošovi, Ph.D. za změření hmotnostních spekter. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala svému příteli a rodině za podporu při psaní bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Klára Míčková

Název práce: Ruthenium jako centrální kov medicínsky zajímavých komplexů

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra anorganické chemie

Vedoucí práce: Mgr. Radka Křikavová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt:

Teoretická část této práce pojednává o rutheniu a jeho komplexech, které představují slibné látky pro možné využití v medicíně, zejména v oblasti léčby rakoviny. Jedněmi z nejzajímavějších sloučenin jsou NAMI-A a KP1019, které v současné době podstupují fázi II klinického testování. Tyto dvě sloučeniny, ač jsou si strukturně podobné, vykazují naprosto odlišnou aktivitu. NAMI-A vykazuje inhibiční efekt proti rakovinným metastázím, ale její přímý cytotoxický efekt je nedostatečný. KP1019 má naopak vysokou cytotoxicitu vůči široké škále primárních nádorů. Dalšími zajímavými látkami s výraznou protirakovinnou aktivitou zmíněnými v této práci jsou polosendvičové organokovové komplexy. Důležitými zástupci této skupiny látek jsou RAPTA komplexy, které podobně jako NAMI-A vykazují aktivitu proti rakovinným metastázím. Dalšími zajímavými zástupci polosendvičových organokovů ruthenia jsou komplexy typu [(η^6-aren)Ru^{II}(L)X], kde L značí N,N-, N,O- nebo O,O-donorový chelatující ligand a X značí halogen. V teoretické části této práce je také pojednáváno o nových přístupech k léčbě rakoviny, které představují fotodynamická terapie (PDT) a fotoaktivovaná chemoterapie (PACT), a o komplexech ruthenia potenciálně využitelných v těchto směrech. Část práce je věnována také Schiffovým bázím, které byly vybrány jako ligandy pro syntézu nových komplexů popsaných v praktické části. Praktická část této bakalářské práce je věnována syntéze a charakterizaci nových polosendvičových komplexů ruthenia se Schiffovými bázemi (L) jako ligandy. Byly připraveny čtyři komplexy obecného složení [Ru(η^6-*p*-cym)(L)Cl_2], kde *p*-cym představuje *p*-cymen, které byly charakterizovány pomocí elementární analýzy, konduktometrie, NMR spektroskopie, IR spektroskopie a ESI-MS spektrometrie. Část práce je věnována samotným ligandům, jejich syntéze a charakterizaci pomocí dostupných analytických metod.

Klíčová slova: ruthenium, rakovina, NAMI-A, KP1019, organokovy, fotodynamická terapie, fotoaktivovaná chemoterapie, Schiffovy báze

Počet stran: 42

Jazyk: čeština

Bibliographical identification

Author`s first name and surname:	Klára Míčková
Title:	Ruthenium as the central metal of medicinally interesting complexes
Type of thesis:	Bachelor thesis
Department:	Department of Inorganic Chemistry
Supervisor:	Mgr. Radka Křikavová, Ph.D.
The year of presentation:	2016

Abstract:

The theoretical part of this bachelor thesis deals with ruthenium and its complexes which represent promising agents for medicinal use, especially in cancer therapy. Ones of the most interesting compounds are represented by NAMI-A and KP1019 which are currently in phase II clinical trials. These two compounds, despite their structural similarity, have absolutely different activity. NAMI-A shows an inhibitory effect against cancer metastases but its direct cytotoxic effect is insufficient. On the contrary, KP1019 shows high cytotoxicity against a wide range of primary tumors. Half-sandwich organometallic complexes are another group of interesting compounds mentioned in this bachelor thesis showing promising anticancer activity. RAPTA complexes are important representatives of this group. They have similar activity against cancer metastases like NAMI-A. Complexes of the general formula [(η^6-arene)Ru^{II}(L)X], where L represents N,N-, N,O- or O,O- donor chelating ligand and X stands for a halogen, are another interesting group of half-sandwich organometallics. Photodynamic therapy (PDT), photoactivated chemotherapy (PACT) and ruthenium complexes potentionally useful in these therapies are also discussed in the theoretical part as a new approach in cancer treatment. A part of this thesis is focused on Schiff bases which have been selected as ligands for synthesis of new complexes described in the experimental part. The experimental part is concentrated on the synthesis and characterization of new ruthenium half-sandwich complexes with Schiff bases (L) as ligands. Four complexes of the general formula [Ru(η^6-*p*-cym)(L)Cl_2], where *p*-cym stands for *p*-cymene, have been prepared and characterized by elemental analysis, conductivity measurements, NMR spectroscopy, IR spectroscopy and ESI-MS spectrometry. A part of the bachelor thesis deals with ligands, synthesis and their characterization by available analytical methods.

Keywords: ruthenium, cancer, NAMI-A, KP1019, organometallics, photodynamic therapy, photoactivated chemotherapy, Schiff bases

Number of pages: 42

Language: Czech

Obsah

1 Úvod 1
2 Teoretická část 2
2.1 Charakteristika ruthenia 2
2.2 Využití kovů a jejich komplexních sloučenin v medicíně 2
2.3 Od cisplatiny k rutheniu 3
2.4 Začátek vývoje potenciálně biologicky využitelných Ru komplexů 4
2.5 NAMI-A, KP1019 a NKP1339 5
2.5.1 Aktivace redukcí 6
2.6 Organokovové sloučeniny 9
2.6.1 RAPTA 9
2.6.2 RM175 11
2.7 Fotodynamická terapie (PDT) 13
2.8 Fotoaktivovaná chemoterapie (PACT) 16
2.9 Schiffovy báze 18
2.9.1 Příprava Schiffových bází 18
2.9.2 Schiffovy báze v biochemických procesech v lidském těle 19
2.9.3 Využití Schiffových bází 21
3 Praktická část 23
3.1 Materiály a metody 23
3.2 Syntéza 23
3.2.1 Syntéza $[Ru(\mu\text{-}Cl)(\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Cl]_2$ 23
3.2.2 Syntéza ligandů 24
3.2.3 Syntéza komplexů 25
3.3 Výsledky a diskuze 27
3.3.2 Připravené Schiffovy báze a jejich vlastnosti 28
3.3.3 Připravené komplexy a jejich charakterizace 31
4 Závěr 38
5 Literatura 40

1 Úvod

Objevením cisplatiny, *cis*-[$Pt(NH_3)_2Cl_2$], profesorem Rosenbergem a jeho spolupracovníky a jejím následným využitím pro léčbu rakoviny v 60. letech minulého století, se odstartovala nová éra anorganické chemie. Začalo se dostávat značné pozornosti přechodným kovům a jejich koordinačním sloučeninám jako potenciálním léčivům. U spousty takových látek byla zjištěna protirakovinná, antivirální nebo antimikrobiální aktivita či jiné vlastnosti, které mohou pomoci léčit široké spektrum nemocí.[1]

Za účelem vývoje nových látek aktivních proti rakovinnému bujení byly syntetizovány a zkoumány nejprve sloučeniny na bázi platiny. V dnešní klinické praxi jsou již běžně používané kromě cisplatiny také karboplatina a oxaliplatina.[2] Tímto ovšem výzkum protirakovinných látek nekončí. Léčiva, která jsou v dnešní době používána, vykazují spoustu nežádoucích účinků a rezistenci proti mnoha druhům karcinomů. To vede ke stálému vývoji nových látek se snahou zvýšit efektivitu léčby a snížit nežádoucí účinky těchto léčiv na onkologické pacienty. V dnešní době se dostává pozornosti nejen platinovým sloučeninám, ale i sloučeninám jiných přechodných kovů jako jsou například osmium, rhodium, zlato, galium, železo, titan a v neposlední řadě ruthenium.[1,3]

Tato práce je zaměřena právě na ruthenium a jeho sloučeniny, které by mohly být v budoucnu využitelné v medicíně. Cílem mé práce je shrnutí doposud připravených zajímavých koordinačních sloučenin Ru a příprava nových potenciálně medicínsky využitelných derivátů Ru s O- , N- a S-donorovými Schiffovými bázemi jako ligandy.

2 Teoretická část

2.1 Charakteristika ruthenia

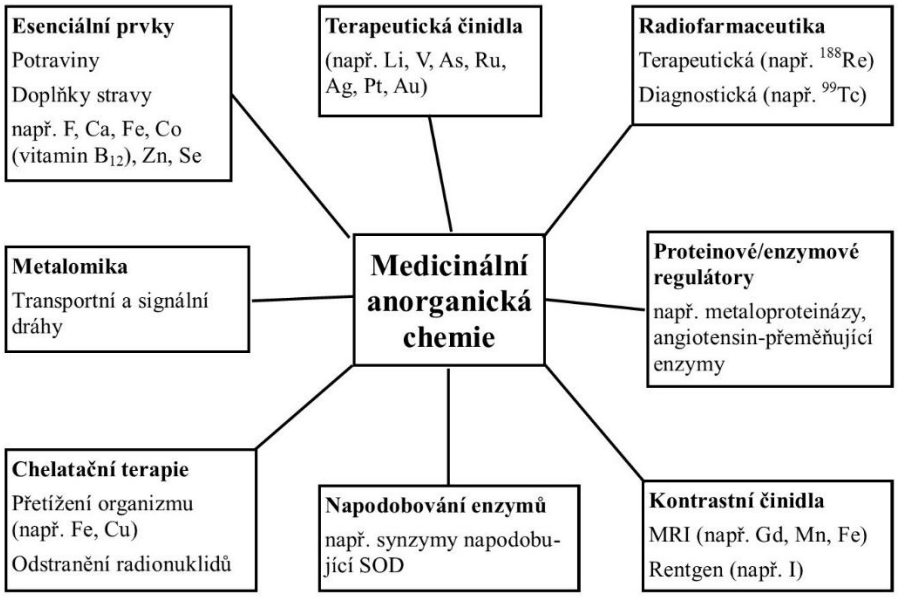
Ruthenium je stříbrolesklý přechodný kov patřící do triády lehkých platinových kovů (VIII. B skupina, 5. perioda periodické soustavy prvků). Jeho elektronová konfigurace je $[Kr]4d^7 5s^1$. Může se vyskytovat v oxidačních stavech od –II až po +VIII. Je to kov ušlechtilý, vyznačuje se odolností ke kyselinám, obtížnou tavitelností a značnou tvrdostí. Svými vlastnostmi se podobá spíše osmiu než ostatním lehkým platinovým kovům.[4]

Ruthenium je nejvzácnější z platinových kovů, pokud jde o jeho výskyt v ložiskách platinových rud. Vyskytuje se v malých koncentracích přibližně stejně hojně jako platina. Také proto bylo objeveno mnohem později než ostatní platinové kovy (1844). Jeho objev připisujeme ruskému chemikovi K. Klausovi a po Rusku je tento prvek také pojmenován.[5]

Ru samotné i jeho sloučeniny se využívají jako katalyzátory při hydrogenačních reakcích. Katalyzuje například Fisher-Tropschovu reakci, hydrogenaci benzenu nebo redukci cukrů na alkoholy.[6] Dále se využívá jako přísada do slitin Pt a Pd pro zvýšení jejich tvrdosti. Z těchto slitin se pak vyrábí například elektrody nebo termoelektrické články.[7] V posledních letech se stále více začíná zkoumat možné využití jeho komplexů jako protinádorových léčiv.[1]

2.2 Využití kovů a jejich komplexních sloučenin v medicíně

Medicinální anorganická chemie je poměrně nový obor. Zájem o tuto interdisciplinární vědu prudce vzrostl v 60. letech minulého století po objevení vlastností cisplatiny, *cis*-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, která se dnes používá k léčbě rakoviny. Kovy a jejich sloučeniny mají ovšem mnohem širší škálu biologického využití než jen jako protirakovinná léčiva *(Obr. 1)*.[8]



Obr. 1: Oblasti využití kovů a jejich sloučenin [8]

2.3 Od cisplatiny k rutheniu

Protinádorové účinky cisplatiny, tedy *cis*-diammin-dichloroplatnatého komplexu *cis*-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, relativně jednoduché anorganické látky, byly objeveny v 60. letech minulého století na Michiganské státní univerzitě profesorem Barnettem Rosenbergem, který se svou pracovní skupinou studoval zajímavý biofyzikální problém, a to vliv elektrického pole na růst bakterií *Escherichia coli*. Američtí vědci prováděli pokusy takovým způsobem, že do nádobky s bakteriemi v živné půdě ponořili dvě platinové elektrody, mezi které vložili elektrické napětí. Výsledkem bylo zastavení dělení bakteriálních buněk. Zjistilo se, že za tento jev jsou zodpovědné koordinační sloučeniny platiny (cisplatina a její analoga), které vznikly při elektrolytických dějích na platinových elektrodách.[9]

Pracovní hypotézu, že i dělení jiných rychle se dělících buněk, například buněk nádorových, by mohlo být také zastaveno platnatými komplexy, se podařilo prokázat i při klinických studiích, které prokázaly vysokou aktivitu účinku proti rakovině varlat.[10]

Nicméně cisplatina má spoustu vedlejších účinků, mezi které patří například neurotoxicita[11], nefrotoxicita[12], ototoxicita[13], vypadávání vlasů, nausea a mnoho dalších. Je také vůči mnoha typům nádorů neúčinná. Proto se v posledních letech stále více vědců zabývá vývojem a syntézou sloučenin, které by měly mít méně vedlejších účinků a zároveň by měly

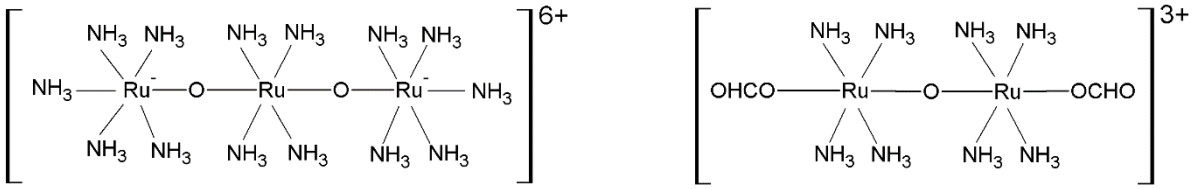
větší protinádorový efekt, tím pádem by mohly cisplatinu nahradit. Jedním z alternativních přechodných kovů, který ve sloučeninách nahrazuje platinu, je i ruthenium.[14]

2.4 Začátek vývoje potenciálně biologicky využitelných Ru komplexů

Ruthenium má několik vlastností, díky kterým se stává teoreticky vhodným kovem pro syntézu sloučenin využitelných v medicíně. Za prvé je to vhodná kinetika výměny ligandů. Bylo prokázáno, že rychlost výměny stejných ligandů vázaných na rozdílné ionty kovů se může lišit až o několik řádů. V tomto ohledu jsou sloučeniny Ru(II) a Ru(III) podobné sloučeninám Pt(II). K výměně ligandů dochází řádově v minutách až hodinách, ne v mikrosekundách až sekundách, jako je tomu u spousty jiných koordinačních sloučenin. Takováto doba odpovídá i časovému měřítku mnoha procesů buněčného dělení. Další výjimečnou vlastností Ru je jeho schopnost vystupovat v oxidačních stavech +II, +III a +IV ve fyziologických podmínkách. V těchto oxidačních stavech je většinou atom Ru hexakoordinován v oktaedrické geometrii. Koordinované ligandy pak stabilizují dané oxidační stavy a určují redoxní vlastnosti centrálního atomu. Redoxní vlastnosti jsou důležité pro biologickou aktivitu a selektivitu těchto komplexů. Významnou skutečností dále je, že Ru dokáže napodobovat Fe a vázat se na jeho transportní proteiny – transferrin a albumin. Jelikož rychle se dělící rakovinné buňky vyžadují zvýšený přísun Fe, dochází k selektivní akumulaci Ru v těchto buňkách. Toto ovšem není jediný způsob transportu Ru sloučenin do buněk. Existují i na transferrinu nezávislé mechanizmy.[15]

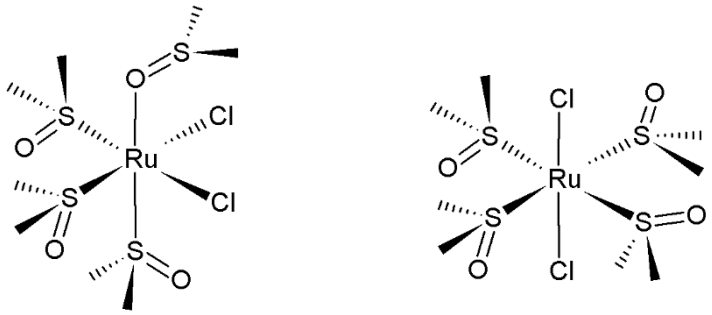
Jedněmi z prvních komplexů Ru, které byly syntetizovány a studovány pro jejich protirakovinné účinky, byly Ru(II) a Ru(III) komplexy s chloro a ammin ligandy.[16] Z této řady komplexů stojí za zmínku *fac*-$[Ru^{III}Cl_3(NH_3)_3]$, který byl nejúčinnější proti myšímu prsnímu sarkomu EMT-6, avšak pro další klinické studování byl shledán nevhodným vzhledem k jeho špatné rozpustnosti ve vodě.[17]

Mezi další látky s ammin ligandy, které byly zkoumány pro jejich cytotoxicitu v rakovinných buňkách, patří i cytologické barvivo rutheniová červeň – $[(NH_3)_5Ru^{III}\text{-}O\text{-}Ru^{IV}(NH_3)_4\text{-}O\text{-}Ru^{III}(NH_3)_5]^{6+}$ (*Obr. 2).* Rutheniová červeň se váže na mnoho Ca^{2+}-vázajících proteinů, což znemožňuje vápenatým iontům dostat se do buňky. To bylo impulzem pro jejich možné využití jako léčiva. Dalším zkoumáním však bylo zjištěno, že rutheniová červeň obsahovala nečistoty. Mezi nimi také sloučeninu Ru360 – $[(HCOO)(NH_3)_4Ru^{III}\text{-}O\text{-}Ru^{IV}(NH_3)_4(HCOO)]^{3+}$ (*Obr. 2)*, která byla z velké části zodpovědná za tuto inhibici. Antitumorovou aktivitu však ani Ru360 nevykazovala.[18]



Obr. 2: Rutheniová červeň (vlevo) a Ru360 (vpravo)[19]

Jeden z problémů pro biologické využití komplexů je jejich špatná rozpustnost ve vodě. Dále se tedy začala věnovat pozornost Ru(II) komplexům s chloro a DMSO ligandy (DMSO = dimethylsulfoxid). Jedním ze zajímavých zjištění je, že *trans*-[$RuCl_2(DMSO)_4$] *(Obr. 3)* vykazuje vyšší cytotoxicitu než *cis* forma na rozdíl od Pt(II) komplexů, u kterých je to právě naopak. To pravděpodobně naznačuje jiný mechanizmus účinku Ru(II) a Pt(II). Mezi Ru-DMSO komplexy patří také NAMI-A. Současně s touto látkou došlo také k objevu KP1019. O obou najdeme více informací dále v textu.[16]

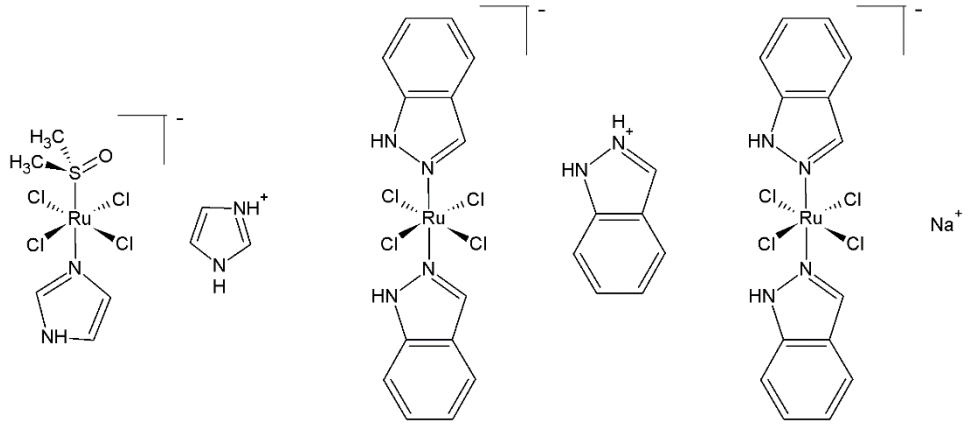


Obr. 3: Cis-[$RuCl_2(DMSO)_4$] (vlevo) a trans-[$RuCl_2(DMSO)_4$] (vpravo)[1]

2.5 NAMI-A, KP1019 a NKP1339

NAMI-A - (H_2im)[*trans*-$RuCl_4$(Him)(DMSO)], KP1019 - (H_2ind)[*trans*-$RuCl_4(Hind)_2$] a NKP1339 - Na[*trans*-$RuCl_4(Hind)_2$] (*Obr. 4),* kde Him = imidazol a Hind = indazol, se odlišují od platnatých komplexů geometrickým uspořádáním. Zatímco komplexy platiny jsou čtvercové, komplexy na bázi ruthenia jsou oktaedrické. Dalším rozdílem je schopnost přenosu elektronů, zatímco přechod mezi Pt^{IV+} a Pt^{II+} způsobuje změnu koordinačního čísla a změnu délek vazeb mezi atomy, u přechodu Ru^{II+}/Ru^{III+} k těmto změnám nedochází.[20]

Ačkoliv jsou NAMI-A a KP1019, či sodná sůl tohoto komplexu NKP1339, chemicky a strukturně podobné, mají rozdílné účinky a chování v tumorových tkáních. Z preklinických studií vyplývá, že NAMI-A vykazuje inhibiční efekt vůči rakovinným metastázím v mnoha různých zkoumaných modelových zvířecích tumorech, avšak má nedostatečný přímý cytotoxický efekt. KP1019 naopak vykazuje přímou cytotoxicitu vůči široké škále primárních nádorů tím, že indukuje apoptózu jejich buněk.[15]



Obr. 4: NAMI-A (vlevo), KP1019 (uprostřed) a NKP1339 (vpravo)[1]

2.5.1 Aktivace redukcí

Pro komplexy ruthenia v oxidačním stavu +III byla navržena teorie, která vysvětluje mechanizmus účinku těchto látek. Tato teorie říká, že Ru(III) komplexy slouží pravděpodobně jako prekurzory, které jsou *in vivo* přeměněny (redukovány) na aktivní formu – Ru(II) komplex.[18]

Nádorové buňky se dělí mnohem rychleji než zdravé, mají rychlejší metabolismus, tudíž spotřebovávají více kyslíku. Cévní zásobování a vznik nových cév nejsou dostatečně rychlé vzhledem k rychlosti růstu nádoru a dochází k hypoxii. Nádorové buňky jsou pak více závislé na glykolýze a dochází ke vzniku přebytku kyseliny mléčné, která způsobuje nižší pH. Tyto metabolické změny v nádorových buňkách pak způsobují snadnější redukci Ru(III) na Ru(II) ve srovnání se zdravými buňkami. Redukcí Ru(III) na Ru(II) dojde k zaplnění t_{2g} d-orbitalů a původně silná vazba s π-donorovými ligandy je oslabena. Tyto ligandy pak mohou být snadno vyměněny.[18]

Schopnost redukovat Ru(III) v buňce má spousta proteinů a také glutathion (GSH). Některé komplexy mohou být redukovány i pomocí transmembránového elektron

transportního systému ještě, než se vůbec dostanou do buňky. Oxidace Ru(II) zpět na Ru(III) může nastat pomocí molekulárního kyslíku, cytochrom oxidázy či jiných oxidantů, ale v hypoxických nádorových buňkách je tento jev málo pravděpodobný. [18]

NAMI-A je výjimečnou sloučeninou na bázi ruthenia. Ze všech sloučenin přechodných kovů zkoumaných pro inhibici metastází (sloučeniny nejen Ru ale i Cu, Co, Ni, V aj.) je pouze NAMI-A klinicky testovaná pro léčbu metastazujících tumorů.[2] Zajímavé je, že proti primárním nádorům je zcela neúčinná. Její aktivita nesouvisí s tvorbou vazby s DNA, jako je tomu u mnoha jiných protirakovinných léčiv. Doposud navržené mechanizmy účinku NAMI-A zahrnují interakci této látky s aktinovými proteiny na buněčném povrchu či interakci s kolageny v extracelulárním matrixu, což vede ke snížení pohyblivosti a šíření rakovinných buněk.[16] NAMI-A blokuje buněčný cyklus v pre-mitotické fázi. Interakcí NAMI-A s intracelulárními a extracelulárními cíli, které společně vedou k apoptóze buňky, je však mnohem více.[21]

Ve fázi I klinických testů byla NAMI-A podávána intravenózně během tří hodin pět po sobě následujících dní každé tři týdny dvaceti čtyřem pacientům s různými typy tumorů (kolorektální karcinom, NSCLC, ovariální karcinom, melanom aj.). Látka byla podávána celkem ve dvanácti různých dávkách. Jako doporučená dávka pro další studie bylo stanoveno 300 mg/m^2/den. U jednoho pacienta s progresivním nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) došlo ke stabilizaci nemoci na 21 týdnů, což je slibný začátek, který podněcuje další testování a hlubší zkoumání NAMI-A. U některých pacientů byly pozorovány nežádoucí účinky. Objevovaly se mimo jiné flebitida (zánět povrchových žil), bolestivé puchýře na rukou a nohou, hypersenzitivita či nauzea, zvracení a průjem. Dále byly u některých pacientů pozorovány mírné ledvinové dysfunkce, které byly ale zcela vratné.[22]

V následné fázi I/II klinického testování byla NAMI-A kombinována s gemcitabinem a podávána pacientům s nemalobuněčným karcinomem plic.[23] Gemcitabin, 2,2-dideoxydifluorcytidin, je cytosinové cytostatikum používané zejména pro léčbu bronchogenních karcinomů, užívá se však i k léčbě karcinomu ovaria, prsu, pankreatu a malobuněčného karcinomu plic.[24] Pacientům byla podávána 1., 8. a 15. den dávka 300 mg/m^2 NAMI-A a 2., 9. a 16. den 1000 mg/m^2 gemcitabinu. Zde patří mezi hlavní nežádoucí účinky neutropenie, anémie, nauzea, zvracení, průjem nebo zácpa, ledvinová toxicita a mnoho jiných. Závěrem této studie je zjištění, že kombinace gemcitabinu a NAMI-A je u pacientů s NSCLC méně účinná než samotný gemcitabin.[23]

Druhou látkou, která úspěšně prošla první fází klinického testování a momentálně je ve druhé fázi je KP1019. KP1019 vykazuje slibnou aktivitu proti tumorům, proti kterým je cisplatina neúspěšná. Bylo zjištěno, že tato látka se váže na transferin, což je sérový protein schopný vázat dva ekvivalenty železitých iontů na specifické vazebné místo a sloužit tak jako přirozený nosič, díky kterému se KP1019 dostane do buňky. [9] Experimenty prokázaly, že malé množství železitých iontů vázaných na transferin spolu s KP1019 způsobují lepší vychytávání Ru komplexu rakovinnými buňkami než v případě samotného KP1019. Malé množství železitých iontů je tedy pravděpodobně důležité pro optimální transport pomocí transferinu.[17]

Ve fyziologických podmínkách (37°C, pH 7,4) dochází k hydrolýze sloučeniny. V buňce pak dochází k selektivní aktivaci redukcí. Jak již bylo výše popsáno, podle této teorie je látka aktivována pouze v rakovinné buňce, protože ta má více redukční prostředí než buňka zdravá. Poté dojde k navázání na DNA nebo na jiné biomolekuly a k apoptóze.[20]

Pro fázi I klinických studií bylo vybráno osm pacientů, kterým byla KP1019 intravenózně podávána v dávkách v rozmezí 25 – 600 mg dvakrát týdně po dobu tří týdnů. Jako optimální dávka pro další studie bylo doporučeno 400 mg. Maximální tolerovaná dávka nebyla stanovena z důvodu příliš velkého objemu infuzního roztoku. U pěti ze šesti hodnocených pacientů byla pozorována stabilizace nemoci po dobu osmi až deseti týdnů, a to nezávisle na podané dávce. Během testování nebyly pozorovány žádné závažné vedlejší účinky.[25]

Další nadějnou látkou pro léčbu rakoviny je NKP-1339, která je analogem KP1019. Původně byla pouze prekurzorem pro přípravu KP1019, ale vzhledem k její lepší rozpustnosti ve vodě a dalším vhodným vlastnostem byla tato látka také vybrána pro klinické studie.[17]

Stejně jako KP1019 se NKP-1339 po intravenózním podání váže na sérové proteiny. Rakovinné buňky vyžadují více železitých iontů, což vede ke zvýšené produkci receptorů pro transferin a jeho zvýšenému vychytávání. Proto byla vazba Ru(III) komplexů na transferin předmětem mnoha *in vitro* studií. Ukázalo se, že vazba KP1019 a NKP-1339 na transferin, konkrétně na histidin 253 v aminokyselinovém řetězci, je rychlá – proběhne během několika minut. Pro srovnání můžeme uvést, že tvorba aduktu s $(H_2im)[$*trans*$-RuCl_4(Him)_2]$ (KP418, Him = imidazol), trvala několik hodin. Dále bylo zjištěno, že vychytávání buňkou probíhá také velmi rychle a je ukončeno během první hodiny po podání látky do těla.[17]

Z nejnovějších analytických studií vyplývá, že ačkoliv je vazba KP1019 a NKP-1339 na transferin kineticky preferovaná, termodynamicky stabilnější je adukt s albuminem. Kompetitivní studie s ekvimolárním množstvím transferinu a albuminu ukázaly, že po

inkubační době (10 hodin) bylo na transferin navázáno méně než 20% KP1019. Když vezmeme v úvahu, že v krevním řečišti je přibližně 15 krát vyšší koncentrace albuminu oproti transferinu, tak celkově vzato je na transferin navázáno méně než 2% KP1019 v krvi. V souladu s tímto zjištěním byla i analýza krevních vzorků pacientů z klinického testování fáze I. Albumin se kumuluje v nádorových tkáních a k uvolnění komplexu dochází po degradaci proteinu.[17]

K dnešnímu dni se stále vedou diskuze o tom, který z proteinů je důležitější či zodpovědný za účinnost KP1019 a NKP-1339, a zda albumin může sloužit jako zásobárna komplexu pro následný transport pomocí transferinu.[17]

2.6 Organokovové sloučeniny

Za organokovy považujeme sloučeniny, které mají zřetelnou vazbu uhlík-kov. Obecně jsou považovány za nestabilní molekuly, známé spíše pro svou schopnost samovolného vznícení než pro terapeutický efekt. Některé organokovy s rutheniem ale jeví nečekanou stabilitu a zajímavé spektrum protinádorových aktivit.[14]

Mezi nejvýznamnější zástupce organokovů ruthenia patří tzv. „polosendvičové" komplexy. Jejich geometrie může být popsána jako pseudotetraedrická, v případě, kdy arenový ligand obsadí jedno koordinační místo, nebo oktaedrická, kdy aren obsadí tři koordinační místa. Arenový ligand je důležitý pro stabilizaci oxidačního stavu ruthenia +II. Vystupuje jako π-donor a zároveň π-akceptor. Vazba Ru-aren je obvykle stabilní vůči hydrolýze.[1]

2.6.1 RAPTA

První skupinou organokovových sloučenin, kterým byla pro jejich vlastnosti věnována značná pozornost, jsou tzv. RAPTA komplexy. Jsou to látky obsahující centrální atom Ru v oxidačním stavu +II s monodentátním ligandem 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantanem (pta) a η^6-aren ligandem *(Obr. 6)*. Jejich syntéza zahrnuje dva hlavní kroky: zaprvé reakci C6-dienu s hydratovaným $RuCl_3$ za vzniku dimerního $[(\eta^6\text{-aren})Ru^{II}Cl_2]_2$, druhým krokem je pak reakce $[(\eta^6\text{-aren})Ru^{II}Cl_2]_2$ s pta v organickém rozpouštědle v molárním poměru 1 : 2. [26]*(Obr. 5)*

RAPTA komplexy vykazovaly mírnou antiproliferační aktivitu v klasických *in vitro* testech. V rakovinných buněčných liniích byla cytotoxicita v rozmezí 50-500 μM a ve zdravých buňkách více než 1000 μM, což není nijak neobvyklé pro metaloterapeutika. Zajímavý je však jejich účinek proti metastázím zjištěný při *in vivo* testech. Testování bylo

provedeno na linii buněk rakoviny prsu, které metastázují do plic. U primárního tumoru byla pozorována pouze mírná redukce, která poklesla po přerušení podávání látky. Zároveň bylo ovšem pozorováno zastavení růstu a šíření metastází v plicích.[27]

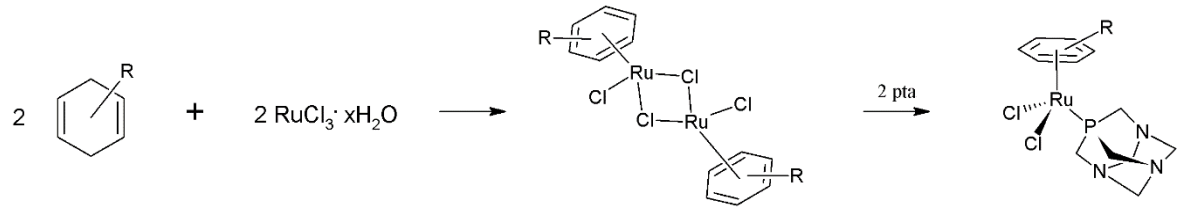
Biologické studie odhalily, že RAPTA komplexy působí na extracelulární i intracelulární cíle. Mezi ně mimo jiné patří jak DNA, tak i proteiny. Reaktivita s DNA je nižší ve srovnání s platinovými komplexy, ale dokáží DNA poškodit. U RAPTA-C, RAPTA komplexu, kde je použitým arenem *p*-cymen *(Obr. 6 - sloučenina 2)*, bylo zjištěno, že poškození DNA je závislé na pH buňky. Při fyziologickém pH nebo vyšším nedošlo k interakci s DNA, zatímco při pH < 7 bylo pozorováno poškození DNA. Přesto, že jsou RAPTA komplexy schopné DNA poškodit, je toto poškození zřejmě opravitelné nebo na místě, kde nemá vliv na buněčný růst. Mnohem významnější je jejich schopnost vázat se na proteiny. Tato vazba je upřednostňována před vazbou na DNA.[12]

ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry) byla použita pro zkoumání reakcí cisplatiny, transplatiny a RAPTA-C se směsí proteinů – ubiquitinem, cytochromem c a superoxid dismutázou (SOD). Z této studie vyplynulo, že RAPTA-C má mnohem vyšší afinitu k proteinům než další dvě studované látky. Dále vykazuje selektivitu – váže se ve velké míře na ubiquitin a cytochrom c, ale ne na SOD. U cisplatiny a transplatiny tato selektivita pozorována nebyla. Dále byla provedena kompetitivní studie mezi cisplatinou a RAPTA-C, kde bylo zjištěno, že obě látky se vážou na stejné aminokyseliny.[28]

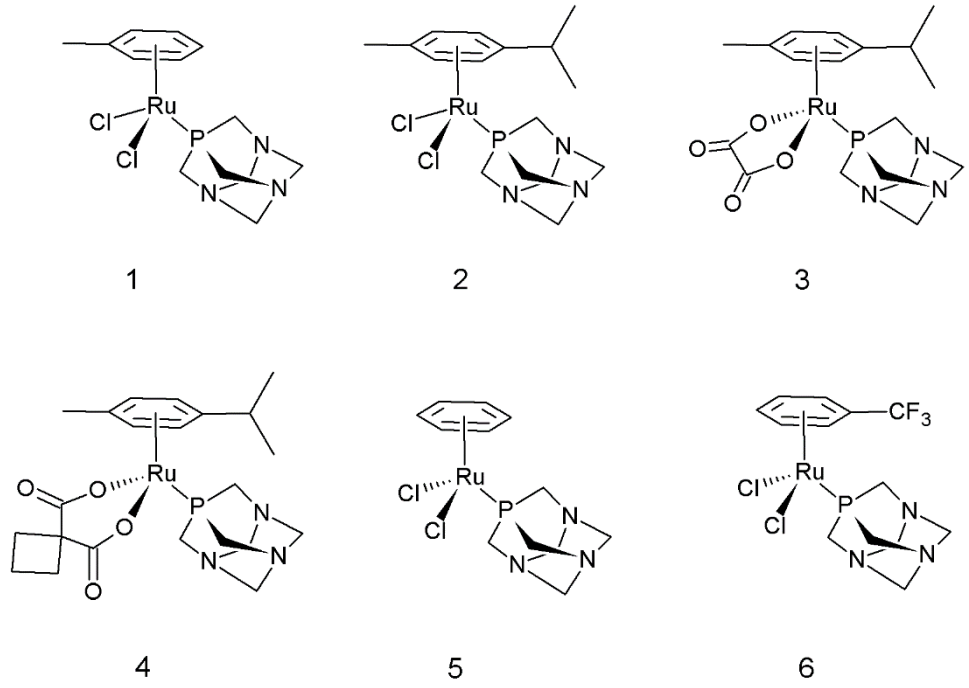
Vysoká reaktivita s proteiny podnítila výzkum možných interakcí RAPTA komplexů s enzymy, které jsou možnými cíli pro protinádorová léčiva, jako jsou například seleno-enzym thioredoxin reduktáza a cystein proteáza katepsin B. Thioredoxin reduktáza je enzym, který spolu s thioredoxinem a NADPH zajišťuje udržení stálého redoxního prostředí v buňce. Aktivní místo tohoto enzymu je schopno vázat ionty kovů, čímž se stává farmakologickým cílem mnoha léčiv na bázi kovů. Katepsin B je jeden z hlavních lysozomálních enzymů, které jsou zodpovědné za degradaci složek extracelulárního matrixu u některých nemocí, jako jsou svalová dystrofie či revmatoidní artritida a také u tumorového relapsu. Zvýšená migrace a šíření některých tumorů souvisí se zvýšenou expresí a sekrecí tohoto enzymu a dále bylo zjištěno, že při inhibici tohoto enzymu (*in vitro*) dochází ke snížení šíření rakovinných buněk.[29]

Při studiu RAPTA komplexů pro inhibici těchto dvou enzymů bylo zjištěno následující. Inhibice thioredoxin reduktázy byla nižší než inhibice katepsinu B. Naměřené IC_{50}, tedy koncentrace potřebné k 50% inhibici aktivity enzymu, dosahovaly velmi nízké mikromolární hodnoty u katepsinu B, ovšem u thioredoxin reduktázy byly v rozmezí 45-200

μM. Tento výsledek naznačuje, že RAPTA komplexy by mohly být efektivními inhibitory katepsinu B při fyziologicky dosažitelných podmínkách, zatímco inhibice thioredoxin reduktázy je jen málo významná.[29]



Obr. 5: Obecné schéma pro syntézu RAPTA komplexů, kde pta představuje 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantan [27]



Obr. 6: Vybrané RAPTA komplexy[27]

2.6.2 RM175

Další skupinou zajímavých látek jsou komplexy typu [(η^6-aren)Ru^{II}(L)X], kde L značí N,N-, N,O- nebo O,O- donorový chelatující ligand a X značí halogen. Tyto komplexní částice jsou buď elektroneutrální, nebo mají kladný náboj a jsou tudíž izolovány jako soli, nejčastěji s

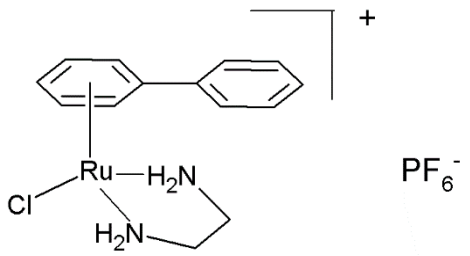
PF_6^-. Látky tohoto typu byly intenzivně zkoumány profesorem Peterem Sadlerem a jeho spolupracovníky.[1]

Jako významný zástupce této skupiny látek může být uveden komplex RM175 *(Obr. 7)*, což je [(η^6-bifenyl)Ru^{II}(en)Cl][PF_6], kde en = ethylendiamin. Tato sloučenina vykazovala v *in vitro* testech podobný či vyšší cytotoxický efekt než karboplatina. Bylo zjištěno, že zastavuje buněčný cyklus v G1 a G2 fázi a způsobuje apoptózu buňky. Účinky proti primárnímu nádoru a proti metastázím v plicích byly zkoumány na modelu myšího MCa prsního karcinomu, který samovolně metastázuje do plic. Bylo zjištěno, že RM175 vykazuje určitý stupeň selektivity vůči nádorovým metastázím a tento efekt je výraznější než redukce primárního tumoru. Zajímavé je, že isostrukturní sloučenina osmia [(η^6-bifenyl)Os^{II}(en)Cl][PF_6], která se v *in vitro* testech jevila účinnější než Ru^{II} sloučenina, nevykazovala *in vitro* antimetastatickou aktivitu, což poukazuje na důležitost centrálního atomu.[30]

Jedny z dalších *in vitro* studií protirakovinné aktivity ukázaly, že RM175 je aktivní proti A2780 a A2780cisR, buněčné nádorové linii vaječníků a buněčné nádorové linii vaječníků rezistentní vůči cisplatině. Tato aktivita byla do značné míry pozorována i *in vivo*, kdy byly A2780 a A2780cisR tumory transplantované do myší. RM175 byla také myšmi mnohem lépe tolerovaná. Dávka 25 mg/kg podávaná v den 1 a 5 bez významného úbytku na váze je srovnatelná s dávkou 10 mg/kg cisplatiny podané v jediné dávce v den 1.[31]

Bylo provedeno mnoho studií zabývajících se interakcemi RM175 s možnými biologickými cíli (např.: cytochrom c, histidin, cystein, methionin, glutathion). Výsledky však naznačují, že hlavním cílem pro RM175 v buňce je DNA a RNA.[1]

RM175 se koordinačně váže na dusík N7 guaninu v DNA. Vazba na DNA může být doplněna o interkalační vazbu arenu a také o vodíkovou vazbu chelatujícího ligandu na C6-O skupinu guaninu. Předpokládá se, že *in vivo* je v intracelulárním prostředí hydrolýza chloro ligandu potlačena vzhledem k vysoké koncentraci chloridových iontů. V buněčném jádře, kde je koncentrace chloridových iontů mnohem nižší, dochází ke vzniku aktivního aqua-komplexu.[3]



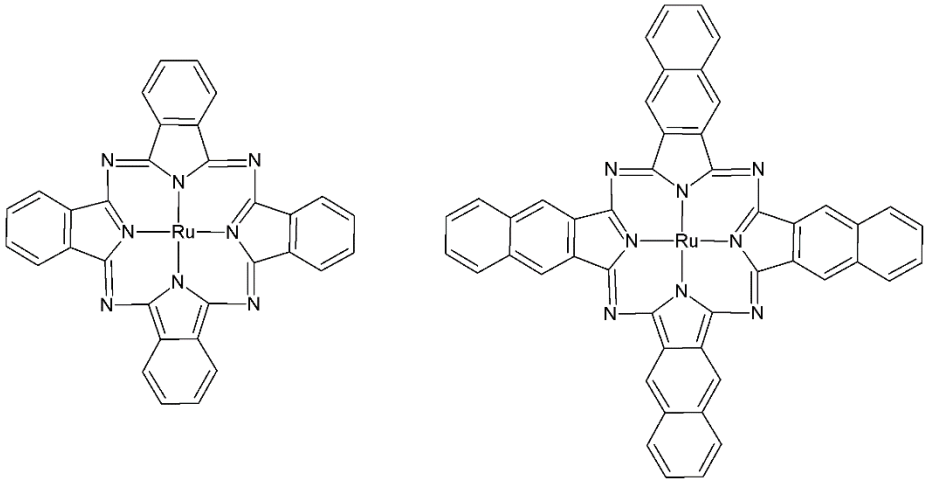
Obr. 7: RM175 - [(η^6-bifenyl)Ru^{II}(en)Cl][PF_6][21]

2.7 Fotodynamická terapie (PDT)

Fototerapie je pojem označující využití viditelného světla jako terapeutického činidla v klinické medicíně. Může být rozdělena do dvou kategorií. První je přímá fototerapie, kdy biomolekuly (proteiny, nukleové kyseliny či menší molekuly jako např. glutathion) absorbují záření a jeho vlivem dochází ke změně těchto molekul. Nepřímá fototerapie se vyznačuje potřebou senzibilizátoru, který dobře absorbuje záření. Po podání takovéto látky do těla a absorpci UV nebo viditelného záření dochází u této fotoexcitované molekuly k řadě procesů. Jsou to fotochemické reakce samotné látky, fotoreakce s dalšími biomolekulami a přenos energie do endogenních molekul. Jedním z nejvíce zkoumaných odvětví nepřímé fototerapie je nádorová fototerapie, která se nazývá fotodynamická terapie (PDT).[32]

PDT je založena na skutečnosti, že podaný fotosenzibilizátor je selektivní a akumuluje se v nádorových buňkách. Jakmile je rozdíl mezi koncentrací fotosenzibilizátoru v nádorových buňkách a zdravých buňkách maximální, nádorová tkáň se ozáří pomocí viditelného světla. Excitované molekuly podléhají reakcím přenosu elektronu a přenosu energie. Nejčastěji dochází ke vzniku radikálů a singletového kyslíku, které pak způsobují smrt buňky.[32]

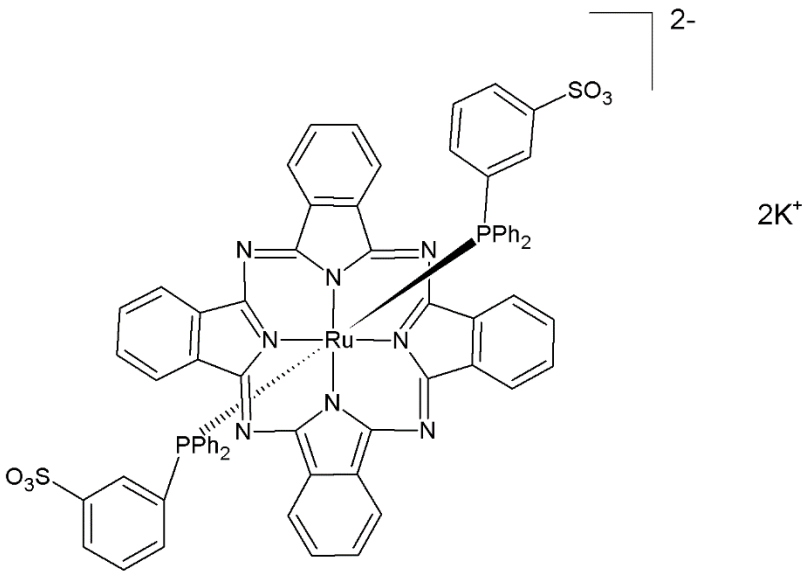
Ftalocyaniny a naftalocyaniny s rutheniem *(Obr. 8)*, nejčastěji v oxidačním stavu +II, byly zkoumány pro jejich potenciální využití jako fotosenzibilizátory. Jedním z důvodů jsou jejich silné absorpční vlastnosti ve vhodné oblasti elektromagnetického spektra. Tyto látky mají intenzivní absorpční Q-pás, který spadá do oblasti 650-800 nm, což je ideální rozmezí vlnových délek pro efektivní PDT.[33]



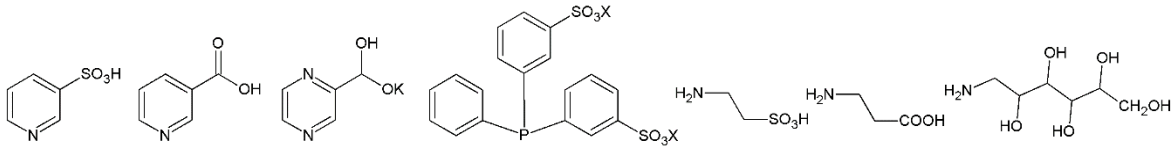
Obr. 8: Ru-ftalocyanin a Ru-naftalocyanin [33]

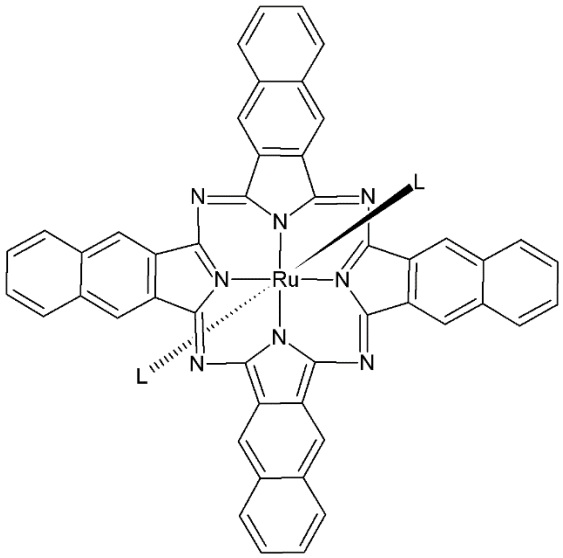
Jako konkrétní příklad můžeme uvést $K_2[PcRu(TPPMS)_2]$ *(Obr. 9)*, kde Pc je ftalocyanin a TPPMS je $Ph_2P(3\text{-}C_6H_4SO_3^-)$, čili monosulfonovaný trifenylfosfan. Tento komplex je dobře rozpustný ve vodě a má maximum absorpčního Q-pásu při vlnové délce 652 nm. Experimenty srovnávající jeho cytotoxicitu ve tmě a při osvětlení vůči HeLa nádorové buněčné linii lidských epiteliálních buněk *in vitro* ukázaly, že komplex je ve tmě netoxický i při koncentraci vyšší než 10^{-5} M, zatímco při ozáření světlem o vlnové délce 650 nm bylo usmrceno 50% buněk již při koncentraci 10^{-6} M. PDT experimenty na myších modelech ukázaly, že fibrosarkom (zhoubný nádor z vazivové tkáně) může být kompletně zničen použitím tohoto komplexu. Bylo zjištěno, že tento komplex při ozáření produkuje jen velmi malé množství singletového kyslíku a jeho mechanizmus účinku pravděpodobně zahrnuje elektronové přenosy související se vznikem částic, které ještě nebyly objasněny.[33]

Proti nádorové linii HeLa byla testována *in vitro* také sada komplexů Ru(II)-2,3-naftalocyaninů lišící se navzájem axiálními ligandy *(Obr. 10)*, které ovlivňovaly rozpustnost sloučenin ve vodě. Nejvyšší fototoxicitu proti HeLa vykazovaly ty komplexy, kde byly v axiální poloze vázány heterocyklické aromatické ligandy - kyselina pyridin-3-sulfonová, kyselina nikotinová a pyrazin-2-karboxylová kyselina. Koncentrace potřebná k inhibici 50% HeLa buněk při osvětlení byla v rozmezí 0,1 – 0,25 μM, pokud nedošlo k ozáření buněčné kultury, byla k dosažení stejného účinku nutná 25 – 250 krát vyšší koncentrace. Komplexy s alifatickými a fosfanovými ligandy vykazovaly aktivitu proti HeLa buňkám také, ale nižší než prvně zmíněné látky.[34]



Obr. 9: Komplex $K_2[PcRu(TPPMS)_2]$ [33]





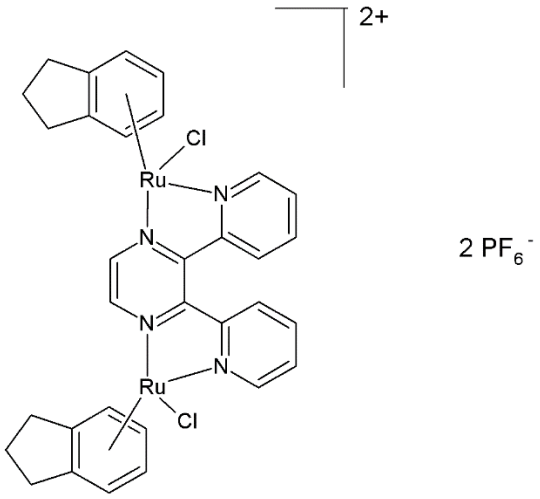
Obr. 10: Ru(II)-2,3-naftalocyanin (dole) a axiální ligandy použité pro in vitro testování proti HeLa (nahoře) [34]

2.8 Fotoaktivovaná chemoterapie (PACT)

Fotoaktivovaná chemoterapie funguje na podobném principu jako fotodynamická terapie. Poskytuje možnost kontroly, kdy a kde bude léčivo aktivováno, což vede ke zvýšení jeho specifity a účinnosti a ke snížení jeho nežádoucích vedlejších účinků. Na rozdíl od PDT, kde po ozáření a excitaci terapeutika dochází k předání energie a excitaci jiných molekul za vzniku singletového kyslíku a dalších radikálů, které jsou pak zodpovědné za zničení tumoru, je u PACT za zničení nádoru zodpovědná samotná podaná látka.[35]

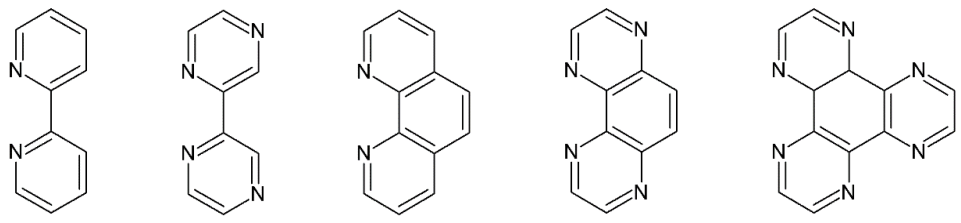
Komplexy potenciálně využitelné v PACT by měly mít, stejně jako je tomu u PDT, velký rozdíl v cytotoxicitě při ozáření a při absenci záření. Před ozářením se jedná o relativně inertní sloučeniny. Vlnová délka záření pro aktivaci komplexu by měla být ideálně v rozmezí 620 – 850 nm. Záření o vlnových délkách v tomto rozmezí dosahuje maximální hloubky průniku do tkání. Hloubka průniku záleží ovšem nejen na vlnové délce, ale i na typu tkáně. Mechanismus účinku zahrnuje fotodisociaci a redoxní změny, které způsobují buď přímou reakci centrálního kovu s DNA či proteiny, nebo vedou k uvolnění aktivních částic (např. NO, CO). Jiným mechanizmem účinku může být přeměna energie excitovaného stavu na tepelnou energii a následné zničení nádoru pomocí tepla.[35]

U dvoujaderného komplexu [{(η^6-indan)RuCl}$_2$(μ-2,3-dpp)](PF$_6$)$_2$ *(Obr. 11)*, kde 2,3-dpp je 2,3-bis(2-pyridyl)pyrazin, dochází po fotoaktivaci UV nebo viditelným zářením k odštěpení indanu, jehož fluorescence je přibližně 40 krát vyšší než ve vázané formě. Vysoce reaktivní sloučenina Ru, která vzniká ozářením a odštěpením indanu, se váže na DNA mnohem více a pevněji než původní komplex. Tvoří jak jednovazné, tak i dvouvazné adukty. Tento dvoujaderný komplex tedy nabízí spojení fotoindukovaného cytotoxického účinku se současnou možností sledování průběhu a efektivnosti fotoaktivovaného procesu pomocí detekce fluorescenčního záření uvolněného indanu. Dalším kladem je, že mechanismus účinku této látky je nezávislý na kyslíku, kterého bývá v rakovinných buňkách většinou nedostatek.[36]

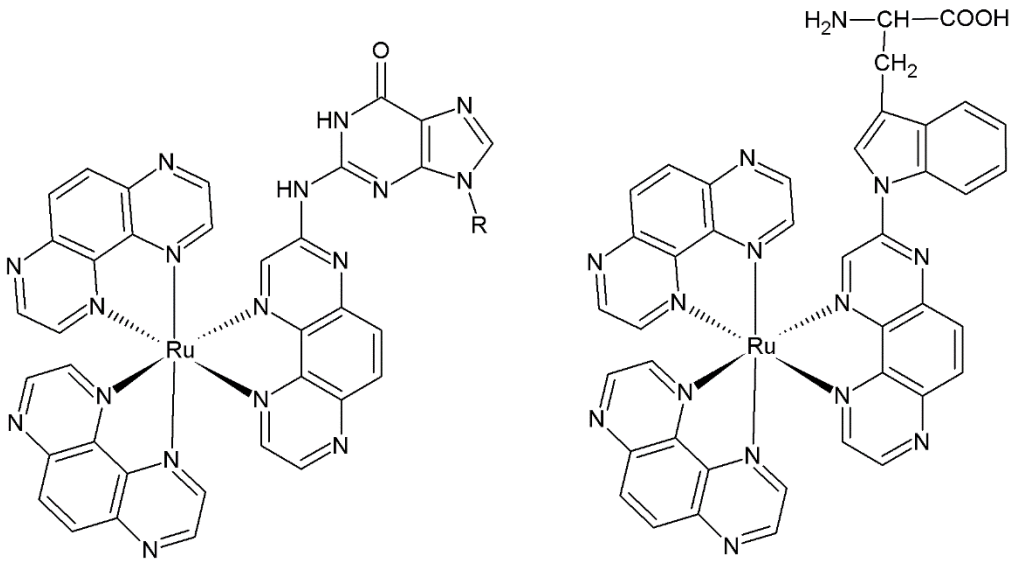


Obr. 11: [{(η^6-indan)RuCl}$_2$(μ-2,3-dpp)](PF$_6$)$_2$, kde 2,3-dpp = 2,3-bis(2-pyridyl)pyrazin[36]

Komplexy ruthenia s polyazaaromatickými ligandy jsou další skupinou látek slibných pro využití v PACT. Tyto sloučeniny obsahují jako centrální atom Ru(II), na který jsou navázány tři bidentátní polyazaaromatické ligandy, jako jsou mimo jiné například 2,2′-bipyridin, 2,2′-bipyrazin, 1,10-fenanthrolin, 1,4,5,8-tetraazafenanthren (TAP) nebo 1,4,5,8,9,12-hexaazatrifenylen (HAT) *(Obr. 12)*. U těchto látek dochází k fotoindukovanému přenosu elektronu z biomolekul, konkrétně z guaninu v případě DNA či tryptofanu z jiné biomolekuly, na excitovaný komplex. Následkem tohoto procesu je štěpení DNA a tvorba fotoaduktů s guaninovými jednotkami DNA či tryptofanem v polypeptidech *(Obr. 13)*. V těchto fotoaduktech vzniká kovalentní vazba mezi biomolekulou a jedním z ligandů, aniž by byla porušena koordinační sféra komplexu. Mohou být využity k zesíťování dvou komplementárních oligonukleotidů, dvou peptidů, či oligonukleotidu a peptidu. Toto zesíťování by mohlo být užitečné například k zablokování telomerázové aktivity. [37,38]



Obr. 12: Některé polyazaaromatické ligandy výše rozebíraných komplexů: 1) 2,2'-bipyridin, 2) 2,2'-bipyrazin, 3) 1,10-fenanthrolin, 4) 1,4,5,8-tetraazafenanthren (TAP) 5) 1,4,5,8,9,12-hexaazatrifenylen (HAT)[38]



Obr. 13: Fotoadukty mezi $[Ru(TAP)_3]^{2+}$ a guaninem (vlevo), kde R= cukr-fosfátová skupina, a mezi $[Ru(TAP)_3]^{2+}$ a tryptofanem (vpravo)[38]

2.9 Schiffovy báze

Tyto látky jsou zde, v teoretické části práce, zmiňovány z toho důvodu, že byly vybrány jako ligandy k přípravě komplexů, o kterých je pojednáváno dále v praktické části této práce.

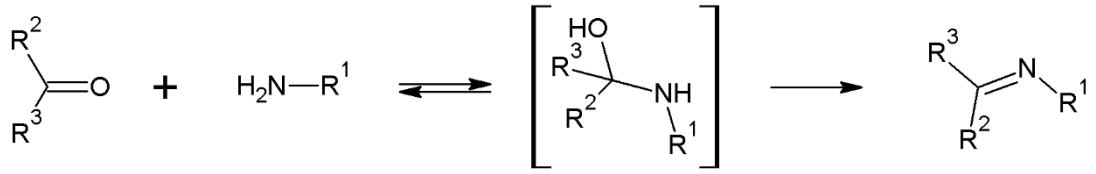
Iminy, známé také pod názvem Schiffovy báze, jak se jim říká podle jejich objevitele, italského chemika Huga Schiffa, jsou látky s charakteristickou vazbou C=N. Můžeme je popsat obecným chemickým vzorcem $R_3R_2C=NR_1$, kde R_2 a R_3 může být alkyl, aryl, heteroaryl nebo vodík a R_1 může být taktéž alkyl, aryl, heteroaryl, vodík, ale i kov resp. polokov (například B, Si, Al atd.).[39]

2.9.1 Příprava Schiffových bází

Existuje mnoho postupů příprav Schiffových bází. V tomto textu budou zmíněny pouze některé možné přípravy *N*-alkyl a *N*-aryl iminů. Asi nejběžnější a velmi jednoduchý postup přípravy iminů je reakce aldehydu resp. ketonu s primárním aminem, kdy vzniká imin

a odštěpuje se molekula vody. *(Obr. 14)* Při tomto postupu se nechá roztok reaktantů refluxovat po dobu několika hodin. Tato reakce může být urychlena přidáním kyselého katalyzátoru. Jsou známy postupy, kdy se používají jak anorganické kyseliny (např. HCl, H_2SO_4), tak i organické (např. p-toluensulfonová kyselina), ale také Lewisovy kyseliny (např. $ZnCl_2$, $TiCl_4$, BF_3Et_2O).[39]

V případě, že používáme alifatický aldehyd, dochází ke kompetitivní reakci – aldolové kondenzaci. Alifatické ketony reagují s aminy pomaleji než aldehydy, zde je potřebná vyšší reakční teplota i reakční doba. Výtěžek může být zvýšen přidáním kyselého katalyzátoru a průběžným odstraňováním vody z reakční směsi. Aromatické ketony jsou méně reaktivní než alifatické a pro produkci iminů jsou nutné drsné podmínky. [39]

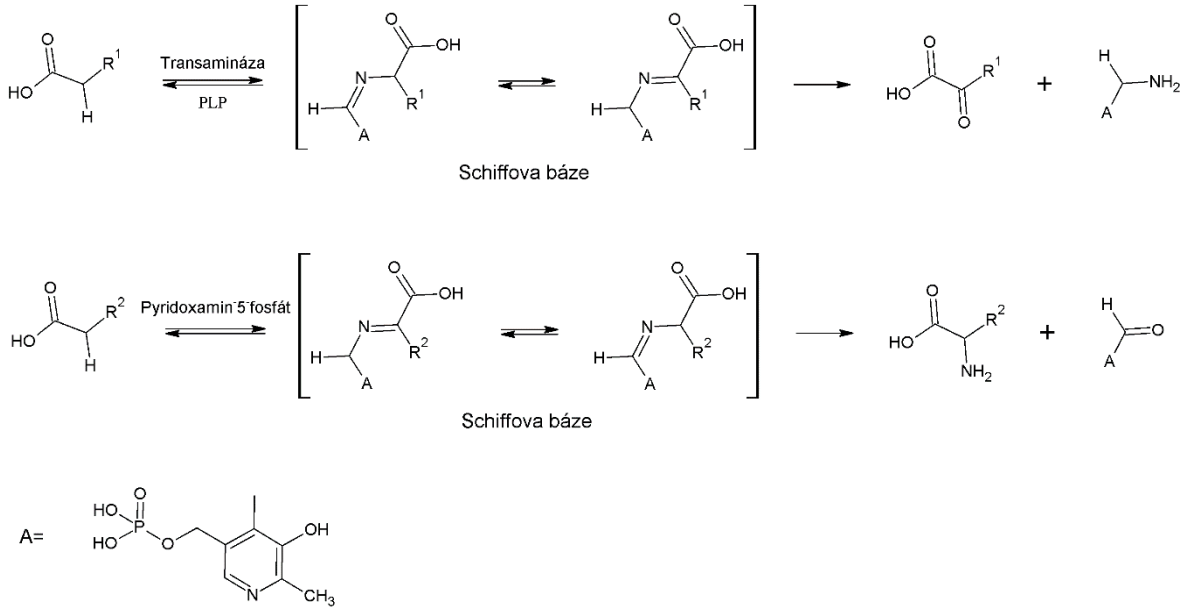


Obr. 14: Schéma přípravy Schiffových bází [39]

Jelikož aldehydy a ketony jsou obvykle získávány oxidací příslušných alkoholů, byla vyvinuta oxidativní metoda, kdy můžeme iminy připravit přímou reakcí alkoholu s aminem. Podobně funguje i syntéza ze dvou aminů. Další možným postupem je reakce organokovového činidla (Grignardova činidla, organolithné sloučeniny) s alifatickými i aromatickými kyanidy.[39]

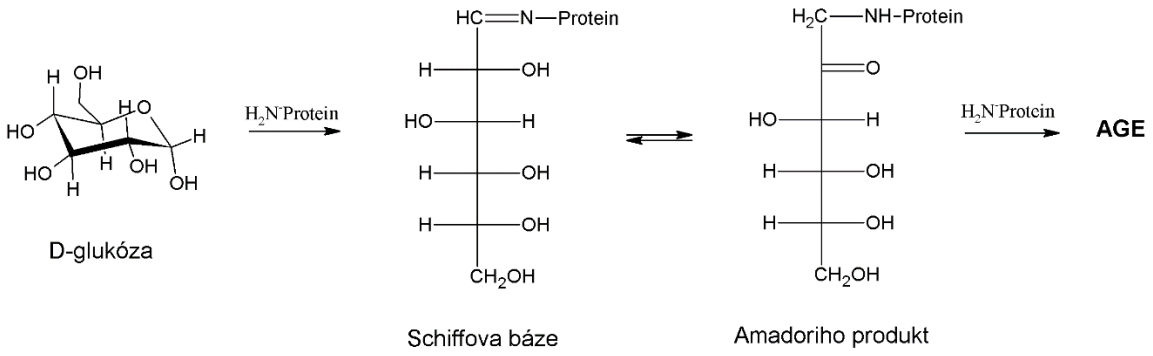
2.9.2 Schiffovy báze v biochemických procesech v lidském těle

Schiffovy báze jsou nedílnou součástí biochemických pochodů v těle. Jedním ze základních biochemických procesů je transaminace, což je reakce, kdy dochází k přeměně aminokyseliny na ketokyselinu a naopak. *(Obr. 15)* [39]



Obr. 15: Schéma transaminace se Schiffovou bází jako meziproduktem [39]

Další důležité bio-procesy souvisí s glykací proteinů (především albuminu) v krvi. Glykace *(Obr. 16)* zahrnuje neenzymatickou adici cukrů a jejich reaktivních derivátů na primární nebo sekundární aminoskupinu proteinů, vzniká první meziprodukt – Schiffova báze, která se postupně přemění na stabilnější meziprodukt – Amadoriho produkt. Z toho po oxidaci, dehydrataci a cross-linku vzniká AGE (Advanced Glycation End – produkt). Značná pozornost byla po několik desetiletí věnována glykovanému albuminu, který se dnes používá jako biomarker pro kontrolu glukózy v krvi.[40] AGEs souvisí také s dalšími patologickými změnami v těle diabetiků, jako jsou nefropatie, retinopatie, vaskulární nemoci atd.[41,42]



Obr. 16: Glykace proteinu glukózou [39]

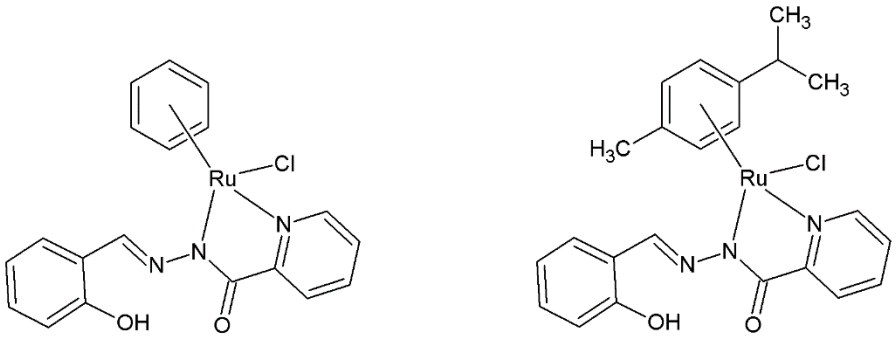
2.9.3 Využití Schiffových bází

Komplexy přechodných kovů se Schiffovými bázemi nacházejí díky svým zajímavým a různorodým vlastnostem využití v mnoha různých odvětvích vědy. Široká škála komplexů různých kovů (Mn, V, Cu, Co, Ti, Ru, Zn…) s iminy našla využití jako oxidační, polymerizační či hydrogenační katalyzátory.[43]

Dále mohou být využity jako elektroluminiscenční materiály pro nové typy plochých displejů, a to konkrétně sloučeniny beryllia a zinku, které vyzařují modrou barvu. Jako elektrochemické sensory se používají například komplexy Ru(III) se Schiffovými bázemi, a to pro stanovení chloridových iontů v séru. Tyto komplexy jsou selektivní pro širokou škálu anorganických i organických látek. Deriváty odvozené od thiofen-2-aldehydu nebo salicylaldehydu a sulfan thiadizolu jsou účinné insekticidy a to včetně některých jejich komplexů. V neposlední řadě mohou být využity jako barviva, polymery, rostlinné růstové regulátory či přísady do antikorozních materiálů.[44]

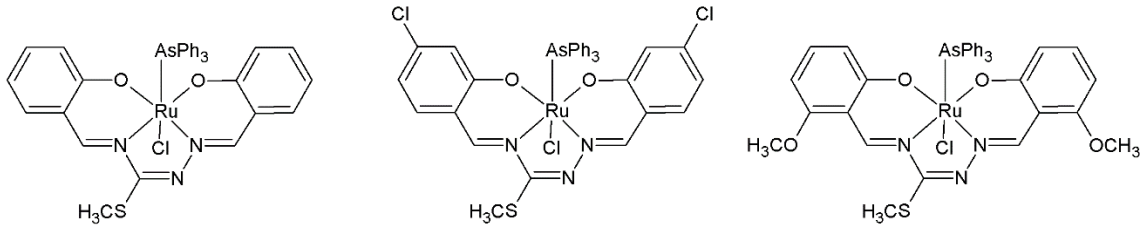
Důvodem, proč jsou však v této práci Schiffovy báze zmiňovány a použity k syntézám, je jejich využití v medicinální chemii mimo jiné jako antimikrobiální, antitumorové či antivirální látky, ať už jde o samotné báze nebo jejich komplexy s kovy.[45]

Jedněmi z těchto potenciálně medicínsky využitelných látek jsou i komplexy Schiffových bází s rutheniem. Například [(*p*-cymen)Ru^{II}LCl] a [(C_6H_6)Ru^{II}LCl], kde L značí salicylaldehyd-2-pikolinylhydrazon *(Obr. 17)*, vykazují vysokou antitumorovou aktivitu a mohly by být v budoucnu zkoumány jako potenciální antitumorová metaloléčiva. Druhý zmíněný komplex byl také aktivní *in vitro* proti osmi druhům vybraných bakterií. Mohl by tudíž najít využití jako antimikrobiální činidlo pro širokou škálu bakterií.[46]



Obr. 17: [(C_6H_6)Ru^{II}LCl] (vlevo) a [(p-cymen)Ru^{II}LCl] (vpravo), L = salicylaldehyd-2-pikolinylhydrazon [46]

Dalšími látkami, které vykazují antitumorovou aktivitu jsou [$Ru^{III}Cl(AsPh_3)L$], kde L jsou *S*-methylisothiosemikarbazony. *(Obr. 18)* Tyto komplexy byly testovány *in vitro* proti MCF-7, což je buněčná linie lidského karcinomu prsu. Bylo zjištěno, že tyto látky jsou proti MCF-7 buněčné linii účinnější než standardní léčivo cisplatina.[47]



Obr. 18: [$Ru^{III}Cl(AsPh_3)L$], L = S-methylisothiosemikarbazony [47]

3 Praktická část

3.1 Materiály a metody

Použité chemikálie byly získány z komerčních zdrojů (Sigma Aldrich, Penta, VWR, Fisher Scientific) a byly použity bez další purifikace. Syntézy výchozí látky [Ru(μ-Cl)(η^6-*p*-cym)Cl]$_2$ a komplexů **1** – **4** byly prováděny v inertní dusíkové atmosféře. Použitá rozpouštědla byla zbavena kyslíku pomocí probublávání dusíkem.

Elementární analýza byla provedena na Flash 2000 analyzátoru (Thermo Scientific), vodivost (10^{-4} M roztoky v dichlormethanu, 25°C) byla stanovena na konduktometru Cond 340i/SET (WTW). Hmotnostní spektra (roztoky v methanolu) byla změřena na LCQ Fleet Ion Trap hmotnostním spektrometru (Thermo Scientific). FTIR spektra byla změřena na spektrometru Nexus 670 FT-IR (ThermoNicolet) (v rozsahu 200 – 4000 cm^{-1}), měření ^{1}H a ^{13}C spekter bylo provedeno na 600 MHz NMR spektrometru JNM-ECA600II (JEOL).

3.2 Syntéza

3.2.1 Syntéza [Ru(μ-Cl)(η^6-p-cym)Cl]$_2$

Syntéza výchozího dimeru [Ru(μ-Cl)(η^6-*p*-cym)Cl]$_2$ byla provedena podle postupu uvedeném v literatuře.[48] $RuCl_3(H_2O)_n$ (0,25 g; 1,03 mmol) byl rozpuštěn v 10 ml methanolu ve vialce pro syntézu v mikrovlnném syntetizátoru. Po úplném rozpuštění $RuCl_3(H_2O)_n$ byl přidán *α*-terpinen (468 μl; 2,88 mmol). Vialka byla vložena do mikrovlnného syntetizátoru a zahřívána za míchání na 140°C po dobu 30 sekund. Po ukončení reakce byla reakční směs vytřepána s hexanem (celkem 3x). Methanolická část byla poté zahuštěna volným odpařováním, kdy došlo k vyloučení produktu cihlové barvy.

[Ru(μ-Cl)(η^6-*p*-cym)Cl]$_2$: Cihlově červený prášek. Výtěžek: 49%. Elementární složení $C_{20}H_{28}Cl_4Ru_2$ (M_r = 612,39): vypočítané: 39,23% C; 4,61% H; 0,00% N; naměřené: 39,59% C; 4,59% H; 0,00% N. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3050s ν(C-H)$_{ar}$, 2961s ν(C-H)$_{al}$ 2869m ν(CH_3), 1443m ν(C=C). ESI + MS (methanol, m/z): 271,00 (calc. 271,97) (50%) [Ru(η^6-*p*-cym)Cl]$^+$; 506,92 (506,98) (35%) [Ru$_2$(η^6-*p*-cym)$_2$Cl]$^+$; 542,89 (542,96) (100%) {[Ru$_2$(η^6-*p*-cym)$_2$Cl$_2$]+H}$^+$; 574,83 (574,92) (60%) [Ru$_2$(η^6-*p*-cym)$_2$Cl$_3$]$^+$.

3.2.2 Syntéza ligandů

L_1 a **L_2**: Do 40 ml ethanolu zahřátého na 60°C byl přidán aldehyd (5 mmol): salicylaldehyd (0,61 g; 0,53 ml) nebo 3-methoxysalicylaldehyd (1,30 g). Poté byl do roztoku přidán 2-aminothiofenol (5 mmol; 0,63 g; 0,54 ml) a reakční směs byla refluxována po dobu 2-4 hodin. Pak byl roztok ponechán stát 24 hodin. Vzniklé práškové produkty v odstínech žluté barvy byly odsáty a promyty ethanolem (3 × 5 ml) a dietyletherem (3 × 5 ml).

L_3 a **L_4**: Do 40 ml ethanolu zahřátého na 60°C byl přidán aldehyd (5 mmol): salicylaldehyd (0,61 g; 0,53 ml) nebo 3-methoxysalicylaldehyd (1,30 g). Poté byl do roztoku přidán 2-aminofenol (5 mmol; 0,55 g) a poté byla reakční směs míchána za pokojové teploty po dobu 3-5 hodin. Roztok byl ponechán stát 24 hodin. Vzniklé práškové produkty v odstínech oranžové barvy byly odsáty a promyty ethanolem (3 × 5 ml) a dietyletherem (3 × 5 ml).

salicyliden-2-aminothiofenol (**L_1**): Žlutý prášek. Výtěžek: 83%. Elementární složení $C_{13}H_{11}NOS$ (M_r = 229,30): vypočítané: 68,09% C; 4,84% H; 6,11% N; naměřené: 68,10% C; 4,36% H; 6,02% N. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3052w,br ν(C-H)$_{ar}$, 2985w,br ν(C-H)$_{al}$, 1609s ν(C=N), 1461s ν(C=C), 1365m ν(C-S), 1182m ν(C-O). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 12,85 (1H, bs, O15H); 8,70 (1H, s, C7H); 7,65 (1H, m, C13H); 7,47 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, C3H); 7,43 (1H, m, C11H); 7,25 (1H, m, C4H); 7,21 (2H, m, C5H, C10H); 7,11 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, C6H); 6,98 (1H, t, *J* = 7,9 Hz, C12H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 162,86 (C7); 161,27 (C9); 145,89 (C1); 136,99 (C2); 134,07; 132,88 (C3, C11); 131,43 (C13); 127,96 (C4); 127,87 (C10); 119,32 (C8); 118,89 (C12); 117,80 (C6); 117,49 (C5). ESI + MS (methanol, m/z): 228,08 (calc. 229,06) (32%) $[L_1+H]^+$; 456,99 (457,10) (35%) $[2L_1+H]^+$; 479,01 (479,09) (100%) $[2L_1+Na]^+$.

3-methoxysalicyliden-2-aminothiofenol (**L_2**): Žlutý prášek. Výtěžek: 76%. Elementární složení $C_{14}H_{13}NO_2S$ (M_r = 259,32): vypočítané: 64,84% C; 5,05% H; 5,40% N; naměřené: 64,89% C; 4,58% H; 5,51% N. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3052w,br ν(C-H)$_{ar}$, 2968w,br ν(C-H)$_{al}$, 2838w ν(CH_3), 1611m ν(C=N), 1455s ν(C=C), 1391w ν(C-S), 1245s ν(C-O). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 13,27 (1H, s, O15H – forma B); 12,85 (1H, s, O15H – forma A); 8,66 (1H, s, C7H – forma A); 8,01 (1H, d, *J* = 7,9 Hz); 7,91 (1H, d, *J* = 7,9 Hz); 7,68 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 7,52 (1H, m); 7,42 (1H, m); 7,33 (1H, d, *J* = 7,9 Hz); 7,21 (3H, m); 7,03 (3H, m); 6,91 (2H, m) – 14 aromatických vodíků; 3,97 (6H, s, C16H – formy A a B). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, δ,

ppm): 169,31 (C7 – forma B); 162,64 (C7 - forma A); 151,69 (C9 – A); 151,21 (C9 – B); 148,97 (C10 – A); 148,51 (C10 – B); 148,20 (C1 – B); 145,82 (C1 – A); 132,62 (C2 – A); 131,75 (C2 – B); 127,82; 127,33; 126,84; 126,78; 126,66; 125,52; 123,96; 122,21; 121,45; 119,94 (C8 – A); 119,06; 118,73; 117,42; 116,77 (C8 – B); 115,04; 114,02; 56,20 (C16); 56,15 (C16). ESI + MS (methanol, m/z): 258,09 (calc. 259,07) (25%) $[L_2+H]^+$; 517,02 (517,13) (25%) $[2L_2+H]^+$; 539,04 (539,11) (100%) $[2L_2+Na]^+$.

salicyliden-2-aminofenol (**L_3**): Oranžový prášek. Výtěžek: 85%. Elementární složení $C_{13}H_{11}NO_2$ (M_r = 213,23): vypočítané: 73,23% C; 5,20% H; 6,57% N; naměřené: 73,11% C; 5,24% H; 6,37% N. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3044w,br $\nu(C\text{-}H)_{ar}$, 1627s, 1611s, 1589s $\nu(C{=}N)$, 1452s $\nu(C{=}C)$, 1240s, 1217s $\nu(C\text{-}O)$. ^1H NMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 12,27 (1H, bs, O15H); 8,70 (1H, s, C7H); 7,43 (2H, m, C11H, C13H); 7,24 (1H, m, C4H); 7,16 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, C6H); 7,05 (2H, m, C3H, C5H); 6,99 (2H, m, C10H, C12H); 5,80 (1H, bs, O14H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 164,00 (C7); 160,49 (C9); 149,83 (C1); 135,77 (C2); 133,75; 132,72 (C11, C13); 128,77 (C4); 121,04; 119,59 (C10, C12); 119,25 (C8); 118,28 (C6); 117,25; 115,83 (C3, C5). ESI + MS (methanol, m/z): 214,13 (calc. 214,09) (100%) $[L_3+H]^+$.

3-methoxysalicyliden-2-aminofenol (**L_4**): Oranžový prášek. Výtěžek: 90%. Elementární složení $C_{14}H_{13}NO_3$ (M_r = 243,26): vypočítané: 69,12% C; 5,39% H; 5,76% N; naměřené: 69,00% C; 5,45% H; 5,52% N. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3040m,br $\nu(C\text{-}H)_{ar}$, 2900m,br $\nu(C\text{-}H)_{al}$, 2886m $\nu(CH_3)$, 1617m $\nu(C{=}N)$, 1505s $\nu(C{=}C)$, 1161s $\nu(C\text{-}O)$. ^1H NMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 12,53 (1H, bs, O15H); 8,72 (1H, s, C7H); 7,24 (1H, m, C13H); 7,19 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, C4H); 7,09 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, C6H); 7,04 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, C3H, C5H); 6,96 (2H, m, C11H, C12H); 5,83 (1H, bs, O14H); 3,95 (3H, s, C16H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 163,43 (C7); 150,62 (C9); 149,94 (C1); 148,37 (C10); 135,40 (C2); 128,87 (C13); 123,89 (C6); 119.27 (C8); 121,00; 119,14 (C11, C12); 118,11 (C4); 115,90; 115,10 (C3, C5); 56,19 (C16). ESI + MS (methanol, m/z): 244,14 (calc. 244,10) (40%) $[L_4+H]^+$; 266,06 (266,08) (100%) $[L_4+Na]^+$.

3.2.3 Syntéza komplexů

$[Ru(\mu\text{-}Cl)(\eta^6\text{-}p\text{-cym})Cl]_2$ (61,24 mg; 0,1 mmol) a příslušný imin (0,2 mmol): salicyliden-2-aminothiofenol (**L_1**) (45,86 mg), 3-methoxysalicyliden-2-aminothiofenol (**L_2**) (51,86 mg), salicyliden-2-aminofenol (**L_3**) (42,6 mg) nebo 3-methoxysalicyliden-2-

aminofenol (**L_4**) (48,7 mg) byly rozpuštěny v minimálním množství dichlormethanu, [Ru(μ-Cl)(η^6-*p*-cym)Cl]$_2$ přibližně v 10 ml a iminy přibližně ve 4 ml. Tyto roztoky byly smíseny a míchány za laboratorní teploty 1 – 1,5 hodiny. Poté bylo v inertní atmosféře zredukováno rozpouštědlo a izolován produkt.

[Ru(η^6-*p*-cym)(L_1)Cl$_2$] (**1**): Hnědočervený prášek. Výtěžek: 66%. Elementární složení $C_{23}H_{24}Cl_2NORuS$ (M_r = 534,48): vypočítané: 51,68% C; 4,53% H; 2,62% N; naměřené: 51,93% C; 4,69% H; 2,60% N. Λ_M (S·cm^2·mol^{-1}) = 0,64. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3051m ν(C-H)$_{ar}$, 2961s ν(C-H)$_{al}$, 2868m ν(CH$_3$), 1611s ν(C=N), 1462s ν(C=C), 1364w ν(C-S), 1184m ν(C-O), 461m, 448m ν(Ru-N), 291s ν(Ru-Cl). ^{1}H NMR (CDCl$_3$, δ, ppm): 8,65 (1H, s, C7H); 7,71 (1H, d, *J* = 8,1 Hz); 7,44 (2H, m); 7,13 (3H, m); 6,99 (2H, m) – 8 aromatických H; 5,47 (2H, m, arom. H – *p*-cym); 5,35 (2H, m, arom. H – *p*-cym); 2,87 (1H, m, C<u>H</u>(CH$_3$)$_2$ – *p*-cym); 2,33 (3H, s, CH$_3$ – *p*-cym); 1,24 (6H, d, *J* = 7,3 Hz, CH(C<u>H</u>$_3$)$_2$ – *p*-cym). ESI + MS (methanol, m/z): 271,05 (calc. 271,99) (62%) [Ru(η^6-*p*-cym)Cl]$^+$; 360,11 (360,97) (32%) [Ru(L_1)(OCH$_3$)]$^+$; 463,08 (464,06) (26%) [Ru(η^6-*p*-cym)(L_1)]$^+$; 507,01 (506,95) (25%) [Ru$_2$(η^6-*p*-cym)$_2$Cl]$^+$; 543,00 (542,97) (100%) {[Ru$_2$(η^6-*p*-cym)$_2$Cl$_2$]+H}$^+$; 576,94 576,74) (80%) [Ru$_2$(η^6-*p*-cym)$_2$Cl$_3$]$^+$; 588,84 588,07) (38%) {[Ru$_2$(η^6-*p*-cym)$_2$(OCH$_3$)$_3$]+Na}$^+$; 665,76 (665,91) (30%) {[Ru$_2$(η^6-*p*-cym)(L_1^-)Cl$_2$(OCH$_3$)]+H}$^+$.

[Ru(η^6-*p*-cym)(L_2)Cl$_2$] (**2**): Hnědooranžový prášek. Výtěžek: 32%. Elementární složení $C_{24}H_{26}Cl_2NO_2RuS$ (M_r = 564,51): vypočítané: 51,37% C; 4,59% H; 2,55% N; naměřené: 51,19% C; 4,63% H; 2,35% N. Λ_M (S·cm^2·mol^{-1}) = 0,73. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3052m ν(C-H)$_{ar}$, 2960m ν(C-H)$_{al}$, 2868m ν(CH$_3$), 1644w ν(C=N), 1466s ν(C=C), 1389m ν(C-S), 1247s ν(C-O), 457w, 447m ν(Ru-N), 292m ν(Ru-Cl). ^{1}H NMR (CDCl$_3$, δ, ppm): 11,14 (1H, s); 9,93 (1H, s); 8,14 (1H, bs); 7,93 (1H, d, *J* = 7,3 Hz); 7,55 (1H, m); 7,45 (1H, m); 7,13 (1H, m); 7,03 (1H, m); 6,99 (1H, m) – 7 aromatických H; 5,48 (2H, d, *J* = 5,9 Hz, arom. H – *p*-cym); 5,35 (2H, d, *J* = 5,9 Hz, arom. H – *p*-cym); 3,94 (3H, s, C16H), 2,93 (1H, m, C<u>H</u>(CH$_3$)$_2$ – *p*-cym); 2,17 (3H, s, CH$_3$ – *p*-cym); 1,29 (6H, d, *J* = 7,3 Hz, CH(C<u>H</u>$_3$)$_2$ – *p*-cym). ESI + MS (methanol, m/z): 271,08 (calc. 270,98) (6%) [Ru(η^6-*p*-cym)Cl]$^+$; 360,12 (360,97) (14%) [Ru(L_2)]$^+$; 492,14 (493,06) (100%) [Ru(η^6-*p*-cym)(L_2^-)]$^+$; 543,00 (542,97) (8%) {[Ru$_2$(η^6-*p*-cym)$_2$Cl$_2$]+H}$^+$; 576,98 (576,93) (14%) [Ru$_2$(η^6-*p*-cym)$_2$Cl$_3$]$^+$; 665,82 (665,73) (34%) {[Ru$_2$(η^6-*p*-cym)(L_2)Cl$_2$]+H}$^+$.

[Ru(η^6-*p*-cym)(L_3)Cl_2] (**3**): Hnědooranžový prášek. Výtěžek: 45%. Elementární složení $C_{23}H_{24}Cl_2NO_2Ru$ (M_r = 518,42): vypočítané: 53,29% C; 4,67% H; 2,70% N; naměřené: 53,10% C; 5,12% H; 2,52% N. Λ_M ($S \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$) = 0,78. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3199m ν(O-H) 3047s, 3033s $\nu(C\text{-}H)_{ar}$, 2961s $\nu(C\text{-}H)_{al}$, 2870m $\nu(CH_3)$, 1640m, 1607s ν(C=N), 1466s ν(C=C), 457s, 448s ν(Ru-N), 292w ν(Ru-Cl). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 8,38 (1H, bs, C7H); 7,38 (1H, m); 7,13 (2H, m); 7,12 (3H, m); 6,99 (1H, m); 6,85 (1H, m); – 8 aromatických H; 5,48 (2H, d, *J* = 5,9 Hz, arom. H – *p*-cym); 5,35 (2H, d, *J* = 5,9 Hz, arom. H – *p*-cym); 2,76 (1H, m, C<u>H</u>$(CH_3)_2$ – *p*-cym); 2,12 (3H, s, CH_3 – *p*-cym); 1,18 (6H, d, *J* = 7,3 Hz, CH(C<u>H</u>$_3)_2$ – *p*-cym). ESI + MS (methanol, m/z): 214,19 (calc. 214,09) (8%) $[(L_3)+H]^+$; 271,05 (270,08) (8%) [Ru(η^6-*p*-cym)Cl]$^+$; 314,09 (314,98) (2%) $[Ru(L_3)]^+$; 448,12 (449,09) (100%) [Ru(η^6-*p*-cym)(L_3)]$^+$; 507,00 (507,00) (4%) $[Ru_2(\eta^6\text{-}p\text{-cym})_2Cl]^+$; 542,97 (542,97) (20%) $\{[Ru_2(\eta^6\text{-}p\text{-cym})_2Cl_2]+H\}^+$; 576,95 (576,95) (35%) $[Ru_2(\eta^6\text{-}p\text{-cym})_2Cl_3]^+$.

[Ru(η^6-*p*-cym)(L_4)Cl_2] (**4**): Hnědočervený prášek. Výtěžek: 39%. Elementární složení $C_{24}H_{26}Cl_2NO_3Ru$ (M_r = 548,44): vypočítané: 52,56% C; 4,78% H; 2,55% N; naměřené: 52,21% C; 4,67% H; 2,33% N. Λ_M ($S \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$) = 0,60. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3049m, 3031m $\nu(C\text{-}H)_{ar}$, 2958s $\nu(C\text{-}H)_{al}$, 2868m $\nu(CH_3)$, 1614s ν(C=N), 1458s ν(C=C), 1161m ν(C-O), 461m, 448w ν(Ru-N), 291s ν(Ru-Cl). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, δ, ppm): 8,83 (1H, s, C7H); 7,36 (1H, m); 7,13 (2H, m); 7,09 (1H, m); 6,98 (3H, m) – 7 aromatických H; 5,48 (2H, d, *J* = 5,9 Hz, arom. H – *p*-cym); 5,35 (2H, d, *J* = 5,9 Hz, arom. H – *p*-cym); 3,96 (3H, s, C16H), 2,88 (1H, m, C<u>H</u>$(CH_3)_2$ – *p*-cym); 2,33 (3H, s, CH_3 – *p*-cym); 1,24 (6H, d, *J* = 7,3 Hz, CH(C<u>H</u>$_3)_2$ – *p*-cym). ESI + MS (methanol, m/z): 244,18 (calc. 244,10) (12%) $[(L_4)+H]^+$; 271,04 (270,98) (6%) [Ru(η^6-*p*-cym)Cl]$^+$; 344,14 (344,99) (2%) $[Ru(L_4)]^+$; 478,15 (479,10) (100%) [Ru(η^6-*p*-cym)(L_4)]$^+$; 506,98 (506,00) (8%) $[Ru_2(\eta^6\text{-}p\text{-cym})_2Cl]^+$; 542,96 (542,97) (22%) $\{[Ru_2(\eta^6\text{-}p\text{-cym})_2Cl_2]+H\}^+$; 576,92 (576,95) (22%) $[Ru_2(\eta^6\text{-}p\text{-cym})_2Cl_3]^+$.

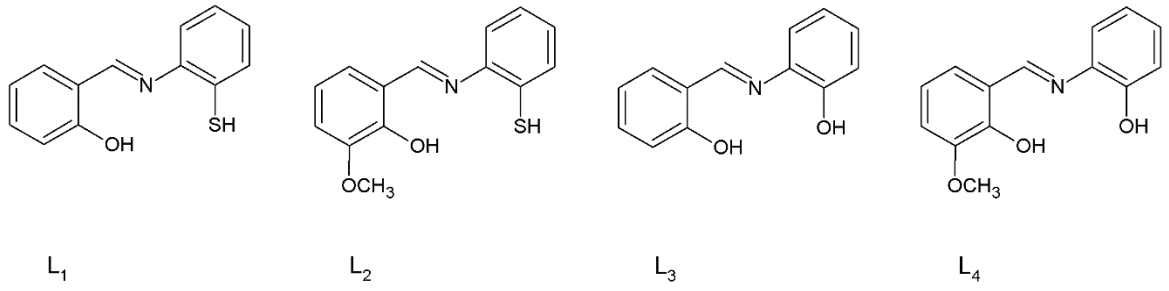
3.3 Výsledky a diskuze

Ruthenaté organokovové polosendvičové sloučeniny jsou velice slibnou skupinou látek pro možné využití v léčbě rakoviny. Dříve publikované práce ukazují, že vhodné strukturní uspořádání pro vysokou protinádorovou aktivitu je $[Ru(aren)(L)X]^{n+}$, kde aren představuje vhodný aromatický kruh, např. *p*-cymen, L je bidentátní, nejčastěji N,N-, N,O-, nebo i O,O-donorový ligand a X je potenciálně odštěpitelný ligand, např. Cl^-. Aniontem pro tento typ komplexních kationtů může být např. PF_6^-.[49,31,50] V této práci byly vybrány jako

ligandy pro Ru(II) polosendvičové komplexy právě Schiffovy báze, které představují variabilní skupinu látek s mnoha různými možnostmi koordinace na centrální atom.

3.3.2 Připravené Schiffovy báze a jejich vlastnosti

Pro tuto práci byly zvoleny jako ligandy Schiffovy báze salicyliden-2-aminothiofenol (**L_1**), 3-methoxysalicyliden-2-aminothiofenol (**L_2**), salicyliden-2-aminofenol (**L_3**), 3-methoxysalicyliden-2-aminofenol (**L_4**) *(Obr. 19)*. Tyto látky byly vybrány právě proto, že představují polydentátní ligandy, které se v dříve publikovaných pracích koordinují v komplexech ruthenia jak bidentátně, např. $[Ru(CO)_4L]$ (L = salicyliden-2-aminothiofenol),[51] tak i tridentátně, např. $[Ru(CO)(PPh_3)_2L]$ (L = salicyliden-2-aminothiofenol nebo 3-methoxysalicyliden-2-aminothiofenol).[52]

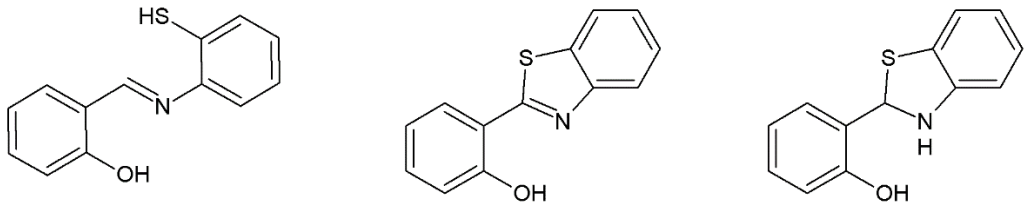


Obr. 19: Ligandy zvolené pro syntézu Ru(II) polosendvičovích komplexů

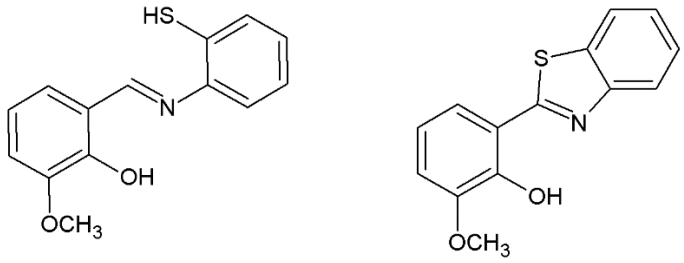
Ligandy **L_1** – **L_4** pro následnou syntézu komplexů byly připraveny klasickou reakcí aldehydu s primárním aminem.[39] Reakční směs aldehydu a primárního aminu v ethanolu byla po dobu 2-5 hodin refluxována (v případě ligandů **L_1** a **L_2**) nebo míchána za pokojové teploty (v případě ligandů **L_3** a **L_4**).

Výsledky elementární analýzy se shodovaly s teoretickými výpočty a rozdíl mezi nimi nebyl větší než 0,48%. Pomocí dalších použitých analytických technik bylo zjištěno, že připravené ligandy **L_1** a **L_2** obsahují i zacyklenou formu s benzothiazolovým skeletem *(Obr. 20 a Obr. 21)*. Z ^{1}H a ^{13}C NMR spekter vyplývá, že dominantní formou pro **L_1** je forma A. Podle dalších minoritních signálů s integrální intenzitou cca 10% je pravděpodobná přítomnost dalších částic souvisejících se zacyklením této Schiffovy báze. Z těchto signálů lze usuzovat na formu C. Na přítomnost formy B usuzujeme z hmotnostních spekter *(Obr. 22)*.

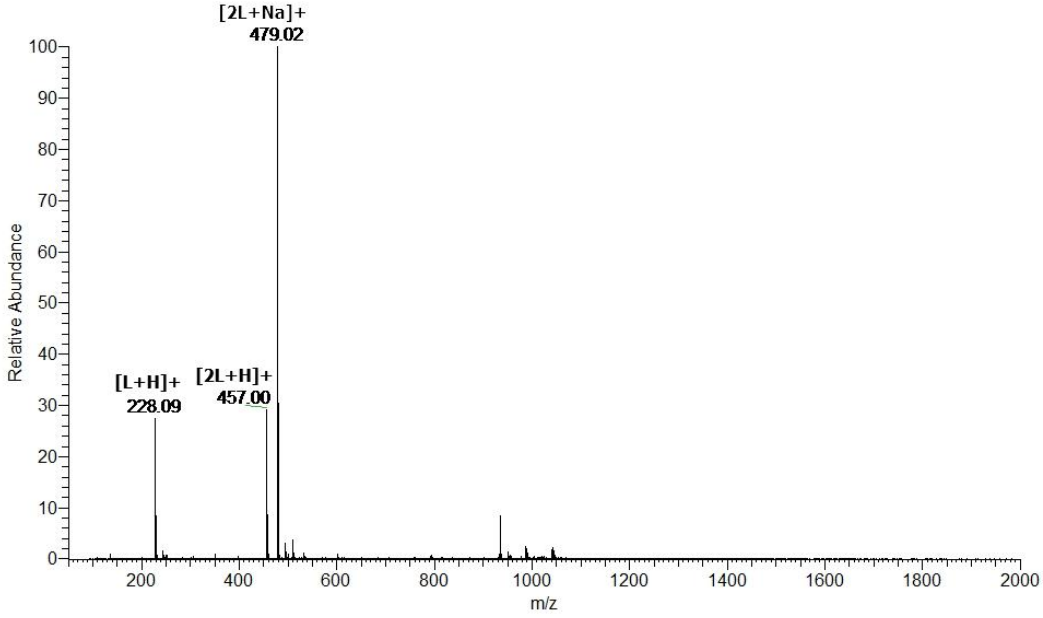
Výsledky v kladném ionizačním módu naznačují právě tuto strukturu, která má o jeden vodík méně než forma A a forma B. V případě ligandu **L₂** jsou přítomny formy A a B v poměru 1 : 1 *(Obr. 21)*. Forma B opět vyplývá z hmotnostních spekter, podobně jako u **L₁**. Ligandy **L₃** a **L₄** byly připraveny jako čistá chemická individua *(Obr. 19)*.



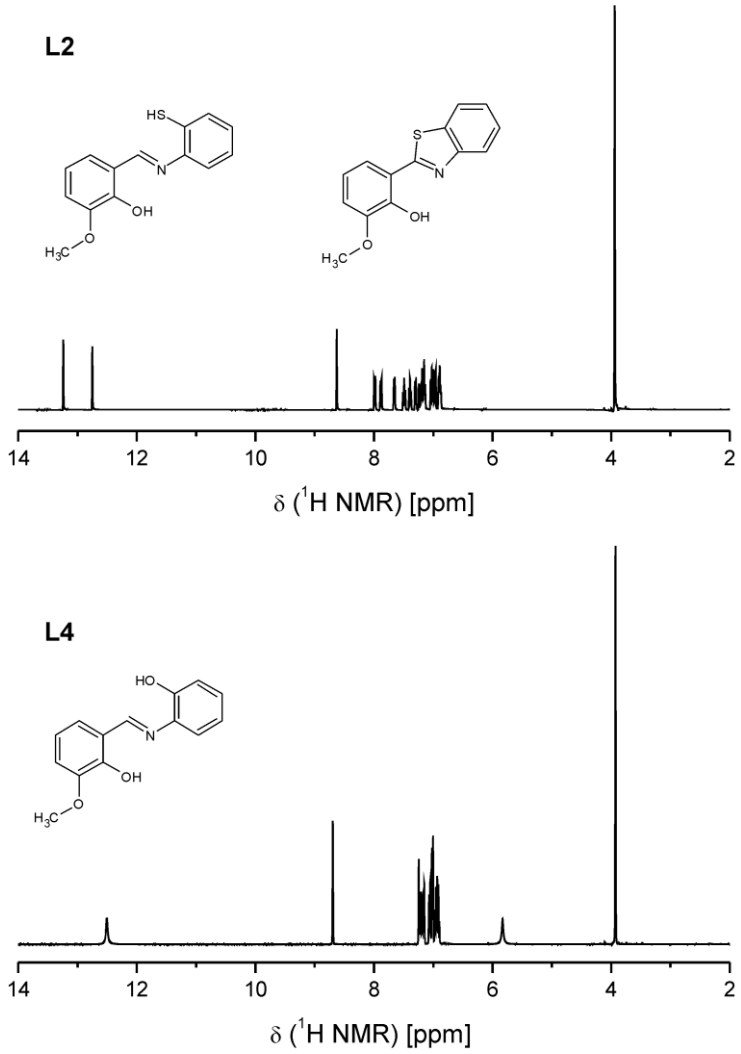
*Obr. 20: Struktury připraveného ligandu **L₁**: forma A (vlevo), forma B (uprostřed) a forma C (vpravo)*



*Obr. 21: Struktury připraveného ligandu **L₂**: forma A (vlevo) a forma B (vpravo)*

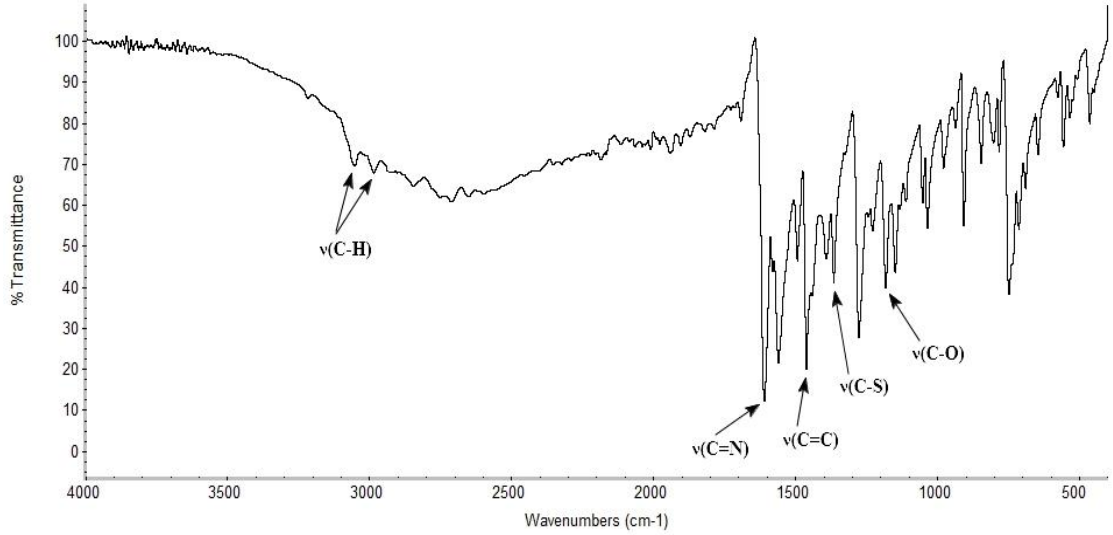


*Obr. 22: Hmotnostní spektrum ligandu **L₁***



Obr. 23: Srovnání ^{1}H NMR spekter ligandů ***L₂*** *a* ***L₄***

U všech připravených ligandů byla měřena IR spektra *(Obr. 24)*. Široké pásy v oblasti 3100-2900 cm^{-1} s těžko identifikovatelnými maximy náleží vibracím $\nu(C\text{-}H)_{ar}$ a $\nu(C\text{-}H)_{al}$. U ligandu **L₂** a **L₄** se vyskytuje pík v oblasti 2886-2838 cm^{-1}, který je možné přiřadit vibraci $\nu(CH_3)$ u methoxyskupiny. Důležitou vibrací je vibrace ν(C=N), která se nachází v oblasti okolo 1610 cm^{-1} a která potvrzuje přítomnost vazby charakteristické pro Schiffovy báze. Píky v rozmezí 1505-1452 cm^{-1} náleží vibraci $\nu(C{=}C)_{ar}$. Píky u ligandů **L₁** a **L₂** v oblasti okolo 1365 cm^{-1} mohou být přiřazeny vibraci ν(C-S). Vibraci $\nu(C\text{-}O)_{ar}$ náleží hodnoty v rozmezí 1245-1161 cm^{-1}.[53]



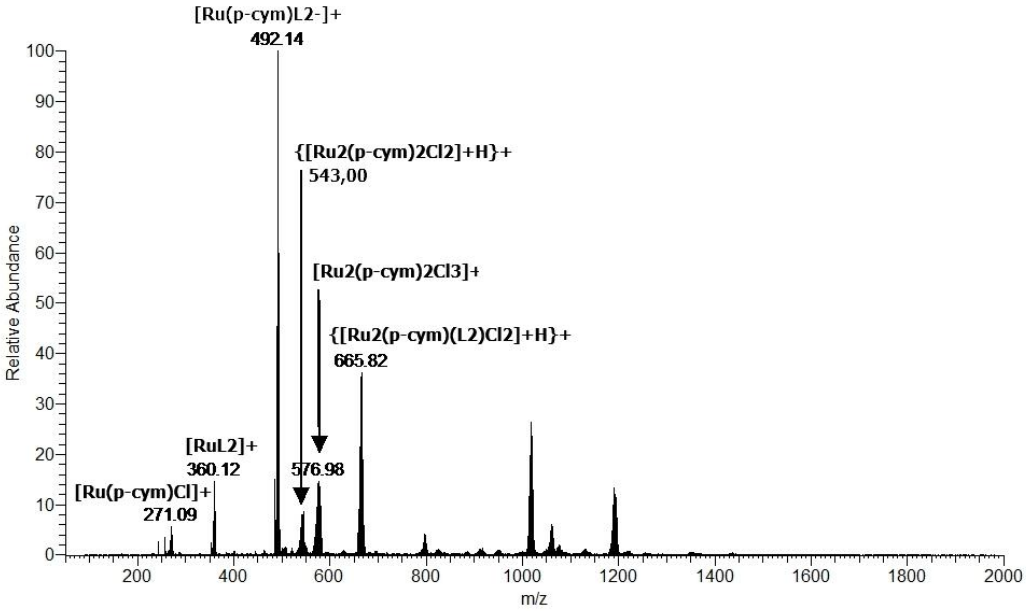
Obr. 24: Infračervené spektrum ligandu $\boldsymbol{L_1}$ *ve střední oblasti*

3.3.3 Připravené komplexy a jejich charakterizace

Hnědooranžové a hnědočervené komplexy **1** – **4** byly připraveny reakcí [Ru(μ-Cl)(η^6-*p*-cym)Cl]$_2$ s příslušnými ligandy v poměru 1 : 2 v dichlormethanu za laboratorní teploty v inertním prostředí za použití septové techniky po dobu 60 – 90 minut. Průběh těchto reakcí byl sledován pomocí tenkovrstevné chromatografie (mobilní fáze: 7% methanol v dichlormethanu). Po ukončení reakcí nebyla na chromatogramu pozorována stopa výchozího dimeru ani ligandu, přítomna byla pouze jediná nová skvrna, která byla přisouzena nově vzniklému komplexu.

V případě komplexů **1** a **2** nemohla být reakční doba, teplota ani hodnota pH pro případnou deprotonizaci ligandu výrazně optimalizována. Důvodem byl pravděpodobný rozklad produktu, který se projevil jako barevná změna reakční směsi, která se změnila z oranžové či načervenalé na tmavě hnědou až černou, v některých případech na tmavě fialovou. Analyzován pomocí CHN prvkové analýzy byl i takto vzniklý tmavý práškový produkt, ale analýza prokázala pravděpodobný rozklad ligandu a vznik Ru(II/III) komplexu s produktem tohoto rozkladu. Procentuální obsah C,H i N byl výrazně nižší než v případě koordinace celého ligandu. Ze stejného důvodu znemožňujícího úpravu reakčních podmínek nebylo možné ani ponechat komplexy volně krystalizovat pomalým odpařováním reakčního roztoku, protože stáním na vzduchu za laboratorní i snížené (4°C) teploty i ve tmě docházelo k výše popsaným barevným změnám. Proto bylo přistoupeno ke krystalizaci produktu redukcí objemu reakční směsi za inertních podmínek.

Výsledné komplexy **1** a **2** byly v první fázi podrobeny CHN elementární analýze, která jednoznačně prokázala složení [Ru(η^6-*p*-cym)(L_1/L_2)Cl_2] s velmi dobrou shodou naměřených a vypočtených hodnot, které se nelišily o více než 0,25%. Provedeno bylo i měření molární vodivosti v dichlormethanu, které ukázalo, že roztoky komplexů se chovají jako neelektrolyty. Studie rozpustnosti komplexů v rozpouštědlech, konkrétně v nitromethanu, methanolu, vodě, chloroformu, acetonu, *N*,*N*-dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu, ukázala na jejich roztokovou nestabilitu. Opět byla pozorována postupná barevná změna: z oranžových roztoků na hnědočerné, u některých až nazelenalé. V dimethylsulfoxidu došlo k této barevné změně okamžitě. Ve vodě byly připravené komplexy jen částečně rozpuštěny, k barevným změnám však docházelo stejně jako u ostatních rozpouštědel. Hmotnostní spektra naměřená v methanolu v kladném ionizačním módu ukázala přítomnost fragmentů [Ru(η^6-*p*-cym)(L_1/L_2^-)]$^+$, ale dále pak i fragmenty analogické hmotnostnímu spektru samotného výchozího dimeru. Konkrétně fragmenty [Ru(η^6-*p*-cym)Cl]$^+$, {[Ru_2(η^6-*p*-cym)$_2Cl_2$]+H}$^+$ a [Ru_2(η^6-*p*-cym)$_2Cl_3$]$^+$ *(Obr. 25).*



*Obr. 25: Hmotnostní spektrum komplexu **2***

^{1}H NMR spektra obou připravených komplexů ukázala obdobné výsledky. Jednak pravděpodobnou přítomnost příslušného komplexu a současně byly identifikovány signály jedné další částice obsahující *p*-cymen. V případě komplexu **1** byla tato částice dokonce v nadbytku oproti samotnému komplexu v poměru 2 : 1, u komplexu **2** byla tato částice

přítomna v poměru přibližně 1 : 5. Tento výsledek je ale v jednoznačné neshodě s výsledky CHN elementární analýzy, proto lze usoudit, že přítomnost směsi v roztoku je způsobena roztokovou nestabilitou komplexů a jejich rozkladem.

Vliv na reakci ligandů **L_1** a **L_2** s výchozím dimerním komplexem a celkovou stabilitu může mít i fakt, že samotné ligandy nevznikají při Schiffově kondenzaci jako chemická individua, ale dochází k částečné cyklizaci a vzniku jednak očekávané Schiffovy báze, ale také produktu obsahujícího benzothiazolový skelet *(viz Obr. 20)*. V práci, kterou publikovali v roce 1967 L. F. Lindoy a S. E. Livingstone, je popsána zpětná decyklizace jako důsledek reakce se sloučeninou přechodného kovu.[54] Tato decyklizace se ale neprokázala v případě komplexu **2**, který jednoznačně na základě výsledků ^{1}H NMR spektroskopie neobsahuje ligand **L_2** ve formě Schiffovy báze (nepřítomnost vodíku C7H na dvojné vazbě C=N). Reakce s výchozím dimerem v tomto případě tedy podpořila spíše cyklizaci ligandu. V případě komplexu **1** je signál vodíku C7H posunut o 0,12 ppm, což může souviset s koordinací přes sousedící atom dusíku. Z hmotnostních spekter měřených v methanolu vyplývá, že v methanolickém roztoku komplex **2** obsahuje mimo Schiffovu bázi také cyklickou strukturu ligandu.

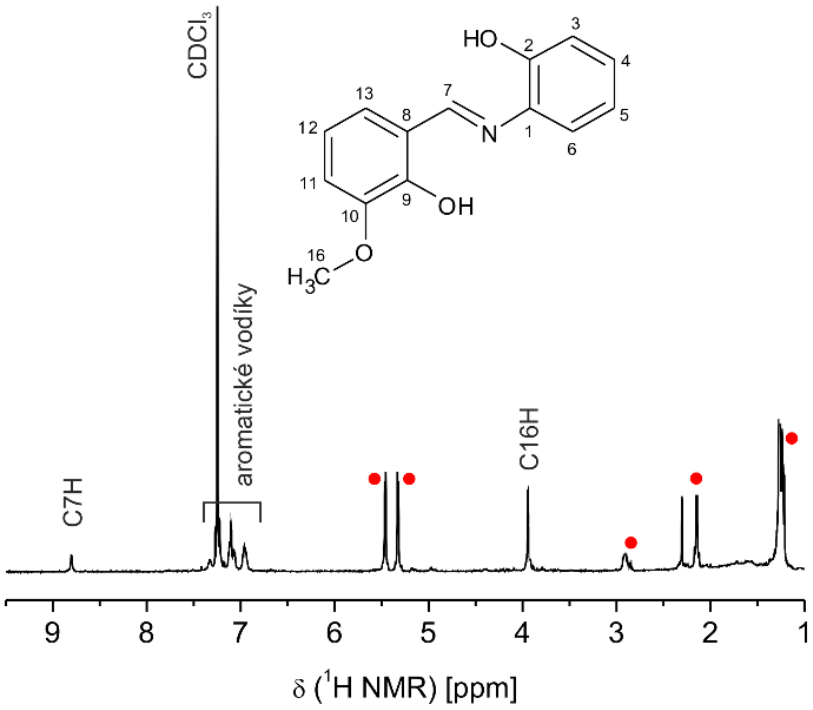
Na základě výše uvedených skutečností nebyly provedeny další analytické roztokové analýzy jako ^{13}C a 2D NMR spektroskopie, UV-Vis spektroskopie apod.

Na základě výsledků charakterizace pro komplexy **1** a **2** byly jako další ligandy zvoleny látky **L_3** a **L_4**, což jsou analoga ligandů **L_1** a **L_2**, která neobsahují –SH skupinu, ale –OH skupinu ve stejné poloze. Tyto látky byly zvoleny z toho důvodu, že s podobnými Schiffovými bázemi již byly publikovány Ru(II) polosendvičové komplexy.[55] Komplexy **3** a **4** byly připraveny analogickým způsobem jako komplexy **1** a **2**. Byl vyzkoušen také publikovaný postup, kdy byl pro deprotonizaci ligandu použit methanolát sodný, ten ale vedl k práškovému produktu, který jednoznačně nebyl chemickým individuem. Výsledky charakterizace komplexů **3** a **4** ukázaly obdobná data jako u komplexů **1** a **2**.

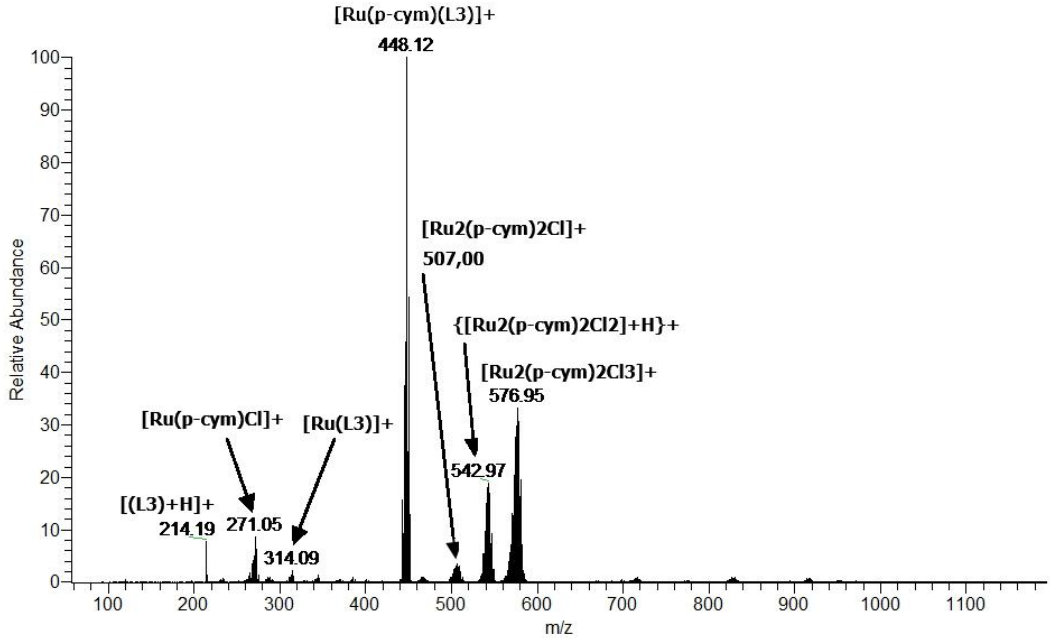
Výsledky prvkové analýzy se opět shodovaly s teoretickými s rozdílem ne větším než 0,45%. Studie rozpustnosti a výsledky měření konduktivity se shodovaly s výsledky zjištěnými u komplexů **1** a **2**. V případě NMR spektroskopie byla opět naměřena pouze ^{1}H NMR spektra, protože ukázala na přítomnost dalších částic obsahujících *p*-cymen, tedy na pravděpodobný rozklad v roztoku chloroformu. V případě komplexu **3** se jednalo až o další dvě částice, u komplexu **4** (*Obr. 26)* to byla další jedna částice obsahující *p*-cymen v poměru cca 1 : 1, což je opět v rozporu s výsledky elementární analýzy. Ve spektrech obou komplexů

byl pozorován posun signálu C7H – o 0,32 ppm u komplexu **3** a o 0,10 ppm u komplexu **4**, což může naznačovat koordinaci přes sousedící atom dusíku.

Hmotnostní spektra opět ukázala přítomnost fragmentů $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cym})L_3/L_4]^+$ a dále fragmenty $[RuL_3/L_4]^+$ a fragment samotného ligandu $[L_3/L_4+H]^+$. Dále byly stejně jako u komplexů **1** a **2** zjištěny fragmenty samotného výchozího dimerního komplexu, a to $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cym})Cl]^+$, $\{[Ru_2(\eta^6\text{-}p\text{-cym})_2Cl_2]+H\}^+$ či $[Ru_2(\eta^6\text{-}p\text{-cym})_2Cl_3]^+$ *(Obr. 27).*

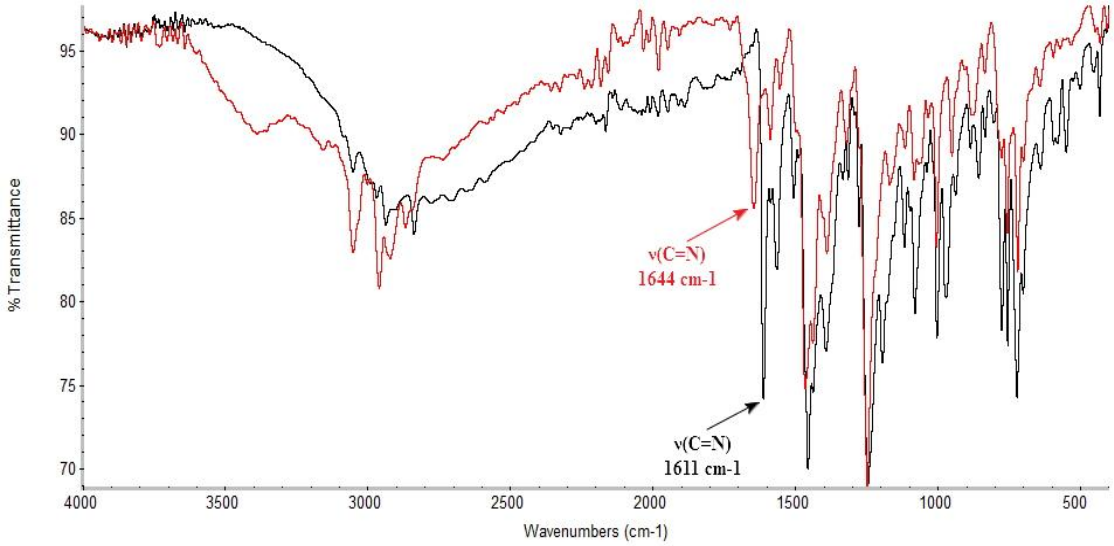


*Obr. 26: ^{1}H NMR spektrum komplexu **4** s použitým číslováním ligandu **L4** (červené tečky označují signály příslušící druhé částici obsahující p-cymen)*

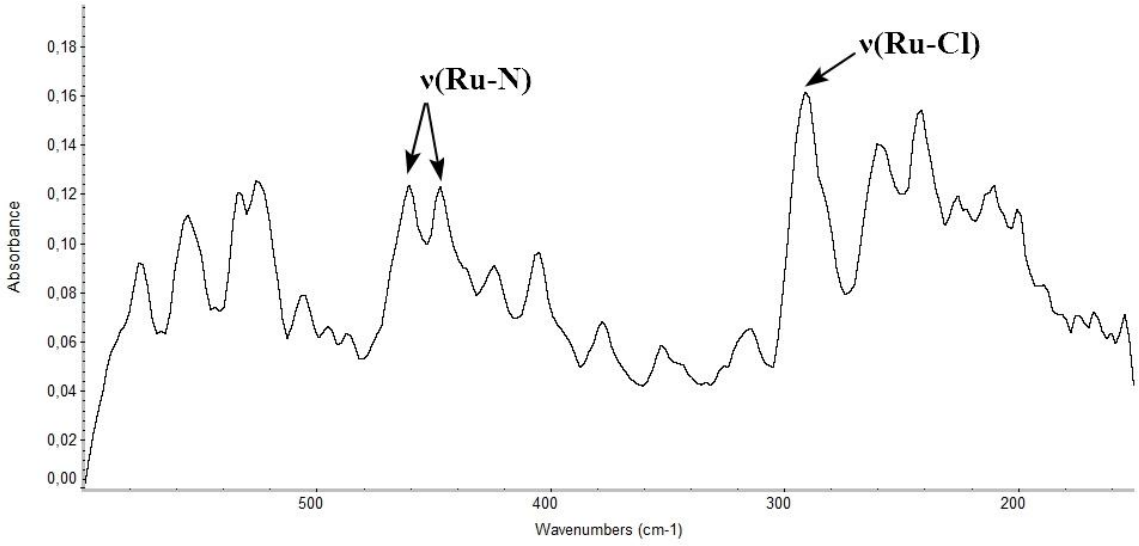


*Obr. 27: Hmotnostní spektrum komplexu **3***

V pevné fázi byly všechny připravené komplexy studovány pomocí infračervené spektroskopie. Na základě srovnání spekter naměřených pro komplexy, pro odpovídající volné ligandy a pro výchozí dimerní komplex lze usoudit, že připravené komplexy obsahují jak aromatický *p*-cymen, tak i příslušné ligandy. Do střední (MID) oblasti spektra spadají píky v rozmezí 3052-3031 cm^{-1}, které náleží vibracím $\nu(C\text{-}H)_{ar}$, v rozmezí 2961-2958 cm^{-1} se pak nacházejí vibrace $\nu(C\text{-}H)_{al}$. Píky detekované v oblasti okolo 2868 cm^{-1} mohou být přiřazeny vibracím $\nu(CH_3)$ *p*-cymenu nebo methoxyskupiny v případě komplexu **2** a **4**. V oblasti 1644-1607 cm^{-1} leží píky patřící vibraci ν(C=N). Posun této vibrace (o 2-33 cm^{-1}) při srovnání spekter komplexů a volných ligandů může být nepřímým důkazem koordinace ligandu na centrální atom přes atom dusíku (*Obr. 28)*. Pásy ležící v oblasti okolo 1460 cm^{-1} náleží vibracím $\nu(C{=}C)_{ar}$ a píky v rozmezí 1247-1161 cm^{-1} patří pravděpodobně vibracím $\nu(C\text{-}O)_{ar}$. U spekter komplexů **1** a **2** byly pozorovány píky v oblasti 1364 cm^{-1} a 1389 cm^{-1}, které nejspíš budou patřit vibraci ν(C-S). Ze spekter ve vzdálené oblasti (FAR) můžeme charakterizovat koordinační sféru centrálního atomu. V naměřených spektrech se projevuje vibrace ν(Ru-N) v oblasti 461-447 cm^{-1} a vibrace ν(Ru-Cl) okolo 290 cm^{-1} *(Obr. 29).*[53,56,57,58]

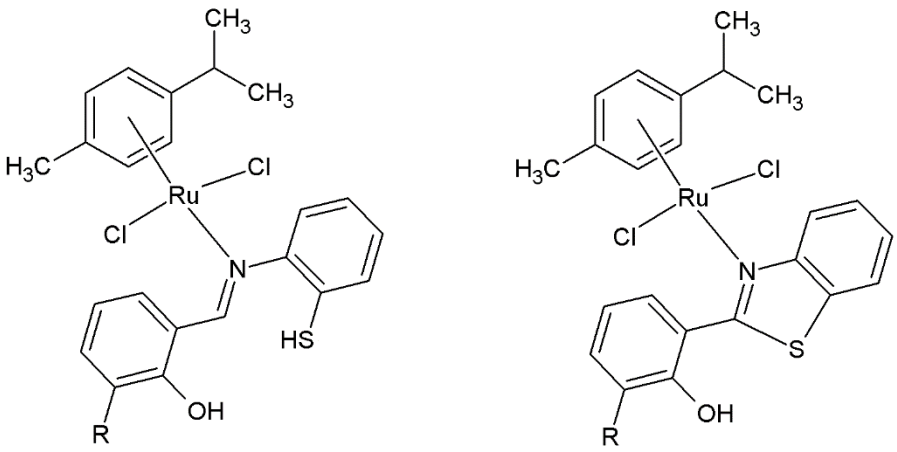


Obr. 28: Srovnání infračervených spekter ve střední oblasti ligandu ***L*****$_2$** *(černě) a komplexu* ***2*** *(červeně) se zvýrazněným posunem vibrace vazby C=N*



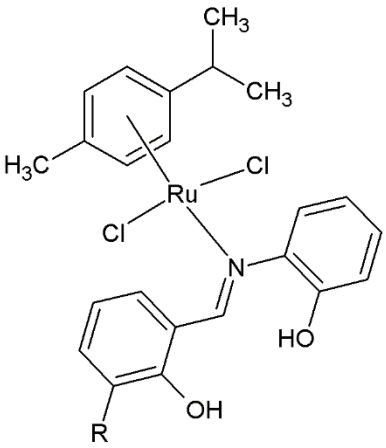
Obr. 29: Infračervené spektrum komplexu ***1*** *ve vzdálené oblasti*

Na základě provedených měření a analýz lze konstatovat, že byly pravděpodobně připraveny elektroneutrální Ru(II) komplexy, které jsou pravděpodobně koordinovány monodentátně přes atom dusíku (*Obr. 30)*. Toto složení by bylo také v souladu s jejich roztokovou nestabilitou, kdy vyšší stabilitu vykazují komplexy s chelatujícími ligandy oproti komplexům s analogickými ligandy, které se váží pouze monodentátně.[59]



R = H pro komplex 1

R = OCH_3 pro komplex 2



R = H pro komplex 3

R = OCH_3 pro komplex 4

*Obr. 30: Pravděpodobná struktura připravených komplexů **1 – 4***

4 Závěr

Byla vypracována literární rešerše týkající se problematiky potenciálně medicínsky využitelných komplexů ruthenia zaměřená zejména na komplexy s možným využitím v léčbě rakoviny. Byly zde zmíněny jednak sloučeniny, které již úspěšně absolvovaly fázi I klinických testů (NAMI-A a KP1019), tak i látky, které jsou prozatím studovány *in vitro* a *in vivo* a díky svým vlastnostem by mohly představovat sloučeniny vhodné pro hlubší studium a následné využití v medicíně.

Na základě vypracované literární rešerše byly vybrány sloučeniny se zajímavým strukturním motivem – polosendvičové komplexy a byla provedena syntéza jejich analogů. Jako ligandy pro syntézu nových sloučenin byly vybrány Schiffovy báze. Připraveny byly čtyři komplexy ruthenia o obecném vzorci [Ru(η^6-*p*-cym)(L)Cl_2], kde L představuje ligandy salicyliden-2-aminothiofenol a salicyliden-2-aminofenol a jejich 3-methoxy deriváty. Tyto látky byly charakterizovány vhodnými analytickými metodami. Byla provedena elementární analýza, měření konduktivity, měření infračervené spektroskopie, nukleární magnetická rezonance a hmotnostní spektrometrie.

První odhad složení komplexů byl proveden na základě výsledků elementární analýzy. Změřením vodivosti bylo zjištěno, že připravené komplexy jsou neelektrolyty. Ze studia rozpustnosti vyplynulo, že připravené látky jsou v roztoku nestabilní a dochází k jejich rozkladu. To mohlo následně ovlivnit další výsledky měření látek v roztoku. Infračervená spektra spolu s informacemi získanými z hmotnostních spekter potvrzují přítomnost *p*-cymenu i příslušných ligandů. Výsledky naměřených NMR spekter a infračervených spekter poukazují na koordinaci ligandu na centrální kov přes atom dusíku iminové vazby. NMR a MS spektra dále ukázala, že v případě komplexů **1** a **2** vznikly pravděpodobně směsi dvou látek, kdy u jedné byla koordinována Schiffova báze a u druhé došlo k zacyklení Schiffovy báze a ke vzniku benzothiazolového skeletu.

Podle provedených měření a analýz lze usuzovat, že byly připraveny elektroneutrální Ru(II) komplexy s monodentátně koordinovanými Schiffovými bázemi. Tyto látky jsou v roztoku nestabilní a dochází k jejich rozkladu. Vzhledem k této vlastnosti byla interpretace naměřených dat poněkud problematická a nebylo možné připravit vhodný monokrystal pro rentgenovou strukturní analýzu, která by potvrdila navrženou strukturu komplexů. Žádným z provedených syntetických pokusů a jejich optimalizováním nebylo dosaženo přípravy komplexů, kde by byl ligand vázán bidentátně a jeho stabilita by tak mohla být vyšší.

Z důvodu několikrát zmiňované roztokové nestability a skutečnosti, že ve vodě byly komplexy špatně rozpustné lze konstatovat, že připravené komplexy jednoznačně nejsou vhodnými adepty pro medicínské využití. Roztoková nestabilita také ztěžuje podmínky pro další studium připravených látek a tudíž jejich možného využití v jiném odvětví chemie.

5 Literatura

(1) Bratsos, I.; Gianferrara, T.; Alessio, E.; Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. *Bioinorganic Medicinal Chemistry - Ruthenium and Other Non-Platinum Anticancer Compounds*; Alessio, E., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2011.

(2) Bergamo, A.; Sava, G. Linking the Future of Anticancer Metal-Complexes to the Therapy of Tumour Metastases. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8818–8835.

(3) van Rijt, S. H.; Sadler, P. J. Current Applications and Future Potential for Bioinorganic Chemistry in the Development of Anticancer Drugs. *Drug Discov. Today* **2009**, *14* (23/24), 1089–1097.

(4) Kameníček, J.; Šindelář, Z.; Pastorek, R.; Kašpárek, F. *Anorganická Chemie*, 4. ed.; UP: Olomouc, 2009.

(5) Remy, H. *Anorganická Chemie II*; SNTL: Praha, 1962.

(6) Klikorka, J.; Hájek, B.; Votinský, J. *Obecná a Anorganická Chemie*; SNTL: Praha, 1985.

(7) Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G. *Anorganická Chemie*; VŠCHT: Praha, 2014.

(8) Farrer, N. J.; Sadler, P. J. *Bioinorganic Medicinal Chemistry - Medicinal Inorganic Chemisty: State of the Art, New Trends and a Vision of the Future*; Allesio, E., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2011.

(9) Rosenberg, B. Fundamental Studies With Cisplatin. *Cancer* **1985**, *55*, 2303–2316.

(10) Higby, D. J.; Wallace, H. J.; Albert, D. J.; Holland, J. F. Diaminodichloroplatinum: A Phase I Study Showing Responses in Testicular and Other Tumors. *Cancer* **1974**, *33* (5), 1219–1225.

(11) Alberts, D. S.; Noel, J. K. Cisplatin-Associated Neurotoxicity: Can It Be Prevented? *Anticancer. Drugs* **1995**, *6*, 369–383.

(12) Miller, R. P.; Tadagavadi, R. K.; Ramesh, G.; Reeves, W. B. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins (Basel).* **2010**, *2* (11), 2490–2518.

(13) Rybak, L. P.; Mukherjea, D.; Jajoo, S.; Ramkumar, V. Cisplatin Ototoxicity and Protection: Clinical and Experimental Studies. *Tohoku J. Exp. Med.* **2009**, *219* (3), 177–186.

(14) Page, S. Ruthenium Compounds as Anticancer Agents. *Educ. Chem.* **2012**, *49* (1), 26–29.

(15) Antonarakis, E. S.; Emadi, A. Ruthenium-Based Chemotherapeutics: Are They Ready for Prime Time? *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *66* (1), 1–9.

(16) Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P. A. Recent Developments in Ruthenium Anticancer Drugs. *Metallomics* **2009**, *1*, 458–470.

(17) Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. NKP-1339, the Firts Ruthenium-Based Anticancer Drug on the Edge to Clinical Application. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2925–2932.

(18) Clarke, M. J. Ruthenium Metallopharmaceuticals. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *236* (2003), 209–233.

(19) Zazueta, C.; Sosa-Torres, M. E.; Correa, F.; Garza-Ortiz, A. Inhibitory Properties of Ruthenium Amine Complexes on Mitochondrial Calcium Uptake. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1999**, *31* (6), 551–557.

(20) Hartinger, C. G.; Zorbas-Seifried, S.; Jakupec, M. A.; Kynast, B.; Zorbas, H.; Keppler, B. K. From Bench to Bedside – Preclinical and Early Clinical Development of the Anticancer Agent Indazolium Trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 891–904.

(21) Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; Sava, G. Approaching Tumour Therapy beyond Platinum Drugs: Status of the Art and Perspectives of Ruthenium Drug Candidates. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *106* (1), 90–99.

(22) Rademaker-lakhai, J. M.; Bongard, D. Van Den; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium- Trans-DMSO-Imidazole-Tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. *Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 3717–3727.

(23) Leijen, S.; Burgers, S. A.; Baas, P.; Pluim, D.; Tibben, M.; van Werkhoven, E.; Alessio, E.; Sava, G.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. Phase I/II Study with Ruthenium Compound NAMI-A and Gemcitabine in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer after First Line Therapy. *Invest. New Drugs* **2015**, *33*, 201–214.

(24) Holý, A. *Principy Bioorganické Chemie ve Vývoji Antivirotik a Cytostatik*; UP: Olomouc, 2004.

(25) Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. REVIEW KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent – Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 2140–2155.

(26) Ang, W. H.; Dyson, P. J. Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 4003–4018.

(27) Ang, W. H.; Casini, A.; Sava, G.; Dyson, P. J. Organometallic Ruthenium-Based Antitumor Compounds with Novel Modes of Action. *J. Organomet. Chem.* **2011**, *696*, 989–998.

(28) Casini, A.; Gabbiani, C.; Michelucci, E.; Pieraccini, G.; Moneti, G.; Dyson, P. J.; Messori, L. Exploring

Metallodrug-Protein Interactions by Mass Spectrometry: Comparisons between Platinum Coordination Complexes and an Organometallic Ruthenium Compound. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14* (5), 761–770.

(29) Casini, A.; Gabbiani, C.; Sorrentino, F.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Geldbach, T. J.; Marrone, A.; Re, N.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J.; Messori, L. Emerging Protein Targets for Anticancer Metallodrugs: Inhibition of Thioredoxin Reductase and Cathepsin B by Antitumor ruthenium(II)-Arene Compounds. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (21), 6773–6781.

(30) Bergamo, A.; Masi, A.; Peacock, A. F. A.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J.; Sava, G. In Vivo Tumour and Metastasis Reduction and in Vitro Effects on Invasion Assays of the Ruthenium RM175 and Osmium AFAP51 Organometallics in the Mammary Cancer Model. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104* (1), 79–86.

(31) Yan, Y. K.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. Organometallic Chemistry, Biology and Medicine: Ruthenium Arene Anticancer Complexes. *Chem. Commun.* **2005**, No. 38, 4764–4776.

(32) Stochel, G.; Wanat, A.; Kulis, E.; Stasicka, Z. Light and Metal Complexes in Medicine. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *171*, 203–220.

(33) Rawling, T.; McDonagh, A. Ruthenium Phthalocyanine and Naphthalocyanine Complexes : Synthesis , Properties and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1128–1157.

(34) Vollano, J. F.; Bossard, G. E.; Martellucci, S. A.; Darkes, M. C.; Abrams, M. J.; Brooks, R. C. The Synthesis and in Vitro Photodynamic Activity of a Series of Novel Ruthenium (II)-2,3-Naphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1997**, *37*, 230–235.

(35) Farrer, N. J. Salassa, L. Sadler, P. J. Photoactivated Chemotherapy (PACT): The Potential of Excited-State D-Block Metals in Medicine. *Dalt. Trans.* **2009**, No. 48, 10690–10701.

(36) Magennis, S. W.; Habtemariam, A.; Novakova, O.; Henry, J. B.; Meier, S.; Parsons, S.; Oswald, I. D. H.; Brabec, V.; Sadler, P. J. Dual Triggering of DNA Binding and Fluorescence via Photoactivation of a Dinuclear ruthenium(II) Arene Complex. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (12), 5059–5068.

(37) Herman, L.; Ghosh, S.; Defrancq, E.; Mesmaeker, A. K. De. Ru(II) Complexes and Light: Molecular Tools for Biomolecules. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21* (7-8), 670–681.

(38) Marcelis, L.; Ghesquiere, J.; Garnir, K.; Mesmaeker, A. K.-D.; Moucheron, C. Photo-Oxidizing Ru II Complexes and Light: Targeting Biomolecules via Photoadditions. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (15-16), 1569–1582.

(39) Qin, W.; Long, S.; Panunzio, M.; Biondi, S. Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool. *Molecules* **2013**, *18* (10), 12264–12289.

(40) Anguizola, J.; Matsuda, R.; Barnaby, O. S.; Hoy, K. S.; Wa, C.; DeBolt, E.; Koke, M.; Hage, D. S. Review: Glycation of Human Serum Albumin. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *425*, 64–76.

(41) Rondeau, P.; Bourdon, E. The Glycation of Albumin: Structural and Functional Impacts. *Biochimie* **2011**, *93* (4), 645–658.

(42) Yamagishi, S. I. Role of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Receptor for AGEs (RAGE) in Vascular Damage in Diabetes. *Exp. Gerontol.* **2011**, *46* (4), 217–224.

(43) Anis, I.; Aslam, M.; Noreen, Z.; Afza, N.; Hussain, A.; Hanif, A.; Safder, M. A Review (Part B) – Use of Schiff Base Transition Metal Complexes As a Catalyst. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **2013**, *5* (2), 30–39.

(44) Chaudhry, A. H. A Review (Part a) – General Applications of Schiff Base Transition Metal Complexes. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **2013**, *5* (2), 29–32.

(45) Kajal, A.; Bala, S.; Kamboj, S.; Sharma, N.; Saini, V. Schiff Bases : A Versatile Pharmacophore. *J. Catal.* **2013**, *2013*, 1–14.

(46) Palepu, N. R.; Nongbri, S. L.; Premkumar, J. R.; Verma, A. K.; Bhattacharjee, K.; Joshi, S. R.; Forbes, S.; Mozharivskyj, Y.; Thounaojam, R.; Aguan, K.; Kollipara, M. R. Synthesis and Evaluation of New Salicylaldehyde-2-Picolinylhydrazone Schiff Base Compounds of Ru(II), Rh(III) and Ir(III) as in Vitro Antitumor, Antibacterial and Fluorescence Imaging Agents. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20* (4), 619–638.

(47) Prakash, G.; Manikandan, R.; Viswanathamurthi, P.; Velmurugan, K.; Nandhakumar, R. Ruthenium(III) S-Methylisothiosemicarbazone Schiff Base Complexes Bearing PPh3/AsPh3 Coligand: Synthesis, Structure and Biological Investigations, Including Antioxidant, DNA and Protein Interaction, and in Vitro Anticancer Activities. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2014**, *138*, 63–74.

(48) Tönnemann, J.; Risse, J.; Grote, Z.; Scopelliti, R.; Severin, K. Efficient and Rapid Synthesis of Chlorido-Bridged Half-Sandwich Complexes of Ruthenium, Rhodium, and Iridium by Microwave Heating. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 4558–4562.

(49) Habtemariam, A.; Melchart, M.; Fernández, R.; Parsons, S.; Oswald, I. D. H.; Parkin, A.; Fabbiani, F. P. A.; Davidson, J. E.; Dawson, A.; Aird, R. E.; Jodrell, D. I.; Sadler, P. J. Structure-Activity Relationships for Cytotoxic ruthenium(II) Arene Complexes Containing N,N-, N,O-, and O,O-Chelating Ligands. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (23), 6858–6868.

(50) Betanzos-Lara, S.; Salassa, L.; Habtemariam, A.; Novakova, O.; Pizarro, A. M.; Clarkson, G. J.; Liskova, B.; Brabec, V.; Sadler, P. J. Photoactivatable Organometallic Pyridyl Ruthenium(II) Arene Complexes. *Organometallics* **2012**, *31*, 3466–3479.

(51) Khalil, M. M. H.; Aboaly, M. M.; Ramadan, R. M. Spectroscopic and Electrochemical Studies of Ruthenium and Osmium Complexes of Salicylideneimine-2-Thiophenol Schiff Base. *Spectrochim. Acta Part A* **2005**, *61*, 157–161.
(52) Muthu Tamizh, M.; Mereiter, K.; Kirchner, K.; Karvembu, R. Ruthenium(II) Carbonyl Complexes Containing "Pincer Like" ONS Donor Schiff Base and Triphenylphosphine as Catalyst for Selective Oxidation of Alcohols at Room Temperature. *J. Organomet. Chem.* **2012**, *700*, 194–201.
(53) Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, 3. ed.; John Wiley and sons Ltd: West Sussex, 2001.
(54) Lindoy, L. F.; Livingstone, S. E. The Metal-Ion Induced Rearrangement of 2-(2-Pyridyl)benzothiazoline. *Inorganica Chim. Acta* **1967**, *325* (19), 365–370.
(55) Briel, O.; Fehn, A.; Polborn, K.; Beckk, W. Hydrocarbon Bridged Metal Complexes, XLIV. Donor-Acceptor Substituted Schiff Bases of Polyenes with Transition Metals. *Polyhedron* **1999**, *18*, 225–242.
(56) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B: Application in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, 5. ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New York, 1997.
(57) Shanker, K.; Rohini, R.; Ravinder, V.; Reddy, P. M.; Ho, Y. P. Ru(II) Complexes of N4 and N2O2 Macrocyclic Schiff Base Ligands: Their Antibacterial and Antifungal Studies. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, *73* (1), 205–211.
(58) Manimaran, a; Chinnusamy, V.; Jayabalakrishnan, C. Synthesis, Spectral Characterization, C-C Coupling, Oxidation Reactions and Antibacterial Activities of New ruthenium(III) Schiff Base Complexes. *Appl. Organomet. Chem.* **2011**, *25* (2), 87–97.
(59) Sidgwick, N. V. Complex Formation. *J. Chem. Soc.* **1941**, 433–443.