

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 585

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/30 (2006.01)
C07F 1/12 (2006.01)
C07F 9/6561 (2006.01)
C07F 9/535 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 33/42 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-326**
 (22) Přihlášeno: **12.05.2014**
 (40) Zveřejněno: **23.12.2015**
(Věstník č. 51/2015)
 (47) Uděleno: **11.11.2015**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **23.12.2015**
(Věstník č. 51/2015)

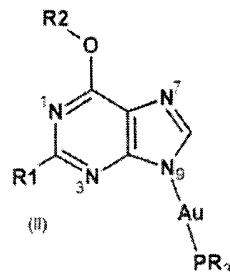
(56) Relevantní dokumenty:
 Colacio E. et al.: Inorganic Chemistry 1996, 35 (14); Colacio E. et al.: Inorganic Chemistry 1991, 30, CZ 303 649.

(73) Majitel patentu:
 Univerzita Palackého, Olomouc, CZ

(72) Původce:
 prof. RNDr. Zdeněk Trávníček, Ph.D., Štěpánov, CZ
 Mgr. Radka Křikavová, Ph.D., Olomouc, CZ
 RNDr. Jan Hošek, Ph.D., Brno, CZ
 prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Ph.D.DrSc., Olomouc, CZ

(74) Zástupce:
 Ing. Petr Soukup, Vídeňská 8, 772 00 Olomouc

substituovaný cykloheteroalkenyl, aryl, heteroaryl.
 Komplexy jsou určeny pro léčbu adenokarcinomu prsu, osteosarkomu, karcinomu plic, maligního melanomu, karcinomu děložního čípku, karcinomu vaječníků, karcinomu vaječníků rezistentnímu vůči *cisplatině* a/nebo karcinomu prostaty.



(54) Název vynálezu:
Komplexy zlata s deriváty hypoxantinu a s deriváty fosfanu a jejich použití pro přípravu léčiv v protizánětlivé a protinádorové terapii

(57) Anotace:
 Komplexy zlata v oxidačním stavu +I s deriváty hypoxantinu a s deriváty fosfanu, a jejich krystalosolváty, zahrnující strukturní motiv I obecného vzorce $[Au(L)(PR_3)]$ a vyjádřené strukturním vzorcem II, kde
 - symbol L představuje deprotonizovaný derivát hypoxantinu vázaný přes atom dusíku N9 na atom zlata způsobem vyjádřeným v základním motivu I,
 - PR_3 je derivát fosfanu,
 - substituenty R jsou nezávisle vybrány ze skupiny alkyl, cykloalkyl, substituovaný alkyl, substituovaný cykloalkyl, aryl, nebo heteroaryl, a/nebo jejich libovolné kombinace,
 - substituent R1 je nezávisle vybrán ze skupiny atom vodíku, halogen,
 - substituent R2 je nezávisle vybrán ze skupiny atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, alkenyl, substituovaný alkenyl, alkynyl, substituovaný alkynyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl, substituovaný cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, substituovaný cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl,

CZ 305585 B6

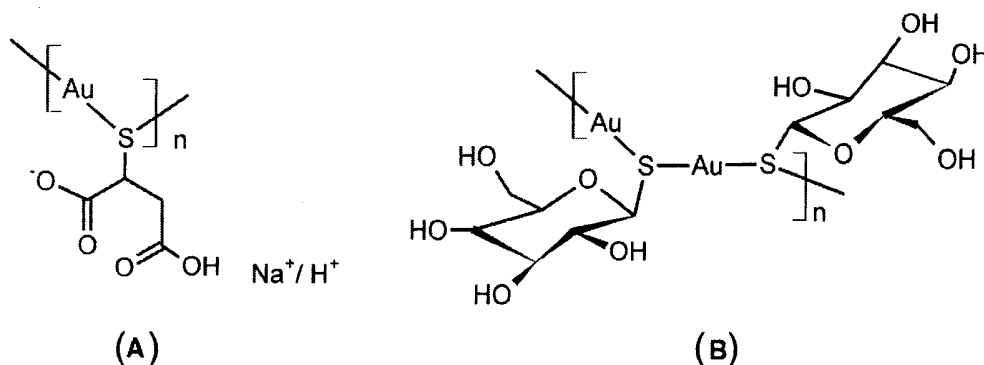
Komplexy zlata s deriváty hypoxantinu a s deriváty fosfanu a jejich použití pro přípravu léčiv v protizánětlivé a protinádorové terapii

5 Oblast techniky

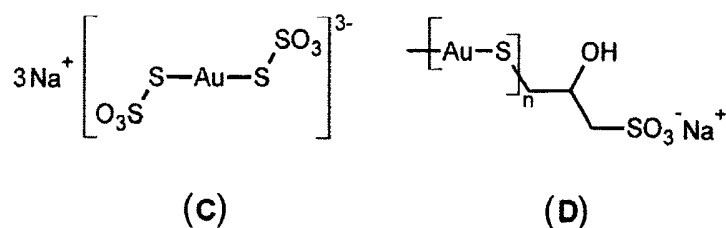
Předložený vynález spadá do oblasti léčiv a týká se komplexů zlata s deriváty hypoxantinu a s deriváty fosfanu a jejich použití jako léčiv v protizánětlivé terapii a v léčbě nádorových onemocnění, zejména pak adenokarcinomu prsu, osteosarkomu, karcinomu plic, maligního melanomu, karcinomu děložního čípku, karcinomu vaječníků, karcinomu vaječníků rezistentnímu vůči *cis-platině* a/nebo karcinomu prostaty.

15 Dosavadní stav techniky

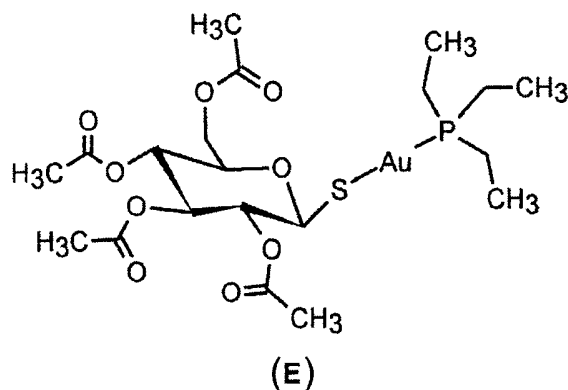
Strukturně lineární komplexy zlata v oxidačním stavu +I představují významnou skupinu biologicky aktivních látek, z nichž již pět zástupců je v moderní medicíně komerčně využíváno k léčbě zánětlivých onemocnění, jako je například revmatoidní artritida. Ve Spojených státech amerických jsou užívanými protizánětlivými léčivy sodná sůl 2-merkaptobutandiolatozlatného komplexu (natrium-aurothiomalát, vzorec A) a komplex ((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-oxan-2-thiolato)zlatný (aurothioglukosa, vzorec B). Příklady jejich přípravy a uplatnění v protizánětlivé terapii jsou uvedeny v dokumentech GB 421989, US 4 599 436, WO 2010/0091381, GB 293363, GB 397293 nebo GB 398020.



V Evropě jsou navíc používány zlatné sloučeniny sodná sůl bis(thiosulfáto)zlatného komplexu (vzorec C) a sodná sůl 2-hydroxy-3-merkaptopropan-1-sulfonátozlatného komplexu (natrium-thiopropansulfonát, vzorec D). Tyto látky jsou souhrnně označovány jako thioláty zlatné a jedná se o iontové, ve vodě rozpustné sloučeniny, které kromě bis(thiosulfáto)zlatnanového aniontu obsahují polymerní komplexní anionty, přičemž ve všech sloučeninách je zlato lineárně koordinované dvěma atomy síry. Tato léčiva jsou podávána injekčně. Příklady jejich přípravy a uplatnění v protizánětlivé terapii jsou uvedeny v dokumentech US 4 657 763, GB 246809, GB 261048 nebo FR 2591106.



Nejpozději, a to v 80. letech 20. století, bylo do klinické praxe uvedeno strukturně odlišné protizánětlivé léčivo Auranofin, 3,4,5-triacetyloxy-6-(acetyloxymethyl)-oxan-2-thiolátotriethylfosfan)zlatný komplex (vzorec E), což je jednojaderný neutrální lipofilní komplex, který podobně jako výše zmíněná léčiva obsahuje *S*-donorový ligand, ale liší se přítomností organického derivátu fosfanu koordinujícím se přes atom fosforu. Příprava Auranofinu je popsána v patentových spisech, US 4 200 738, US 4 115 642, US 4 125 711, US 4 125 710, US 4 122 254, US 4 133 952 nebo US 4 131 732 a jeho terapeutické využití je popsáno ve spise WO 2010/091381. Výhodou Auranofinu oproti výše uvedeným iontovým sloučeninám zlata uvedených ve vzorcích A až D je to, že jej lze podávat orálně.



Předložené Au(I) komplexy lze podobně jako Auranofin zařadit mezi jednojaderné neutrální komplexy obsahující derivát fosfanu koordinovaný na zlato přes atom fosforu. Liší se ale druhým ligandem, kterým je *N*-donorová organická molekula odvozená od hypoxantinu, tj. 1*H*-purin-6(9*H*)-on. Předmětné komplexy navazují na vysoce protizánětlivé aktivní zlatné komplexy s různými *N*-donorovými ligandy odvozenými od purinu a deriváty fosfanu popsané v patentovém spise CZ 303649, publikaci Z. Trávníček et al. *J. Med. Chem.* 55, 55, 2012, 4568. Je zde nutné zdůraznit, že podobně jako u jiných systémů obsahujících organickou molekulu koordinovanou na přechodný kov, bylo i u komplexů zlata(I) obsahujících *N*-donorový ligand odvozený právě od 6-benzylaminopurinu jednoznačně prokázáno, že i velmi malá strukturní změna v molekule organického ligandu může vést k velmi výrazné modifikaci biologické aktivity nebo k jejímu úplnému vymizení (J. Hošek et al. *PlosONE* 8, 2013, e82441). Vlastnosti koordinované organické molekuly a způsob její koordinace na atom zlata totiž výrazně ovlivňují biodistribuci celého komplexu, neboť různý způsob koordinace a substituce na základním skeletu mohou vést ke změnám v afinitě k biomolekulám a cílovým receptorům, průchodnosti biomembránami, tedy ke změnám, které se projeví ve výsledné biologické aktivitě. Proto nelze jednoznačně predikovat, jaké Au(I) komplexy uvedeného strukturního typu budou vykazovat ten či onen typ biologické aktivity.

Komplexní sloučeniny zlata v oxidačním stavu +I jsou studovány nejen pro své prokázané protizánětlivé účinky aplikované v praxi, ale v posledních desetiletích jsou předmětem bioorganického výzkumu i pro svou potenciální protinádorovou aktivitu. Studie prokazující antitumorové působení Auranofinu *in vitro* na buněčných liniích děložního čípku HeLa (T. M. Simon et al. *Cancer* 44, 1979, 1965) a melanomu B16 a *in vivo* vůči leukemickým buňkám myší buněčné linie P388 (C. K. Mirabelli et al. *Cancer Res.* 45, 1985, 32) vedly k širšímu zkoumání protinádorové aktivity analogů Auranofinu (patentový spis WO 2012/142615). Předmětem studia byly i Au(I) komplexy obsahující chromofor AuNP, kdy byla prokázána antitumorová aktivita u komplexů s deriváty fosfanu a *N*-donorovými heterocyklickými ligandy, jako například imidazol, pyrazol nebo deriváty 9-deazapurinu, jak je popsáno v publikacích R. Gallassi et al. *Dalton Trans.* 41, 2012, 5307; M. Serratrice et al. *Inorg. Chem.* 51, 2012, 3161; C. Abbehausen et al. *Inorg. Chem.* 52, 2013, 11280. Ovšem podobně jako v případě protizánětlivé aktivity, tak u protinádorového působení komplexů zlata v oxidačním stavu +I také není doposud jednoznačně prokázán mechanismus účinku těchto sloučenin a definovány vztahy mezi strukturou a biologickou

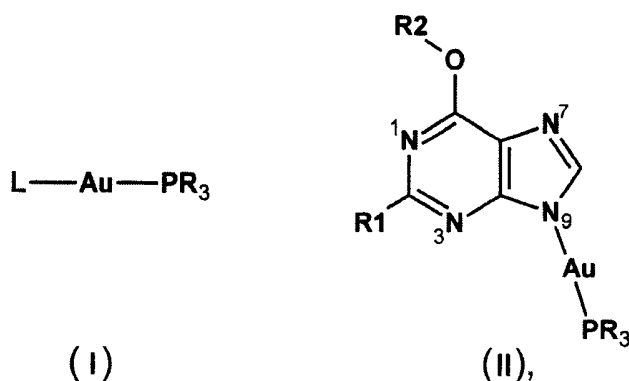
kou aktivitou u této skupiny látek. Není také možné teoreticky předpokládat terapeutickou účinnost nebo neúčinnost určitého strukturního typu zlatných komplexů, tedy není možné předem, bez provedení patřičných experimentů, definovat kvalitativní ani kvantitativní vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou.

Předložené zlatné komplexy s deriváty hypoxantinu a s deriváty fosfanu představují v literatuře doposud nepopsanou skupinu biologicky aktivních komplexů zlata.

Různé substituované deriváty hypoxantinu jsou studovány jako rostlinné růstové regulátory (patentový spis WO 2005/107472 A1), dále také jako velmi účinné inhibitory cyklin dependentních kinas (patentové spisy WO 9902162) a O6-alkylguanin-DNA-alkyltransferas (AGT) (patentové spisy US 5 352 669, US 5 691 307, US 5 958 932, WO 2004/031405, WO 2011/028607), což jsou enzymy hrající klíčovou roli v regulaci procesů spojených s dělením buněk. Zástupce těchto látek, 2-amino-O6-benzylhypoxantin (O6-benzylguanin) je v současné době v II. fázi klinických testů jako AGT inhibitor, konkrétně jako látka navyšující účinnost vybraného chemoterapeutika (temozolomidu, tj. 4-methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trien-9-karboxamid) pro léčbu maligního gliomu (J. A. Quinn et al. *J. Clin. Oncol.* 27, 2009, 1262). Příprava, charakterizace a biologická aktivita těchto látek je mimo zmíněné patentové spisy popsána například v publikacích R. W. Balsiger et al. *J. Org. Chem.* 25, 1960, 1573; M. Y. Chae et al. *J. Med. Chem.* 37, 1994, 342; R. S. McElhinney et al. *J. Med. Chem.* 41, 1998, 5265; C. A. Arris et al. *J. Med. Chem.* 43, 2000, 2797; F. Seela et al. *Helvetica Chim. Acta* 81, 1998, 2244; T. G. Davies et al. *Nature Struct. Biol.* 9, 2002, 745; A. E. Gibson et al. *J. Med. Chem.* 45, 2002, 3381; R. J. Griffin et al. *J. Med. Chem.* 43, 2000, 4071; I. R. Hardcastle et al. *J. Med. Chem.* 47, 2004, 3710; T. E. Spratt et al. *Biochem.* 31, 1992, 3689; R. Schirmacher et al. *Curr. Org. Synth.* 2, 2005, 215;

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou komplexy zlata v oxidačním stavu +I s deriváty hypoxantinu (1*H*-purin-6(9*H*)-onu) a s deriváty fosfanu, a jejich krystalosolváty, zahrnující strukturní motiv I obecného vzorce [Au(L)(PR₃)] a vyjádřené strukturním vzorcem II



kde

- symbol L představuje deprotonizovaný derivát hypoxantinu vázaný přes atom dusíku N9 na atom zlata způsobem vyjádřeným v základním motivu I,
- PR₃ je derivát fosfanu,
- substituenty R jsou nezávisle vybrány ze skupiny alkyl, cykloalkyl, substituovaný alkyl, substituovaný cykloalkyl, aryl, nebo heteroaryl, a/nebo jejich libovolné kombinace,
- substituent R1 je nezávisle vybrán ze skupiny atom vodíku, halogen

– substituent R2 je nezávisle vybrán ze skupiny atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, alkenyl, substituovaný alkenyl, alkynyl, substituovaný alkynyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl, substituovaný cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, substituovaný cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl, substituovaný cykloheteroalkenyl, aryl, heteroaryl,

5 kde termín:

– *halogen*

představuje atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu

– *alkyl*

10 představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 8, především pak z 1 až 6 atomů uhlíku,

– *alkenyl*

představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 12, především pak ze 3 až 6 atomů uhlíku, obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku,

– *alkynyl*

15 představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 12, především pak ze 3 až 6 atomů uhlíku obsahující alespoň jednu trojnou vazbu mezi atomy uhlíku,

– *cykloalkyl*

20 představuje cyklický uhlovodík ze 3 až 12, především pak ze 3 až 8, atomů uhlíku, a to včetně kondenzovaných cyklů nezávisle vybraných ze skupiny cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl,

– *cykloheteroalkyl*

představuje cykloalkyl s alespoň jedním atomem uhlíku zaměněným za heteroatom ze skupiny dusík, kyslík, nebo síra,

– *cykloalkenyl*

25 představuje cykloalkyl obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku,

– *cykloheteroalkenyl*

představuje cykloheteroalkyl obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi dvěma atomy uhlíku, atomem uhlíku a heteroatomem, nebo dvěma heteroatomy,

30 – *substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, substituovaný cykloalkyl, substituovaný cykloheteroalkyl, substituovaný cykloalkenyl, substituovaný cykloheteroalkenyl*
představují alkyl, alkenyl, alkynyl, cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl substituované substituenty z množiny halogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl,

– *aryl*

35 představuje fenyl,

– *heteroaryl*

představuje aryl s alespoň jedním atomem uhlíku zaměněným za heteroatom ze skupiny dusík, kyslík, nebo síra.

40 Další podstatou vynálezu jsou krystalosolváty komplexů zlata strukturního vzorce II, jejichž složení vyjadřuje vzorec $[Au(L)(PR_3)] \cdot nSolv$, ve kterém

– L a PR_3 jsou definovány výše,

– *n* znamená počet krystalosolvátových molekul a nabývá hodnot především 1 až 6, a

45 – *Solv* je anorganická nebo organická molekula vybraná ze skupiny voda, primární alkohol, sekundární alkohol, aceton, *N,N'*-dimethylformamid, dimethyl sulfoxid, chloroform, dichlormethan, acetonitril nebo diethylether, a to buď samostatně, nebo v kombinaci uvedených solvátových molekul.

50 Nedílnou podstatou vynálezu je farmakologický prostředek obsahující terapeuticky účinné množství zlatných komplexů vzorce II nebo jejich krystalosolvátů s jedním či více přijatelnými nosiči a pomocnými látkami pro použití v lékařství, zejména pro použití pro výrobu léčiv pro léčení

zánětlivých a/nebo nádorových onemocnění, a to zejména pro léčení adenokarcinomu prsu a/nebo osteosarkomu a/nebo karcinomu plic a/nebo maligního melanomu a/nebo karcinomu děložního čípku a/nebo karcinomu vaječníků a/nebo karcinomu vaječníků rezistentnímu vůči *cis-platině* a/nebo karcinomu prostaty.

5

Objasnění výkresů

Konkrétní příklady provedení vynálezu jsou doloženy připojenými výkresy, kde:

10

– Obr. 1 je infračervené spektrum komplexu $[\text{Au}(\text{L}_6)(\text{PPh}_3)]$ (6) naměřené v oblasti 400 až 4000 cm^{-1} ; $\text{HL}_6 = 2\text{-chlor-O6-methylhypoxantin}$.

15

– Obr. 2 je infračervené spektrum komplexu $[\text{Au}(\text{L}_1)(\text{PPh}_3)]$ (1) naměřené v oblasti 200 až 600 cm^{-1} ; $\text{HL}_1 = \text{O6-ethylhypoxantin}$.

– Obr. 3 je ^1H NMR spektrum komplexu $[\text{Au}(\text{L}_9)(\text{PPh}_3)]$ (9) rozpuštěného v $\text{DMF-}d_7$; $\text{HL}_9 = 2\text{-chlor-O6-benzylhypoxantin}$.

20

– Obr. 4 je molekulová struktura komplexu $[\text{Au}(\text{L}_1)(\text{PPh}_3)]$ (1) vyřešená užitím monokrystalové rentgenové strukturní analýzy; vodíkové atomy nejsou pro přehlednost zobrazeny; $\text{HL}_1 = \text{O6-ethylhypoxantin}$.

25

– Obr. 5 je molekulová struktura komplexu $[\text{Au}(\text{L}_3)(\text{PPh}_3)]$ (3) vyřešená užitím monokrystalové rentgenové strukturní analýzy; vodíkové atomy nejsou pro přehlednost zobrazeny; $\text{HL}_3 = \text{O6-allylhypoxantin}$.

30

– Obr. 6 je graf *in vitro* protizánětlivé aktivity komplexů $[\text{Au}(\text{L}_1)(\text{PPh}_3)]$ (1), $[\text{Au}(\text{L}_2)(\text{PPh}_3)]$ (2), $[\text{Au}(\text{L}_3)(\text{PPh}_3)]$ (3), $[\text{Au}(\text{L}_4)(\text{PPh}_3)]$ (4), $[\text{Au}(\text{L}_5)(\text{PPh}_3)]$ (5), $[\text{Au}(\text{L}_6)(\text{PPh}_3)]$ (6), a $[\text{Au}(\text{L}_7)(\text{PPh}_3)]$ (7), ukazující ovlivnění sekrece prozánětlivých cytokinů $\text{TNF-}\alpha$ a jejich srovnání s Auranofinem a vehikulem (maximální odpověď buněk na zánětlivý stimul (LPS)), $\text{HL}_1 = \text{O6-ethylhypoxantin}$; $\text{HL}_2 = \text{O6-buthylhypoxantin}$; $\text{HL}_3 = \text{O6-allylhypoxantin}$; $\text{HL}_4 = \text{O6-benzylhypoxantin}$; $\text{HL}_5 = \text{O6-fenetylhypoxantin}$; $\text{HL}_6 = 2\text{-chlor-O6-methylhypoxantin}$; $\text{HL}_7 = 2\text{-chlor-O6-buthylhypoxantin}$, ** signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ($p < 0,01$), *** signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ($p < 0,001$).

35

– Obr. 7 je graf *in vitro* protizánětlivé aktivity komplexů $[\text{Au}(\text{L}_1)(\text{PPh}_3)]$ (1), $[\text{Au}(\text{L}_2)(\text{PPh}_3)]$ (2), $[\text{Au}(\text{L}_3)(\text{PPh}_3)]$ (3), $[\text{Au}(\text{L}_4)(\text{PPh}_3)]$ (4), $[\text{Au}(\text{L}_5)(\text{PPh}_3)]$ (5), $[\text{Au}(\text{L}_6)(\text{PPh}_3)]$ (6), a $[\text{Au}(\text{L}_7)(\text{PPh}_3)]$ (7) ukazující ovlivnění sekrece prozánětlivých cytokinů $\text{IL-1}\beta$ a jejich srovnání s Auranofinem a vehikulem (maximální odpověď buněk na zánětlivý stimul (LPS)), $\text{HL}_1 = \text{O6-ethylhypoxantin}$; $\text{HL}_2 = \text{O6-buthylhypoxantin}$; $\text{HL}_3 = \text{O6-allylhypoxantin}$; $\text{HL}_4 = \text{O6-benzylhypoxantin}$; $\text{HL}_5 = \text{O6-fenetylhypoxantin}$; $\text{HL}_6 = 2\text{-chlor-O6-methylhypoxantin}$; $\text{HL}_7 = 2\text{-chlor-O6-buthylhypoxantin}$, *** signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ($p < 0,001$).

40

– Obr. 8 je graf *in vitro* protizánětlivé aktivity komplexů $[\text{Au}(\text{L}_2)(\text{PPh}_3)]$ (2) a $[\text{Au}(\text{L}_7)(\text{PPh}_3)]$ (7) ukazující ovlivnění transkripce genů prozánětlivých cytokinů $\text{TNF-}\alpha$ a jejich srovnání s Auranofinem a vehikulem (maximální odpověď buněk na zánětlivý stimul (LPS)), $\text{HL}_2 = \text{O6-buthylhypoxantin}$; $\text{HL}_7 = 2\text{-chlor-O6-buthylhypoxantin}$, ** signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ($p < 0,01$).

45

– Obr. 9 je graf *in vitro* protizánětlivé aktivity komplexů $[\text{Au}(\text{L}_2)(\text{PPh}_3)]$ (2) a $[\text{Au}(\text{L}_7)(\text{PPh}_3)]$ (7), ukazující ovlivnění transkripce genů prozánětlivých cytokinů $\text{IL-1}\beta$ a jejich srovnání s Auranofinem a vehikulem (maximální odpověď buněk na zánětlivý stimul (LPS)), $\text{HL}_2 = \text{O6-buthylhypoxantin}$; $\text{HL}_7 = 2\text{-chlor-O6-buthylhypoxantin}$, * signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ($p < 0,05$).

50

55

Příklady uskutečnění vynálezu

V následující části je vynález doložen, nikoli však limitován, konkrétními příklady jeho uskutečnění. Rozsah vynálezu je pak jednoznačně definován patentovými nároky.

5

V níže uvedených příkladech byly připravené látky charakterizovány následujícími fyzikálně-chemickými metodami:

- elementární analýza se stanovením procentuálního zastoupení uhlíku, vodíku a dusíku (CHN(O)S analyzátor Flash 2000, Thermo Scientific),
- 10 – infračervená spektroskopie, kde byly oblasti 200 až 600 cm^{-1} (far-IR) a 400 až 4000 cm^{-1} (mid-IR) provedeny technikou ATR (Nexus 670 FT-IR, Thermo Nicolet),
- hmotnostní spektrometrie provedená ESI+ technikou (LCQ Fleet, ThermoScientific)
- 1D a 2D nukleární magnetická rezonance – ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H gs-COSY, ^1H - ^{13}C gs-HMQC, ^1H - ^{13}C gs-HMBC experimenty (400 MHz NMR spektrometr, Varian),
- 15 – monokrystalová rentgenová strukturní analýza (difraktometr Xcalibur2+CCD detektor Sapphire2, Oxford Diffraction).

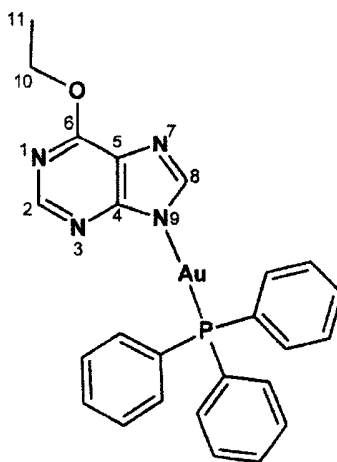
Příklad 1: Příprava a charakterizace komplexů zlata(I) s deriváty hypoxantinu a trifenylofosfanu.

20

Zlatné komplexy s deriváty hypoxantinu a trifenylofosfanem byly syntetizovány za použití modifikovaného postupu popsaného v patentovém spisu CZ 303 649 a v publikaci Z. Trávníček et al. *J. Med. Chem.* 55, 2012, 4568.

- 25 $[\text{Au}(\text{L}_1)(\text{PPh}_3)]$ (1): Výtěžek: 81 %, Elementární složení $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{OPAu}$ ($\text{HL}_1 = \text{O}6\text{-ethylhypoxantin}$): vypočtené C: 48,24; H: 3,56; N: 9,00; získané: C: 47,78; H: 3,61; N: 9,44 %. ESI+ MS (methanol, m/z): 187 (vyp. 187) $[\text{HL}_1+\text{Na}]^+$, 623 (623) $[\text{M}+\text{H}]^+$. IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3055w $\nu(\text{C-H})_{\text{ar}}$, 2980m $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$, 2917m $\nu(\text{C-H})$, 2848w $\nu_s(\text{O-CH}_2)$, 1592s $\nu(\text{C=N})_{\text{ar}}$, 1549m, 1454m $\nu(\text{O-CH}_2)$, 1433s $\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$, 1377m, 1334m, 1318 m $\nu(\text{C}_6\text{-O})$, 1302m, 1175m, 1136m, 1100s $\nu(\text{O-C}_{10})$, 585m, 544s $\nu(\text{Au-N})$, 498s, 448m, 328m $\nu(\text{Au-P})$. ^1H NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 8,45 (s, C2H, 1H), 8,36 (s, C8H, 1H), 7,70 (m, PPh_3 , 15H), 4,61 (q, C10H, 2H), 1,41 (t, C11H, 3H). ^{13}C NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 159,59 (C6), 158,43 (C4), 150,96 (C2), 146,41 (C8), 134,56–128,75 (PPh_3), 119,92 (C5), 62,46 (C10), 14,45 (C11).

30

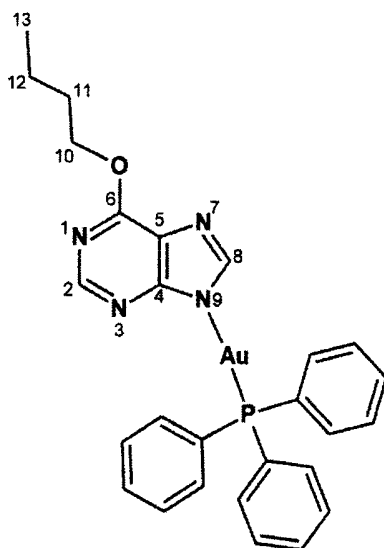


35

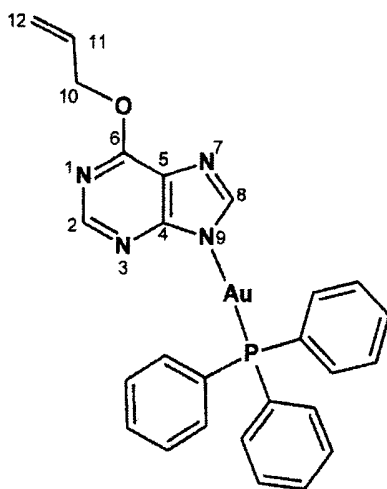
- $[\text{Au}(\text{L}_2)(\text{PPh}_3)]$ (2): Výtěžek: 83%, Elementární složení $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{OPAu}$ ($\text{HL}_2 = \text{O}6\text{-butylhypoxantin}$): vypočtené C: 49,86; H: 4,03; N: 8,61; získané: C: 49,43; H: 4,02; N: 8,31 %. ESI+ MS (methanol, m/z): 215 (vyp. 215) $[\text{HL}_2+\text{Na}]^+$, 651 (vyp. 651) $[\text{M}+\text{H}]^+$. IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3048w, 2953m, 2931m, 2869m, 1599s, 1540m, 1434s, 1367m, 1330m $\nu(\text{C}_6\text{-O})$, 1277w, 1204w, 1099s,

40

v(O-C₁₀), 751m, 690m, 584w, 542s, v(Au-N), 499s, 443m, 400m, 327m v(Au-P). ¹H NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ (SiMe₄) 8,46 (s, C2H, 1H), 8,36 (s, C8H, 1H), 7,70 (m, PPh₃, 15H), 4,57 (m, C10H, 2H), 1,80 (q, C11H, 2H), 1,48 (sx, C12H, 2H), 0,92 (t, C13H, 3H). ¹³C NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ (SiMe₄) 160,46 (C6), 151,10 (C2), 146,13 (C8), 135,20–129,60 (PPh₃), 119,66 (C5), 67,91 (C10), 30,52 (C11), 20,04 (C12), 14,41 (C13).



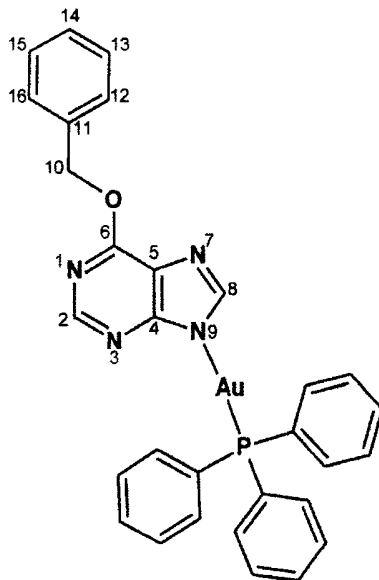
[Au(L₃)(PPh₃)] (3): Výtěžek: 65%, Elementární složení C₂₆H₂₂N₄OPAu (HL₃ = O6-allylhypoxantin): vypočtené C: 49,22; H: 3,50; N: 8,83; získané: C: 48,89; H: 3,62; N: 8,35 %. ESI+ MS (methanol, m/z): 199 (vyp. 199) [HL₃+Na⁺], 635 (635) [M+H⁺]. IR (ν_{ATR}/cm⁻¹): 3056w v(C-H)_{ar}, 2959m, 2906w ν_s(O-CH₂), 1592s ν(C=N)_{ar}, 1548m, 1474w ν(O-CH₂), 1432s ν(C=C)_{ar}, 1300m ν(C₆-O), 1175m, 1133m, 1099s, ν(O-C₁₁), 989m, 746m, 690m, 643m, 584m, 543s, v(Au-N), 496s, 451m, 433m, 396w, 326m v(Au-P), 253w. ¹H NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ (SiMe₄) 8,41 (s, C2H, 1H), 8,27 (s, C8H, 1H), 7,78 – 7,07 (m, PPh₃, 15H), 6,14 (m, C11H, 1H), 5,45 (d, C12Ha, 1H), 5,20 (d, C12Hb, 1H), 5,12 (d, C10H, 2H). ¹³C NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ (SiMe₄) 159,05 (C6), 153,44 (C4), 150,00 (C2), 148,21 (C8), 135,43 – 129,49 (PPh₃), 134,00 (C11), 118,30 (C5), 117,54 (C12), 66,79 (C10).



[Au(L₄)(PPh₃)] (4): Výtěžek: 72%, Elementární složení C₃₀H₂₄N₄OPAu (HL₄ = O6-benzylhypoxantin): vypočtené C: 52,64; H: 3,53; N: 8,19; získané: C: 52,74; H: 3,36; N: 7,95 %. ESI+ MS (methanol, m/z): 249 (vyp. 249) [HL₄+Na⁺], 685 (685) [M+H⁺]. IR (ν_{ATR}/cm⁻¹): 3048m, 3069m, 3007m, 2934m, 2850m, 2806m ν(C-H)_{al}, 1657s, 1578s, 1434n, 1359m, 1274s ν(C₆-O), 1185m, 1102m, ν(O-C₁₁), 1055m, 942w, 748w, 689m, 578m, 543s, v(Au-N), 510m, 496s, 451m, 442m,

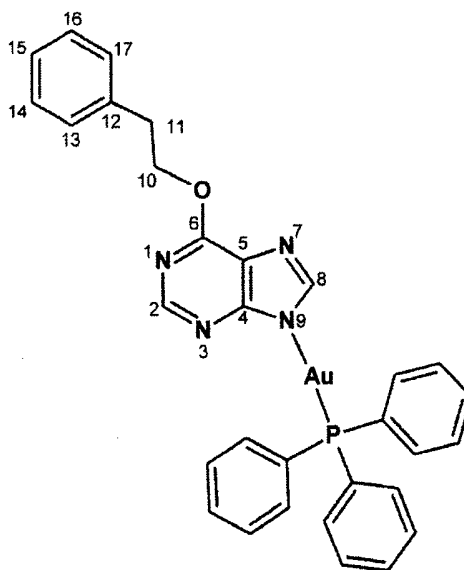
433m, 395w, 371m, 327w $\nu(\text{Au-P})$, 275w. ^1H NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 8,56 (s, C_2H , 1H), 8,50 (s, C_8H , 1H), 7,72 (m, PPh_3 , 15H), 7,55 – 7,38 (m, Ph-hypoxantin, 5H), 5,46 (s, C_{10}H , 2H). ^{13}C NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 159,92 (C_6), 159,19 (C_4), 154,83 (C_2), 148,85 (C_8), 135,39 – 130,30 (PPh_3), 129,69 – 129,13 (Ph-hypoxantin), 69,57 (C_{10}).

5



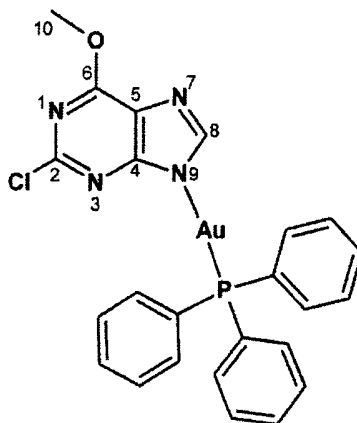
[$\text{Au}(\text{L}_5)(\text{PPh}_3)$] (**5**): Výtěžek: 57%, Elementární složení $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{OPAu}$ ($\text{HL}_5 = \text{O6-fenethylhypoxantin}$): vypočtené C: 53,30; H: 3,75; N: 8,02; získané: C: 52,91; H: 3,78; N: 7,71 %. ESI+ MS (methanol, m/z): 263 (vyp. 263) [HL_5+Na] $^+$, 699 (699) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$. IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3056m $\nu(\text{C-H})_{\text{ar}}$, 2961m, 2796m $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$, 2581m, 1592s $\nu(\text{C=N})_{\text{ar}}$, 1548m, 1451m, 1434s $\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$, 1371m, 1335m, 1308s $\nu(\text{C-O})$, 1260m, 1128m, 10,99s $\nu(\text{O-C}_{10})$, 997m, 958m, 798m, 744m, 689s, 582w, 545s $\nu(\text{Au-N})$, 500s, 450w, 436w, 329m $\nu(\text{Au-P})$, 255w. ^1H NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 8,53 (s, C_2H , 1H), 8,41 (s, C_8H , 1H), 7,80 – 7,59 (m, PPh_3 , 15H), 7,53 – 7,30 (m, Ph-hypoxantin, 5H), 5,49 (t, C_{10}H , 2H), 3,52 (t, C_{11}H , 2H). ^{13}C NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 160,06 (C_6), 159,26 (C_4), 154,23 (C_2), 148,62 (C_8), 128,23–127,56 (Ph-hypoxantin), 119,57 (C_5), 69,13 (C_{10}), 54,23 (C_{11}).

20

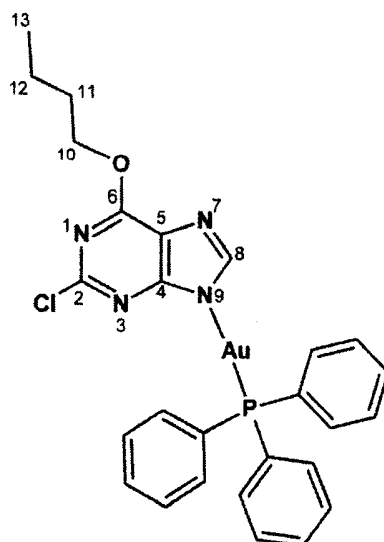


[$\text{Au}(\text{L}_6)(\text{PPh}_3)$] (**6**): Výtěžek: 75%, Elementární složení $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{OPAu}$ ($\text{HL}_6 = \text{2-chlor-O6-methylhypoxantin}$): vypočtené C: 44,84; H: 2,98; N: 8,72; získané: C: 44,97; H: 3,18; N: 9,16 %.

- ESI+ MS (methanol, m/z): 208 (vyp. 208) $[\text{HL}_6 + \text{Na}]^+$, 643 (vyp. 643) $[\text{M} + \text{H}]^+$. IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3052w $\nu(\text{C-H})_{\text{ar}}$, 2979m $\nu(\text{CH}_3)$, 2900w $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$, 1593vs $\nu(\text{C=N})_{\text{ar}}$, 1533m, 1420s $\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$, 1371m, 1339s $\nu(\text{C}_6-\text{C})$, 1291m, 1204s, 1118s $\nu(\text{O-C}_{11})$, 10101m, 933m, 691s, 581m, 541s $\nu(\text{Au-N})$, 513m, 500s, 456m, 449m, 423m, 346m $\nu(\text{Au-P})$, 256w. ^1H NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 8,42 (s, C8H, 1H), 7,76 – 7,67 (m, PPh_3 , 15H), 4,56 (s, C10H, 3H). ^{13}C NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 160,97 (C6), 157,52 (C4), 151,46 (C2), 148,25 (C8), 120,53 (C5), 64,17 (C10).

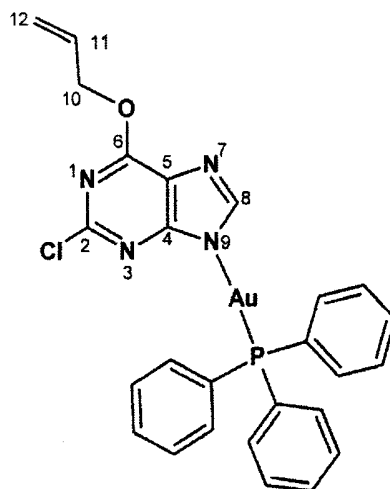


- [Au(L₇(PPh₃))] (7): Výtěžek: 52%, Elementární složení C₂₇H₂₅N₄OPAu (HL₇ = 2-chlor-06-butylhypoxantin): vypočtené C: 47,35; H: 3,68; N: 8,18; získané: C: 47,65; H: 3,69; N: 7,84 %. ESI+ MS (methanol, m/z): 193 (vyp. 193) $[\text{HL}_7 - \text{Cl} + 2\text{H}]^+$, 651 (651) $[\text{M} + \text{H}]^+$. IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3052w, 2958m, 2870m $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$, 1599s, 1533m, 1422m, 1370m, 1297m $\nu(\text{C}_6-\text{C})$, 1202m, 1100m $\nu(\text{O-C}_{11})$, 927m, 746m, 689m, 586w, 543s $\nu(\text{Au-N})$, 512m, 504s, 443w, 432w, 328w $\nu(\text{Au-P})$, 225w. ^1H NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 8,42 (s, C8H, 1H), 7,71 (m, PPh_3 , 15H), 4,56 (s, C10H, 3H), 1,74 (q, C11H, 2H), 1,42 (sx, C12H, 2H), 0,84 (t, C13H, 3H). ^{13}C NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 160,98 (C6), 151,90 (C4), 150,13 (C2), 145,57 (C8), 135,40 – 129,49 (PPh_3), 121,69 (C5), 66,96 (C10), 30,02 (C11), 20,16 (C12), 14,39 (C13).



- [Au(L₈(PPh₃))] (8): Výtěžek: 46%, Elementární složení C₂₆H₂₁N₄OPClAu (HL₈ = 2-chlor-06-allylhypoxantin): vypočtené C: 46,69; H: 3,16; N: 8,38; získané: C: 46,32; H: 3,02; N: 8,68 %. ESI+ MS (methanol, m/z): 199 (vyp. 199) $[\text{HL}_8 + \text{Na}]^+$, 669 (vyp. 669) $[\text{M} + \text{H}]^+$. IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3057w $\nu(\text{C-H})_{\text{ar}}$, 2982m $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$, 1596vs $\nu(\text{C=N})_{\text{ar}}$, 1528m, 1432s $\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$, 1367m, 1299s $\nu(\text{C}_6-\text{O})$, 1284m, 1001m $\nu(\text{O-C}_{11})$, 943m, 689s, 589m, 543s $\nu(\text{Au-N})$, 505m, 449m, 427m, 327m $\nu(\text{Au-P})$, 250w. ^1H NMR ($\text{DMF-}d_7$, ppm): δ (SiMe_4) 8,43 (s, C8H, 1H), 7,67 – 7,23 (m,

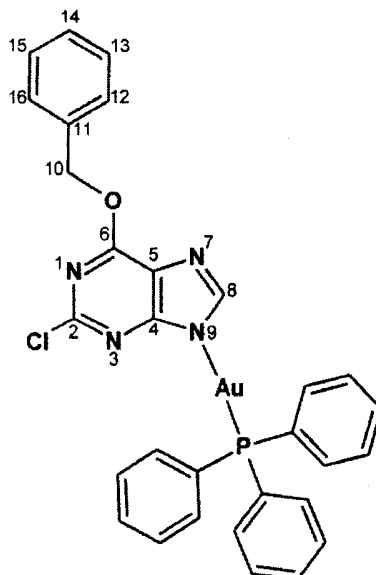
PPh₃, 15H), 6,25 (m, C11H, 1H), 5,49 (d, C12Ha, 1H), 5,27 (d, C12Hb, 1H), 5,24 (d, C10H, 2H).
¹³C NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ (SiMe₄) 160,54 (C6), 155,02 (C4), 154,31 (C2), 149,15 (C8),
 136,28 – 130,01 (PPh₃), 133,51 (C11), 120,89 (C5), 118,52 (C12), 66,75 (C10).



5

[Au(L₉(PPh₃))] (9): Výtěžek: 43%, Elementární složení C₃₀H₂₃N₄O₂PClAu (HL₉ = 2-chlor-*O*6-benzylhypoxantin): vypočtené C: 50,12; H: 3,22; N: 7,79; získané: C: 50,43; H: 3,36; N: 7,52 %.
 ESI+ MS (methanol, m/z): 301 (vyp. 301) [HL₉+K]⁺, 723 (vyp. 723) [M-Cl⁻+H⁺+K⁺]. IR
 (ν_{ATR}/cm⁻¹): 3095m ν(C-H)_{ar}, 2892m, 1597s ν(C=N)_{ar}, 1436m ν(C=C)_{ar}, 1355m, 1297s ν(C₆-O),
 1087m ν(O-C₁₁), 1001w, 692m, 581w, 542s, ν(Au-N), 506m, 458w, 458w, 442w, 328w ν(Au-P).
¹H NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ (SiMe₄) 8,23 (s, C8H, 1H), 7,83 – 7,65 (m, PPh₃, 15H), 7,56 –
 7,38 (m, Ph-hypoxantin, 5H), 5,49 (s, C10H, 2H). ¹³C NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ (SiMe₄) 160,98
 (C6), 159,59 (C4), 155,49 (C2), 150,13 (C8), 135,46 – 130,73 (PPh₃), 129,75 – 129,13 (Ph-
 hypoxantin), 117,78 (C5), 70,18 (C10).

15



20

Příklad 2: Molekulové struktury komplexů [Au(L₁)(PPh₃)] (1) a [Au(L₃)(PPh₃)] (3), HL₁ = *O*6-ethylhypoxantin a HL₃ = *O*6-allylhypoxantin, stanovené za využití monokrystalové rentgenové strukturní analýzy, kde krystalografické parametry jsou uváděny v jednotkách Å, pro které platí převodní vztah: 1 Å = 10⁻¹⁰ m.

Základní krystalografické parametry komplexu $[\text{Au}(\text{L}_1)(\text{PPh}_3)]$ (1): mřížkové parametry: a 10,3007(2) Å, b 10,8432(2) Å, c 11,3338(2) Å, α 103,9686(14)°, β 97,5474(13)°, γ 109,9333(15)°, prostorová grupa: $P-1$, vazebné délky: Au1–N9 2,048(2) Å, Au1–P1 2,234(2) Å, vazebný úhel: N9–Au1–P1 172,730(11)° (viz obrázek 4).

5

Základní krystalografické parametry komplexu $[\text{Au}(\text{L}_3)(\text{PPh}_3)]$ (3): mřížkové parametry: a 10,4415(3) Å, b 11,0883(2) Å, c 11,1500(2) Å, α 102,6310(15)°, β 111,338(2)°, γ 97,4988(18)°, prostorová grupa: $P-1$, vazebné délky: Au1–N9 2,042(2) Å, Au1–P1 2,236(2) Å, vazebný úhel: N9–Au1–P1 175,651(12)° (viz obrázek 5).

10

Příklad 3: *In vitro* cytotoxická aktivita komplexů zlata v oxidačním stavu +I a derivátů hypoxantinu HL_{1-9} na lidské leukemické linii THP–1.

- 15 Před určením *in vitro* protizánětlivé aktivity připravených komplexů zlata(I) byla stanovena *in vitro* cytotoxicita u lidských leukemických buněk THP–1 použitím WST–1 testu. Během tohoto testu živé (metabolicky aktivní) buňky redukují červené barvivo 4–[3–(4–jodfenyl)–2–(4–nitrofenyl)–2*H*–5–tetrazolio]–1,3–benzensulfonát (WST–1) na žlutý formazan. Tato reakce je řízená mitochondriálním enzymem sukcinát–tetrazolium reduktasou, který je aktivní pouze v živých buňkách. Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné množství absorpance spektrofotometricky. THP–1 buněčná linie byla kultivována v plastových lahvích s RPMI 1640 médiem suplementovaným 2mM L–glutaminem, 10% fetálním bovinním sérem, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml) při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO_2 . Pro účely stanovení vlastní cytotoxické aktivity byla připravena buněčná suspenze 5×10^5 buněk/ml v kultivačním médiu RPMI 1640 (viz výše), které neobsahovalo bovinní sérum. Tato buněčná suspenze byla rozpipetována po 100 µl do 96–jamkové mikrotitrační destičky. Testované zlatné komplexy a ligandy byly nejprve rozpuštěny v dimethyl sulfoxidu, a pak naředěny do koncentrace 10 mM a tyto sloužily jako zásobní roztoky. Zásobní roztoky byly před každým testováním 10x zředěny kultivačním médiem bez séra a 1 µl tohoto roztoku byl přidán k buněčné suspenzi. Směsi byly následně inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C, 100% vlhkosti a v atmosféře CO_2 . Poté byl přidán roztok WST–1 a následovala inkubace po dobu 45 minut. Vzniklý formazan byl kvantifikován spektrofotometricky (Synergy HT, BioTek) při 440 nm a referenční vlnové délce 630 nm.
- 20
- 25
- 30
- 35 Inhibiční koncentrace testovaných komplexů IC_{50} (µM), odpovídající koncentraci testovaných látek potřebné k inhibici růstu 50% nádorových buněk, byly vypočteny z dávkových křivek a jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Výsledky *in vitro* cytotoxicity komplexů 1–9 a derivátů hypoxantinu HL₁–HL₉ vůči lidské leukemické linii THP-1. Výsledky jsou vyjádřeny v hodnotách inhibiční koncentrace IC₅₀±SE (μM) a porovnány s Auranofinem jako zvoleným standardem.

Testovaná látka	IC ₅₀ ± SE (μM) THP-1
[Au(L ₁)(PPh ₃)] (1)	1,17±0,04
[Au(L ₂)(PPh ₃)] (2)	1,03±0,04
[Au(L ₃)(PPh ₃)] (3)	1,87±0,09
[Au(L ₄)(PPh ₃)] (4)	2,15±0,19
[Au(L ₅)(PPh ₃)] (5)	1,89±0,11
[Au(L ₆)(PPh ₃)] (6)	1,94±0,12
[Au(L ₇)(PPh ₃)] (7)	1,97±0,14
[Au(L ₈)(PPh ₃)] (8)	5,28±0,21
[Au(L ₉)(PPh ₃)] (9)	> 10
Auranofin	0,88±0,04
HL ₁	>10
HL ₂	>10
HL ₃	>10
HL ₄	>10
HL ₅	>10
HL ₆	>10
HL ₇	>10
HL ₈	>10
HL ₉	>10

5

HL₁ = O6-ethylhypoxantin; HL₂ = O6-butylhypoxantin; HL₃ = O6-allylhypoxantin; HL₄ = O6-benzylhypoxantin; HL₅ = O6-fenethylhypoxantin; HL₆ = 2-chlor-O6-methylhypoxantin; HL₇ = 2-chlor-O6-butylhypoxantin; HL₈ = 2-chlor-O6-allylhypoxantin; HL₉ = 2-chlor-O6-benzylhypoxantin.

10

Příklad 4: Stanovení vlivu testovaných komplexů zlata v oxidačním stavu +I na sekreci vybraných prozánětlivých cytokinů (TNF-α a IL-1β) ve srovnání s Auranofilem a vehikulem.

15

Pro stanovení *in vitro* protizánětlivé aktivity testovaných komplexů zlata byly použity buňky podobné makrofágům odvozené z lidské buněčné linie THP-1. Buňky THP-1 byly kultivovány v plastových lahvích s RPMI 1640 médiem suplementovaným 2mM L-glutaminem, 10% fetálním bovinním sérem, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 μg/ml) (tzv. kompletní medium) při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂. Za účelem diferenciaci byla připravena buněčná suspenze 5 x 10⁵ buněk/ml. Tato buněčná suspenze byla rozpipetována po 100 μl do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky. Diferenciaci byla zpuštěna přidáním 1 μl 5 μg/ml 12-O-tetradekanoyl-forbol-13-acetátu rozpuštěného v 5% DMSO v RPMI 1640 médiu. Buňky byly poté inkubovány 24 hodin při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂. Diferencované buňky adherovaly na dno kultivační láhve. Médium s nediferencovanými buňkami bylo odsáto a nahrazeno čerstvým kompletním RPMI 1640 médiem bez 12-O-tetradekanoyl-forbol-13-acetátu. Buňky byly kultivovány dalších 24 hodin. Poté bylo odsáto kultivační médium, buňky byly promyty fosfátovým pufrem (pH=7,4) a bylo k nim přidáno 100 μl kompletního kultivačního média bez bovinního séra; takto byly buňky inkubovány dalších 24 hodin. Takto připravené makrofágům podobné buňky byly použity na testování protizánětlivé aktivity, která byla stanovena na základě určení vlivu testovaných Au(I) komplexů na sekreci prozánětlivých cytokinů TNF-α a IL-1β. K diferencovaným buňkám THP-1 v 96-ti jamkové mikrotitrační

30

destičce (objem média 100 μ l na jamku) bylo přidáno 1 μ l 30 μ M roztoku testovaných látek rozpuštěných v 10% (w/w) DMSO v RPMI 1640 médiu. Buňky byly s testovanými látkami preinkubovány hodinu. Dále byl k buňkám přidán 1 μ l 100 μ g/ml lipopolysacharidu (LPS) z *Escherichia coli* 0111:B4 rozpuštěným v RPMI 1640 médiu, který simuluje zánětlivou reakci aktivací TLR–4 receptoru, a buňky byly poté inkubovány 24 hodin při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂. Po této inkubaci bylo odebráno kultivační médium, ve kterém se po centrifugaci stanovil obsah prozánětlivých cytokinů TNF– α a IL–1 β metodou ELISA (Enzyme–Linked Immuno–Sorbent Assay). Statistická analýza byla provedena programem ANOVA a Tuckey testem pro vícenásobné porovnání. Výsledky (viz. tabulka 2, obrázek 6, obrázek 7) byly srovnány s Auranofinem a vehikulem (buňky, ke kterým byl přidán pouze LPS).

V Tabulce 2 jsou uvedeny koncentrace prozánětlivých cytokinů TNF– α a IL–1 β stanovené po inkubaci LPS–stimulovaných makrofágů THP–1 buněk s testovanými komplexy.

Tabulka 2. Výsledky *in vitro* protizánětlivé aktivity komplexů 1–7 ukazující ovlivnění sekrece prozánětlivých cytokinů TNF– α a IL–1 β a jejich srovnání s Auranofinem a vehikulem (maximální odpověď buněk na zánětlivý stimul (LPS)). Výsledky jsou vyjádřeny v hodnotách koncentrace $c \pm SE$ (pg/ml) příslušného cytokinu v kultivačním médiu.

Testovaná látka	$c \pm SE$ (pg/ml)	$c \pm SE$ (pg/ml)
	TNF– α	IL–1 β
[Au(L ₁)(PPh ₃)] (1)	5765 $\pm$ 367	353,4 $\pm$ 32,6
[Au(L ₂)(PPh ₃)] (2)	4496 $\pm$ 325	237,1 $\pm$ 61,0
[Au(L ₃)(PPh ₃)] (3)	5745 $\pm$ 418	250,9 $\pm$ 11,2
[Au(L ₄)(PPh ₃)] (4)	3516 $\pm$ 255	238,6 $\pm$ 33,5
[Au(L ₅)(PPh ₃)] (5)	5563 $\pm$ 620	270,3 $\pm$ 47,0
[Au(L ₆)(PPh ₃)] (6)	6200 $\pm$ 676	284,9 $\pm$ 41,5
[Au(L ₇)(PPh ₃)] (7)	4793 $\pm$ 536	220,2 $\pm$ 22,3
Auranofin	5254 $\pm$ 499	210,5 $\pm$ 9,1
vehikulum	8804 $\pm$ 392	703,2 $\pm$ 65,1

HL₁ = O6–ethylhypoxantin; HL₂ = O6–butylhypoxantin; HL₃ = O6–allylhypoxantin; HL₄ = O6–benzylhypoxantin; HL₅ = O6–fenethylhypoxantin; HL₆ = 2–chlor–O6–methylhypoxantin; HL₇ = 2–chlor–O6–butylhypoxantin.

Příklad 5: Stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na transkripci prozánětlivých cytokinů TNF– α a IL–1 β ve srovnání s Auranofilem a vehikulem.

Další úroveň testování protizánětlivé aktivity bylo posouzení vlivu testovaných látek na transkripci genů prozánětlivého cytokinu TNF– α a genů prozánětlivého cytokinu IL–1 β . K diferencovaným buňkám v 96–ti jamkové mikrotitrační destičce (objem média 100 μ l na jamku) byl přidán 1 μ l 30 μ M roztoku testovaných látek rozpuštěných v 10% (w/w) DMSO v RPMI 1640 médiu. Buňky byly s testovanými látkami preinkubovány hodinu. Následně byl k buňkám přidán 1 μ l 100 μ g/ml lipopolysacharidu (LPS) z *Escherichia coli* 0111:B4 rozpuštěným v RPMI 1640 médiu, který simuluje zánětlivou reakci aktivací TLR–4 receptoru, a buňky byly dále inkubovány 2 hodiny při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂. Následně bylo inkubační médium odsáto a buňky byly promyty ledovým PBS (pH 7,4). Přisedlé buňky byly rozloženy komerčně dostupným lyzačním pufrem s obsahem inhibitorů RNAs. Uvolněná mRNA byla převedena na cDNA pomocí reverzní transkriptasy. Množství získané cDNA bylo kvantifikováno metodou real–time PCR (qPCR), přičemž jako endogenní kontrola kvantifikace byla použita mRNA (re-

spektive cDNA) genu pro β -aktin. Relativní změna genové exprese $\text{TNF-}\alpha$ po působení zlatnými komplexy byla vypočtena metodou $\Delta\Delta\text{C}_T$.

Pro stanovení *in vitro* protizánětlivé aktivity studovaných komplexů $[\text{Au}(\text{L}_2)(\text{PPh}_3)]$ (2), $[\text{Au}(\text{L}_7)(\text{PPh}_3)]$ (7) a Auranofinu byla použita výše popsaná metoda na stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na transkripci genů prozánětlivých cytokinů $\text{TNF-}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$ ($\text{HL}_2 = \text{O6}$ -butylhypoxantin, $\text{HL}_7 = 2$ -chlor- O6 -butylhypoxantin). Statistická analýza byla provedena programem ANOVA a Tuckey testem pro vícenásobné porovnání (tabulka 3, obrázek 8, obrázek 9).

Tabulka 3. Výsledky *in vitro* protizánětlivé aktivity ukazující výslednou transkripci genů prozánětlivých cytokinů $\text{TNF-}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$ ovlivněnou studovanými komplexy 2 a 7 ve srovnání s Auranofinem a vehikulem.

Testovaná látka	genová transkripce (A.U.± SE)	genová transkripce (A.U.± SE)
	$\text{TNF-}\alpha$	$\text{IL-1}\beta$
$[\text{Au}(\text{L}_2)(\text{PPh}_3)]$ (2)	46,37±1,78	2,21±0,43
$[\text{Au}(\text{L}_7)(\text{PPh}_3)]$ (7)	42,67±0,78	2,34±0,46
Auranofin	43,59±4,86	2,26±0,20
vehikulum	79,72±8,44	4,20±0,56

$\text{HL}_2 = \text{O6}$ -butylhypoxantin; $\text{HL}_7 = 2$ -chlor- O6 -butylhypoxantin.

Příklad 6: *In vitro* cytotoxická aktivita $\text{Au}(\text{I})$ komplexů na vybraných lidských nádorových liniích.

Pro stanovení *in vitro* protizánětlivé aktivity připravených $\text{Au}(\text{I})$ komplexů byl použit MTT test, což je mikrotitrační metoda, která hodnotí životaschopnost buněk na základě redukce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) na modré formazanové barvivo. K této redukci dochází pouze v živých buňkách, jejichž počet tak odpovídá množství zredukovaného MTT, takže lze tímto způsobem stanovit cytotoxicitu různých chemických látek. V rámci buňky jsou za redukci zodpovědné enzymy mitochondriálních dehydrogenas. Vznikající formazanové barvivo je nerozpustné a je následně kvantifikováno po rozpuštění v DMSO na klasickém spektrofotometru (ELISA reader). *In vitro* testy protinádorové aktivity byly provedeny na následujících lidských nádorových buněčných liniích: osteosarkom (HOS), prsní adenokarcinom (MCF7), karcinom plic (A549), maligní melanom (G361), karcinom děložního čípku (HeLa), karcinom vaječníku (A2780), karcinom vaječníku rezistentní na *cisplatinu* (A2780R) a karcinom prostaty (22Rv1). Linie byly udržovány v kultivačních lahvích v DMEM médiu (4,5 g/l glukosy, 2 mM L-glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný) pro buněčné kultury A549, HeLa, HOS, MCF7, v RPMI-1610 médiu (2 mM L-glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitanu sodného) pro buněčné kultury A2780, A2780R, LNCaP a v McCoy's médiu (2 mM L-glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitanu sodného) pro buněčné kultury G361. Suspenze buněk (25 000 buněk/-jamka) byly rozpipetovány po 200 µl na 96-ti jamkové mikrotitrační destičky. Tyto byly preinkubovány při 37 °C v atmosféře CO_2 po dobu 24 hodin. Testované látky byly nejprve rozpuštěny v *N,N'*-dimethylformamidu, a pak naředěny do koncentrace 50,0 mM a tyto sloužily jako zásobní roztoky. Pro vlastní experiment byly zásobní roztoky ředěny 1000x v kultivačním médiu do maximální koncentrace determinované rozpustností látky (20,0–50,0 µM). Po odsátí kultivačního média byla směs jednotlivých testovaných látek přidána k preinkubované suspenzi nádorových buněk. Směsi byly následně inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C a v atmosféře 5%

CO₂. Poté byl přidán zředěný roztok MTT v sérovém médiu (0,3 mg/ml) a následovala inkubace po dobu 1 hodiny. Analýza koncentrace MTT formazanu byla provedena spektrofotometricky (TECAN, Schoeller Instruments LLC) při 540 nm.

- 5 V Tabulce 3a jsou uvedeny inhibiční koncentrace testovaných komplexů IC₅₀ (μM).

10 Tabulka 3a. Výsledky *in vitro* cytotoxicity připravených komplexů 4–6 a derivátů hypoxantinu HL₄–HL₆ stanovené pomocí MTT testu a vyjádřené v hodnotách inhibiční koncentrace IC₅₀±SE (μM), a jejich porovnání s *cisplatinou* jako zvoleným standardem.

Testovaná látka	IC ₅₀ ±SE (μM)							
	MCF7	HOS	A549	G361	HeLa	A2780	A2780R	22RV1
[Au(L ₄)(PPh ₃)] (4)	3,7±1,4	11,3±2,0	16,8±2,1	3,9±1,5	14,2±1,5	3,6±0,4	5,3±1,1	3,8±0,4
[Au(L ₅)(PPh ₃)] (5)	6,3±2,4	6,6±2,9	19,3±2,5	3,4±0,2	19,8±2,8	4,2±0,7	5,2±1,0	4,4±0,8
[Au(L ₆)(PPh ₃)] (6)	5,2±2,1	4,0±0,9	21,7±1,1	3,0±0,4	21,6±1,0	4,2±1,0	5,0±0,9	3,6±0,2
<i>cisplatina</i>	17,9±3,5	20,5±0,3	>50	5,3±0,7	>50	21,6±0,6	20,0±4,7	26,9±3,5
HL ₄	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
HL ₅	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
HL ₆	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25

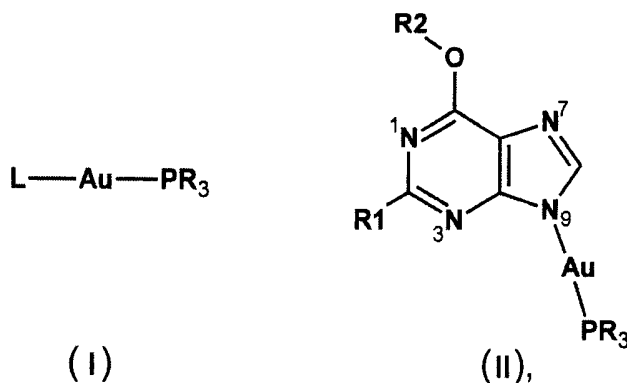
15 HL₄ = O6-benzylhypoxantin; HL₅ = O6-fenetylhypoxantin; HL₆ = 2-chlor-O6-methylhypoxantin; MCF7 = lidský prsní adenokarcinom; HOS = lidský osteosarkom; A549 = lidský karcinom plic; G361 = lidský maligní melanom; HeLa = lidský karcinom děložního čípku; A2780 = lidský karcinom vaječníků; A2780R = lidský karcinom vaječníků resistentní vůči *cisplatině*; 22Rv1 = lidský karcinom prostaty

20

PATENTOVÉ NÁROKY

25

1. Komplexy zlata v oxidačním stavu +I s deriváty hypoxantinu (1*H*-purin-6(9*H*)-onu) a s deriváty fosfanu, a jejich krystalosolváty, zahrnující strukturní motiv I obecného vzorce [Au(L)-(PR₃)] a vyjádřený strukturním vzorcem II,



30

kde

- symbol L představuje deprotonizovaný derivát hypoxantinu vázaný přes atom dusíku N9 na atom zlata způsobem vyjádřeným v základním motivu I,
- 35 – PR₃ je derivát fosfanu,

– substituenty R jsou nezávisle vybrány ze skupiny alkyl, cykloalkyl, substituovaný alkyl, substituovaný cykloalkyl, aryl, nebo heteroaryl, a/nebo jejich libovolné kombinace,

– substituent R1 je nezávisle vybrán ze skupiny atom vodíku, halogen,

5 – substituent R2 je nezávisle vybrán ze skupiny atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, alkenyl, substituovaný alkenyl, alkynyl, substituovaný alkynyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl, substituovaný cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, substituovaný cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl, substituovaný cykloheteroalkenyl, aryl, heteroaryl,

kde termín:

– *halogen*

10 představuje atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu

– *alkyl*

představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 8, především pak z 1 až 6 atomů uhlíku,

– *alkenyl*

15 představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 12, především pak ze 3 až 6 atomů uhlíku, obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku,

– *alkynyl*

představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 12, především pak ze 3 až 6 atomů uhlíku obsahující alespoň jednu trojnou vazbu mezi atomy uhlíku,

20 – *cykloalkyl*

představuje cyklický uhlovodík ze 3 až 12, především pak ze 3 až 8 atomů uhlíku, a to včetně kondenzovaných cyklů nezávisle vybraných ze skupiny cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl,

– *cykloheteroalkyl*

25 představuje cykloalkyl s alespoň jedním atomem uhlíku zaměněným za heteroatom ze skupiny dusík, kyslík, nebo síra,

– *cykloalkenyl*

představuje cykloalkyl obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku,

– *cykloheteroalkenyl*

30 představuje cykloheteroalkyl obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi dvěma atomy uhlíku, atomem uhlíku a heteroatomem, nebo dvěma heteroatomy,

– *substituovaný alkyl*, *substituovaný alkenyl*, *substituovaný alkynyl*, *substituovaný cykloalkyl*, *substituovaný cykloheteroalkyl*, *substituovaný cykloalkenyl*, *substituovaný cykloheteroalkenyl*

35 představují alkyl, alkenyl, alkynyl, cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl substituované substituenty z množiny halogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl,

– *aryl*

představuje fenyl,

– *heteroaryl*

40 představuje aryl s alespoň jedním atomem uhlíku zaměněným za heteroatom ze skupiny dusík, kyslík, nebo síra.

2. Krystalosolváty komplexů zlata strukturního vzorce II podle nároku 1, jejichž složení vyjadřuje vzorec $[\text{Au}(\text{L})(\text{PR}_3)] \cdot n\text{Solv}$, ve kterém jsou

45 – L a PR_3 definovány v nároku 1,

– *n* znamená počet krystalosolvátových molekul a nabývá hodnot především 1 až 6, a

– *Solv* je anorganická nebo organická molekula vybraná ze skupiny voda, primární alkohol, sekundární alkohol, aceton, *N,N'*-dimethylformamid, dimethyl sulfoxid, chloroform, dichlormethan, acetonitril nebo diethylether, a to buď samostatně, nebo v kombinaci uvedených solvátových molekul.

50

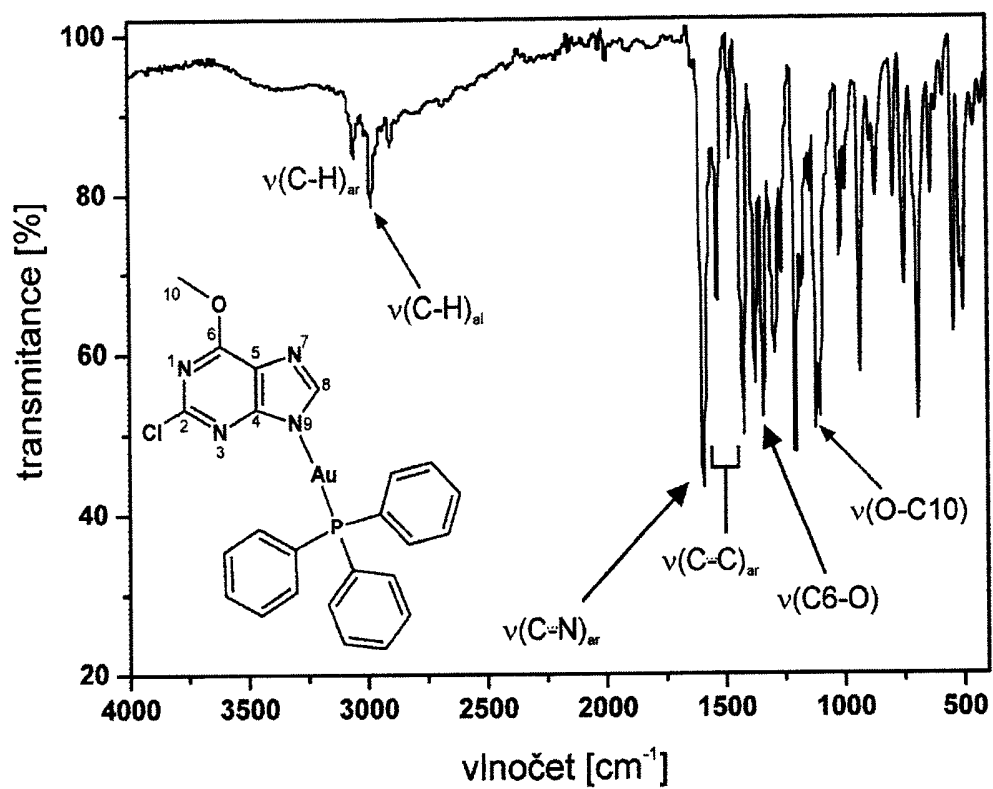
3. Farmakologický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje terapeuticky účinné množství zlatných komplexů vzorce II podle nároku 1 nebo jejich krystalosolvátů podle nároku 2 s jedním či více přijatelnými nosiči a pomocnými látkami.

- 5 4. Použití farmakologického prostředku podle nároku 3 pro výrobu léčiv pro léčení zánětlivých a/nebo nádorových onemocnění, zejména pro léčení adenokarcinomu prsu a/nebo osteosarkomu a/nebo karcinomu plic a/nebo maligního melanomu a/nebo karcinomu děložního čípku a/nebo karcinomu vaječníků a/nebo karcinomu vaječníků rezistentnímu vůči *cisplatině* a/nebo karcino-

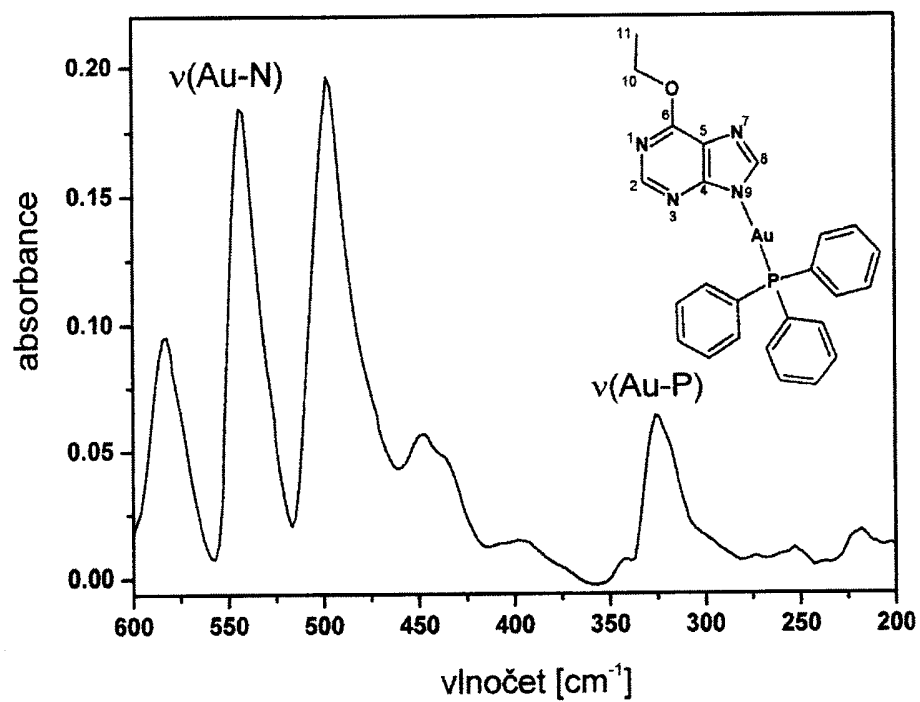
10

6 výkresů

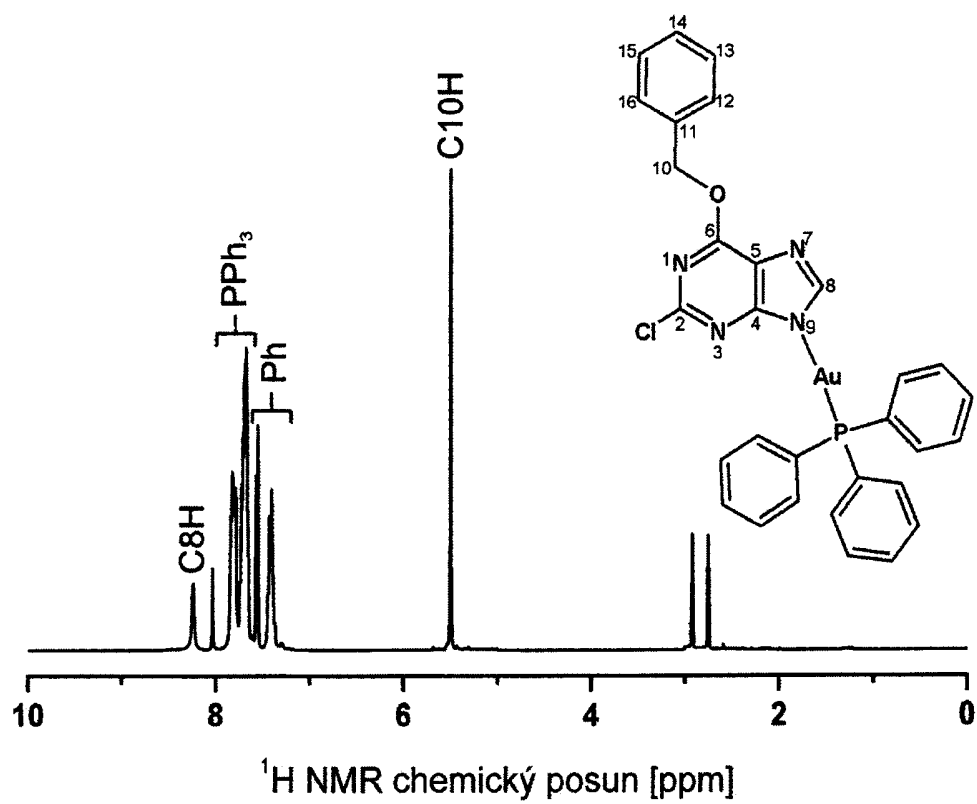
15



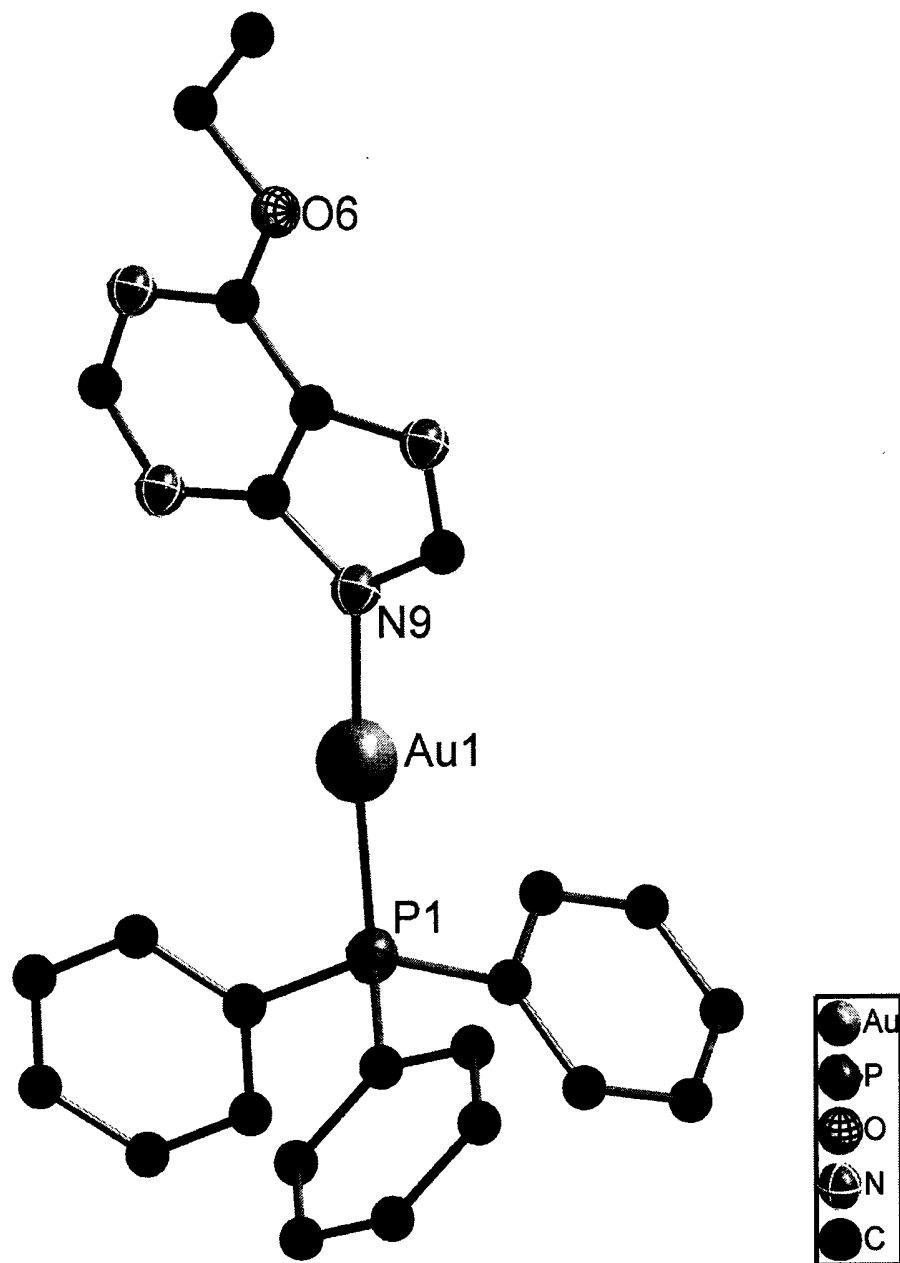
OBR. 1



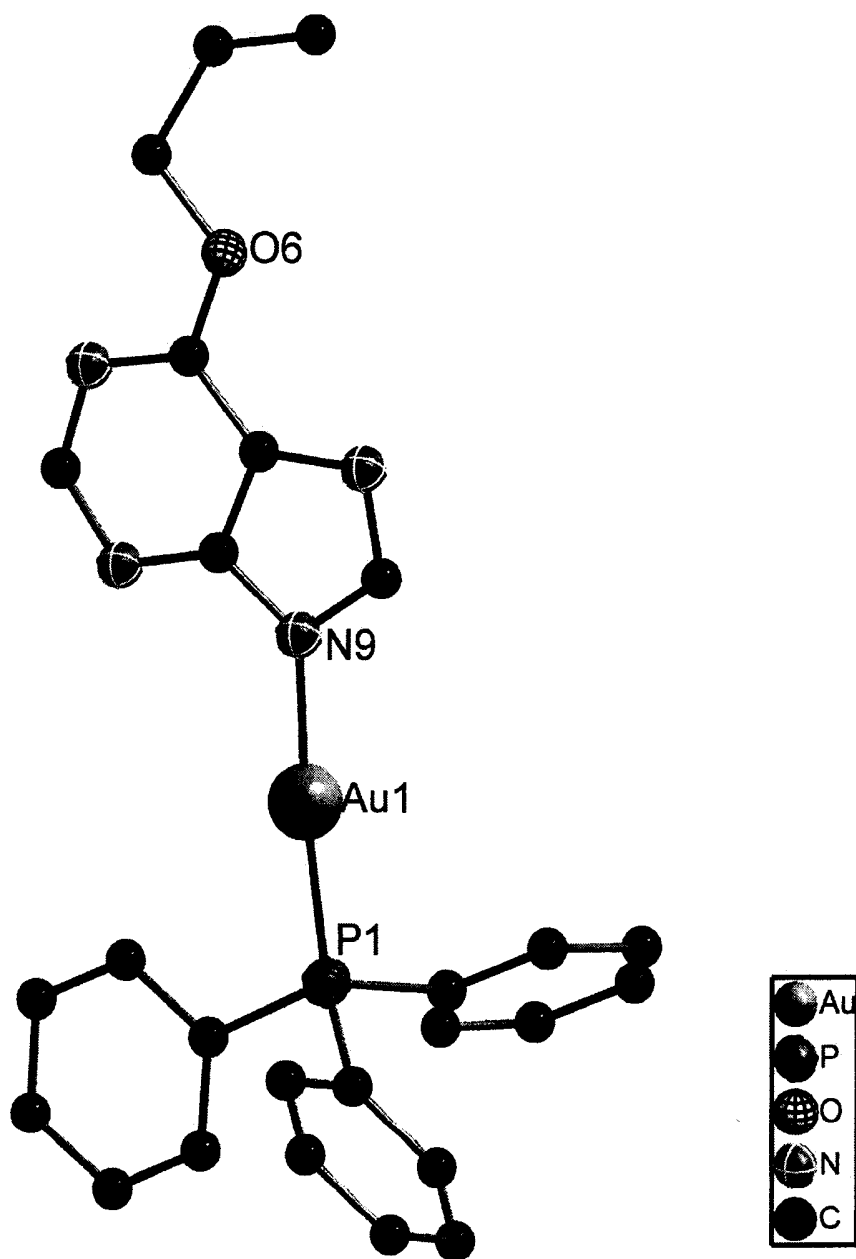
OBR. 2



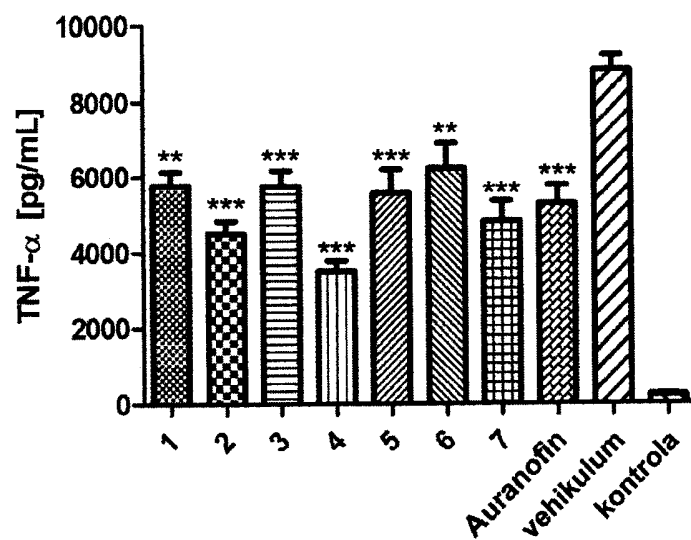
OBR. 3



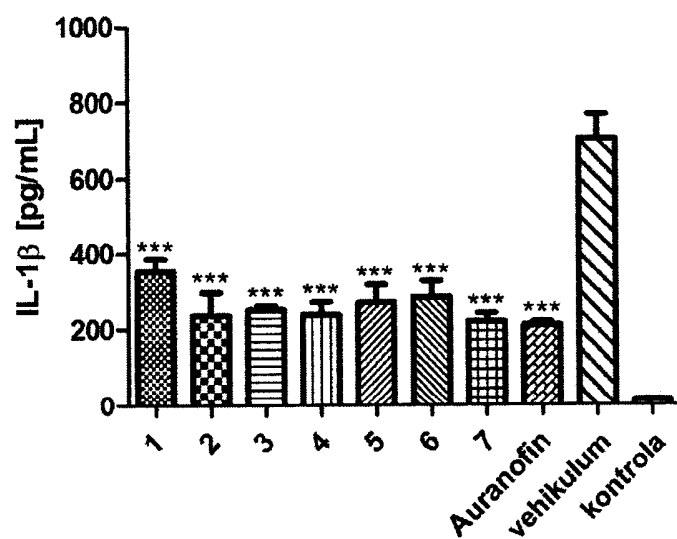
OBR. 4



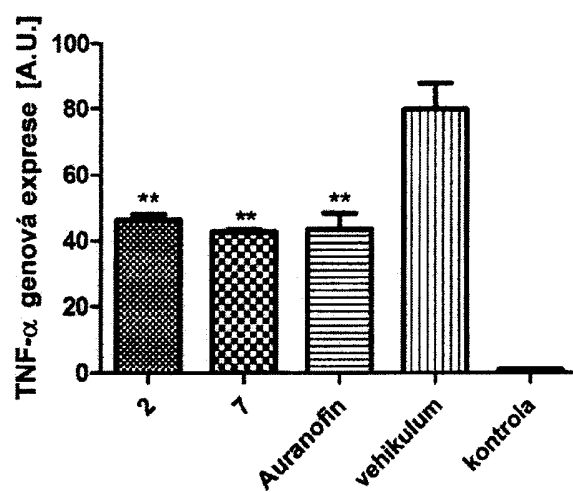
OBR. 5



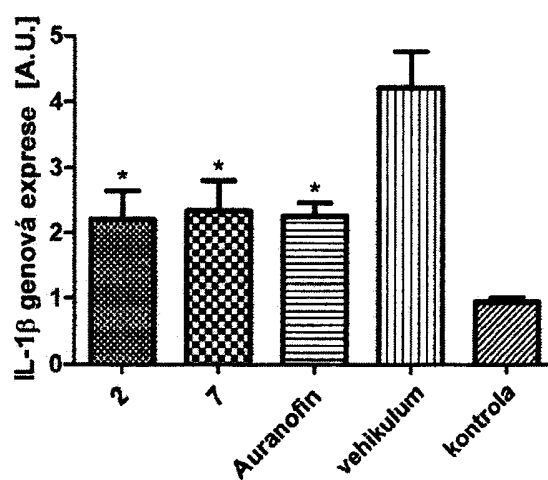
OBR. 6



OBR. 7



OBR. 8



OBR. 9

Konec dokumentu
