

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

303 417

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)
C07F 15/00 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-626**
 (22) Přihlášeno: **06.10.2011**
 (40) Zveřejněno: **05.09.2012**
 (**Věstník č. 36/2012**)
 (47) Uděleno: **26.07.2012**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **05.09.2012**
 (**Věstník č. 36/2012**)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 02059134 A1; GB 2304712 A.

New E. J. et al: Fluorescent analogues of quinoline reveal amine ligand loss from cis and trans platinum(II) complexes in cancer cells; J. Inorg. Biochem., 103 (2009) 1120-1125; tabulka 1; Ruiz J. et al.: New 7-azaindole palladium and platinum complexes: crystal structures and theoretical calculations. In vitro anticancer activity of platinum compounds; Dalton Trans., 2010, 39, 3290-3301; tabulky 4 a 5; Harrison R. C. et al.: In vivo properties of some new cis-platinum complexes containing 7-azaindole ligands. Inorg. Chim. Acta, 92 (1984) 43-46, abstrakt.

(73) Majitel patentu:

Univerzita Palackého, Olomouc, CZ

(72) Původce:

Trávníček Zdeněk Prof. RNDr. Ph.D., Štěpánov, CZ
 Štarha Pavel Mgr. Ph.D., Dub nad Moravou, CZ
 Popa Igor Mgr. CSc., Olomouc, CZ

(74) Zástupce:

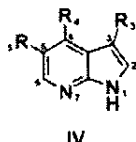
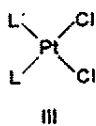
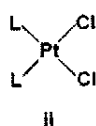
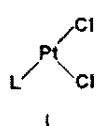
Ing. Petr Soukup, Videňská 8, Olomouc, 77200

(54) Název vynálezu:

**Dichlorido komplexy platiny s halogenderiváty
 7-azaindolu, způsob jejich přípravy a použití
 těchto komplexů jako léčiv v protinádorové
 terapii**

(57) Anotace:

Dichlorido komplexy platiny v oxidačním stupni +II a jejich krystalosolváty zahrnující strukturní motiv I obecného vzorce II nebo III a vyjádřené strukturními vzorci cis-[PtCl₂(L)₂] II' nebo cis-[PtCl₂(L)(L')] III', kde symboly L a L' představují halogenderivát 7-azaindolu obecného vzorce IV vázaného na atom platiny přes libovolný atom dusíku nezávisle vybraný z atomů N1 nebo N7, kde substituenty R₃, R₄ a R₅ odpovídají atomu chloru, bromu, nebo jodu.



CZ 303417 B6

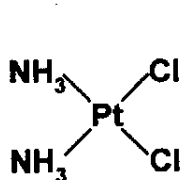
Dichlorido komplexy platiny s halogenderiváty 7-azaindolu, způsob jejich přípravy a použití těchto komplexů jako léčiv v protinádorové terapii

5 Oblast techniky

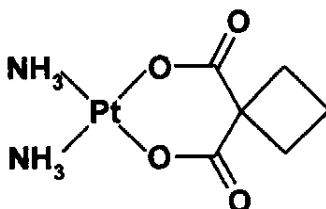
Předložený vynález, spadající do oblasti léčiv nádorových onemocnění na bázi platiny, se týká dichlorido komplexů platiny s halogenderiváty 7-azaindolu, jejich způsobu přípravy vycházejícího z $M_2[PtCl_4]$, kde M je atom H, K, nebo Na, a jejich použití v lékařské praxi jako léčiv a farmaceutických kompozic, které tyto komplexy obsahují jako účinnou látku.

Dosavadní stav techniky

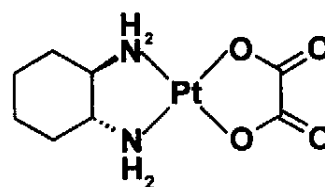
Cis-dichlorido komplexy platiny představují významnou skupinu látek, jež má díky cis-diaminodichlorido-platnatému komplexu (*cisplatina*, vzorec A) využití v praxi, jelikož *cisplatina* je nejdéle a jedním z nejvíce používaných léčiv na bázi platiny představujících účinnou složku farmaceutických kompozic v protinádorové terapii. Uvedení *cisplatiny* do onkologické praxe vedlo k přípravě a studiu biologických vlastností tisíců koordinačních sloučenin platiny, přičemž méně než pět substancí úspěšně absolvovalo klinická studia a je v současné době celosvětově nebo jen v některých státech používáno k léčbě nádorových onemocnění. Obecně za druhou generaci léčiv na bázi platiny je možno považovat diamino-platnaté komplexy s tzv. odstupující skupinou odlišnou, resp. odstupujícími skupinami odlišnými, od dvou chloridových aniontů *cisplatiny*, třetí generace se pak od *cisplatiny* liší použitými aminy resp. použitým aminem. Klinicky používanými reprezentanty druhé a třetí generace léčiv na bázi platiny jsou diamin-1,1'-cyklobutandikarboxylát-platnatý komplex (*karboplatina*; vzorec B), resp. (1R,2R)-1,2-diaminocyklohexanoxalát-platnatý komplex (*oxaliplatina*; vzorec C). Do fáze klinických testů byly přijaty taktéž *trans*-izomery odvozené od *cisplatiny* nebo vícejaderné komplexy platiny.



(A)



(B)



(C)

30

Dosud byly připraveny platnaté dichlorido komplexy s různými N-donorovými ligandy, které lze formálně považovat za deriváty *cisplatiny*. Při omezení se na ty substance, které jsou dostupné z publikované patentové literatury, jsou známy Pt(II)-dichlorido komplexy s následujícími N-donorovými ligandy: s amino-substituovanými polycyklickými uhlovodíky (JP 3002191), se substituovaným aminopyrrolidinem (JP 5178872), s deriváty *L*-xylopyranosideplatinum (JP 312-7796), se substituovanými cykloalkany jako je např. 1,2-bis(aminomethyl)cyklobutan (JP 2000-795), s 1,4-diaminocyklohexanem (US 5 393 909), s kombinací substituovaného aminu (např. cyklického aminu) a NH_3 , nebo jeho mono- nebo dialkyl deriváty (US 5 665 771), s aminoalkyl-substituovanými cykloalkylaminy (US 4 970 324, US 5 116 831), s 2-octyl-1,3-diaminopropanem (JP 62051693 A), s vícesubstituovanými deriváty pyrazolu (PL 381974; E. Budzisz, M. Miernicka, I.-P. Lorenz, P. Mayer, E. Balcerzak, U. Krajewska, M. Rozalski, *Eur. J. Med. Chem.* 45, 2010, 2613 až 2621), s deriváty alkylendiaminu (JP 9025285), s 3,4-diamino-3,4-dideoxy-*L*-xylopyranosou a 2,4-diamino-2,4-dideoxy-*L*-arabinopyranosou (JP 2223591), s 3-aminoperhydroazepinem (JP 63307890, JP 63303988), s křemík-obsahujícími organokovovými diaminy (JP 63267794), s 2-alkyl-1,3-diaminopropanem (JP 63208597), s 2,3-disubstituovaným 1,4-diaminobutanem (JP 63203692), s diaminy, jako je např. 1,1-bis(aminomethyl)-4-oxacyklo-

45

hexan (JP 63112591), s diaminocyklohexanoly jako je např. *DL*-2,3-diamino(1,2/3)-cyclohexanol (JP 63017894, JP 61286396), s alkylendiaminy substituovanými na uhlíkovém řetězci i na dusíkových atomech (JP 62190192, JP 51263991), s aminoalkyl-substituovaným pyrimidinem (JP 60214795), s 1,2-diaminoademantanem (JP 5807999 4A), se stilbendaminem (JP 56103192), s diaminocyklopentanem (JP 55130992), s kombinací amoniaku a hydroxylaminu (CN 10113-4601; W. Liu, L. Lou, X. Chen, S. Hou, Q. Ye, Y. Yu, *Arch. Pharmacol. Res.* 33, 2010, 807 až 811), s 5,7-disubstituovanými deriváty 1,2,4-triazol[1,5-*a*]pyrimidinu (PL 196310), s karboxyl-azodiaminem (JP 2028134), s *trans*-1-1,2-diamino-cyklohexanem (WO 0122915), a kombinací NH₃ a primárního tricyklického aminu (např. 1-adamantylamin) CZ 288406).

Předložené platnaté dichlorido komplexy s halogeno-deriváty 7-azaindolu představují novou, v literatuře doposud nepopsanou, skupinu biologicky aktivních komplexů platiny. Vlastní 7-azaindol (Haza) reprezentuje základní strukturní jednotku, od které je odvozeno mnoho derivátů s výraznými biologickými vlastnostmi, které např. inhibují proteinové kinázy (US 20040198737, US 20110166175), působí protizánětlivé (US 20100216768), vykazují protivirovou aktivitu (US 20100239527), atd.

Komplexů platiny v oxidačním stupni +II se 7-azaindolem a jeho deriváty bylo v literatuře popsáno několik a jako příklady je možno uvést: Toxicita a protinádorová aktivita (Yoshida-sarkom, osteosarkom, ADJ/C6A tumor, P388 lymfocytická leukémie) *cis*-[PtCl₂(Haza)₂], *cis*-[PtCl₂(Haza)₂] a [Pt(ox)(Haza)₂] komplexů se 7-azaindolem (Haza) byla studována *in vivo* na myších. Lze konstatovat, že žádné výrazné protinádorové vlastnosti nebyly pozorovány, např. dichlorido komplex nevykazoval žádný cytotoxický efekt vůči uvedeným tumorům při dávkách 50 mg/kg, 600 mg/kg, 125 mg/kg, resp. 400 mg/kg (R. C. Harrison et al. *Inorg. Chim. Acta* 92, 1984, 43 až 46). U komplexu *cis*-[PtCl₂(Haza)(NH₃)] byla, společně s jeho *trans*-izomerem, studována *in vitro* protinádorová aktivita vůči A2780 lidským nádorovým buňkám – výsledná cytotoxická aktivita (IC₅₀ = 3,6 μM a 6,0 μM pro *cis*-, resp. *trans*-izomer) je nižší ve srovnání s *cisplatinou*, jejíž IC₅₀ je pro daný test rovna 1,4 μM (E. J. New et al. *J. Inorg. Biochem.* 103, 2009, 1120 až 1125). J. Ruiz et al. (*Dalton Trans.* 39, 2010, 3290 až 3301) studoval jedno- a dvojjaderné platnaté komplexy se 7-azaindolem, jako je např. [NBu₄][Pt(C₆F₅)₂(Haza)(aza)]-Haza nebo [Pt(dmba)(aza)(dmso)], z nichž druhý uvedený vykazuje submikromolární cytotoxicitu vůči A2780 (IC₅₀ = 0,34 μM) a T47D (IC₅₀ = 0,53 μM) lidským nádorovým liniím (dmba = *N,N'*-dimethylbenzylamin).

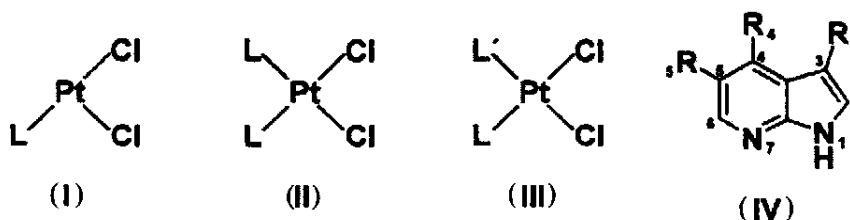
Biologická aktivita pak nebyla dosud studována u následujících komplexních sloučenin s deriváty Haza: Komplexy se 1-(difenylfosfin)-7-azaindolem popsané ve stati H. L. Milton et al. *Inorg. Chem. Commun.* 7 (2004) 1106 až 1108. Obdobné látky, kde jako N,P-bidentátní ligand vystupuje kromě zmíněného 1-(difenylfosfin)-7-azaindolu také 1-(dipyrrolylfosfin)-7-azaindol jsou popsány v práci A. D. Burrows et al. *Dalton Trans.* 2003, 4718 až 4730). Komplex [Pt(*N,N*-Si-BNPA)Ph₂] obsahuje triarylboronovou sloučeninu a *N*-(2'-pyridyl)-7-azaindoly (NPA) spojené tetraedrální silanovou skupinou (Z. M. Hudson et al. *Chem. Eur. J.* 15, 2009, 6131 až 6137). S. B. Zhao publikoval sérii prací s komplexy platiny s deriváty 7-azaindolu. Jsou popsány komplexy s *N*-(2-pyridyl)-7-azaindolem (npa), jako je např. [Pt(npa)Me₂] (S. B. Zhao et al. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2007, 3092 až 3093), [Pt(*N,N*-L)R₂] komplexy, kde *N,N*-L představuje bis(7-azaindol-1-yl) chelatující ligand s alifatickým nebo aromatickým linkerem spojujícím obě jednotky a R je většinou methyl nebo fenyl (S. B. Zhao et al. *Dalton Trans.* 2008, 6953 až 6965, S. B. Zhao et al. *Organometallics*, 25, 2006, 5979 až 5989, S. B. Zhao et al. *Organometallics* 24, 2005, 3290 až 3296, D. Song, S. Wang, *Organometallics* 22, 2003, 2187 až 2189), obdobné komplexy, kde jsou v rámci *N,N*-L ligandů dva 7-azaindoly spojeny SiMe₃, SnMe₃ nebo SnPh₃ (S. B. Zhao et al. *Organometallics* 28, 2009, 2572 až 2582) a dvojjaderné Pt(II)-komplexy {např. [Pt₂(tpab)Me₄]} obsahující 1,2,4,5-tetrakis(5-(*p*-C₇H₁₅Ph)-7-azaindol-1-yl)benzen (tpab) (S. B. Zhao et al. *Organometallics* 29, 2010, 998 až 1003). [Pt(*N,N*-L)Cl] komplexy, kde *N,N*-L představuje bis(7-azaindol-1-yl) ligand s aromatickým linkerem (fenyl nebo 4-bromfenyl), jsou popsány v D. Song et al. *Organometallics* 20, 2001, 4683 až 4689). Dalšími publikovanými sloučeninami jsou [NBu₄][Pt(C₆F₅)₂Cl(Haza)] a [NBu₄]₂[Pt₂(μ-aza)₂(C₆F₅)₄] (J. M. Casas et al.

Inorg. Chem. 47, 2008, 8767 až 8775), nebo $[\text{NBu}_4] [\{\text{Pt}(\text{C}_6\text{F}_5)_3\}(\mu\text{-aza})\{\text{Ag}(\pi)\}]$, kde π = propanimin (J. M. Casas et al. *Organometallics* 21, 2002, 4560 až 4563). Deprotonizovaný 7-azaindol vystupuje jako můstkující ligand ve dvojjaderných komplexech publikovaných v práci S. W. Lai et al. *Organometallics* 18, 1999, 3991 až 3997 nebo J. A. Bailey et al. *Inorg. Chem.* 32, 1993, 369 až 370.

Z výsledků výše uvedených prací popisujících biologickou aktivitu komplexů platiny se 7-azaindolem je patrné, že koordinace organické molekuly nebo organických molekul, tj. Haza, na z hlediska biologické aktivity perspektivní motiv, jako je *cis*- $[\text{PtCl}_2]$ nebo $[\text{Pt}(\text{ox})]$, nemusí nutně vést ke vzniku komplexní sloučeniny vykazující výrazně biologické, např. protinádorové účinky. Pokud však dojde ke vhodné změně složení komplexu, jako je popsána substituce jedné molekuly Haza za NH_3 ve struktuře komplexu *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{Haza})(\text{NH}_3)]$, může tato vést k výraznému progresu biologických vlastností výsledného komplexu, v konkrétním případě zmíněné sloučeniny se jedná o *in vitro* cytotoxicitu. Úkolem předkládaného vynálezu je představit platnaté komplexy s halogeno-deriváty 7-azaindolu, u nichž modifikace molekuly 7-azaindolu vhodnou substitucí atomu vodíku za halogen výrazně modifikuje *in vitro* protinádorové vlastnosti výsledných komplexů platiny. Připravené sloučeniny pak stojí *in vitro* cytotoxicitou výrazně převyšují v současnosti klinicky používaná léčiva na bázi platiny, jako jsou *cisplatin*, *karboplatina* nebo *oxaliplatin*. Popsané komplexy tedy mohou představovat perspektivní protinádorová léčiva, která vznikla kombinací biologicky, v konkrétním případě pak protinádorově, neaktivních komponent.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou dichlorido komplexy platiny v oxidačním stupni +II a jejich krystalosolváty zahrnující strukturní motiv I obecného vzorce II nebo III a vyjádřené strukturními vzorci *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{L})_2]$ II' nebo *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{L})(\text{L}')] \text{ II}'$, kde symboly L a L' představují halogenderivát 7-azaindolu obecného vzorce IV vázaného na atom platiny přes libovolný atom dusíku nezávisle vybraný z atomů N1 nebo N7, kde jsou substituenty R3, R4 a R5 vybrány ze skupiny: chlor, brom nebo jod.



Další podstatou vynálezu jsou krystalosolváty platnatých dichlorido komplexů, kde u sloučenin obecného složení *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{L})_2] \cdot x\text{Solv}$ nebo *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{L})(\text{L}')] \cdot x\text{Solv}$ udává x počet krystalových molekul 1 až 6 a Solv je konkrétní molekula použitého rozpouštědla a/nebo některá z reakčních komponent vybraných 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.

Také je podstatou vynálezu z působ přípravy platnatých dichlorido komplexů dle něhož se sloučenina obecného vzorce II nebo III připraví reakcí alkalického tetrachloridoplatnatu nebo odpovídající kyseliny obecného složení $\text{M}_3[\text{PtCl}_4]$, kde M zahrnuje především H, K a Na, s halogenderivátem 7-azaindolu.

Ve výhodném provedení se sloučenina obecného vzorce II nebo III připraví tak, že nejdříve spolu reagují dva molární ekvivalenty halogenderivátu 7-azaindolu rozpuštěného při teplotě 20 až 70 °C v minimálním množství rozpouštědla ze skupiny primárních nebo sekundárních alkoholů

nebo acetonu, s jedním molárním ekvivalentem sloučeniny $M_2[PtCl_4]$, kde M představuje H, K nebo Na, rozpuštěné v minimálním množství horké vody o teplotě 20 až 90 °C, poté se reakční směs míchá po dobu dvou až čtyř dnů při teplotě 40 až 70 °C, a následně je vzniklý produkt odfiltrován, promyt horkými použitými rozpouštědly a vysušen.

Nedílnou podstatou vynálezu je farmakologický prostředek obsahující terapeuticky účinné množství platnatých dichlorido komplexů, anebo farmaceutickou kompozici platnatých dichlorido komplexů s jedním či více přijatelných nosičů a pomocných látek.

Konečně je podstatou vynálezu použití dichlorido komplexů platiny pro výrobu léčiv pro léčbu nádorových onemocnění.

Přehled obrázků na výkresech

Konkrétní příklady provedení vynálezu jsou doloženy připojenými výkresy, kde:

- obr. 1 je IR spektrum (oblast 400 až 4000 cm^{-1} provedena technikou ATR) *cis*- $[PtCl_2(L_3)_2] \cdot 0,75EtOH$ komplexu,
- obr. 2 je molekulová struktura komplexu *cis*- $[PtCl_2(L_6)_2] \cdot DMF$ vyřešená užitím monokrystalové rentgenové strukturní analýzy, molekula DMF není pro přehlednost zobrazena a
- obr. 3 je znázornění průběhu termického rozkladu komplexu *cis*- $[PtCl_2(L_3)_2] \cdot 0,75EtOH$ metodami termogravimetrie (TG) a diferenční termické analýzy (DTA)

Příklady provedení vynálezu

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

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

- * elementární analýza (Flash 2000 CHNS, Thermo Scientific);
- * infračervená spektroskopie, kde byly oblasti 150 až 600 cm^{-1} (far-IR) a 400 až 4000 cm^{-1} (mid-IR) provedeny technikou ATR (Nexus 670 FT-IR, Thermo Nicolet);
- * nukleární magnetická rezonance (NMR) DMF- d_7 roztoků komplexů – 1H , ^{13}C , ^{195}Pt , 1H - 1H gs-COSY, 1H - ^{13}C gs-HMQC, 1H - ^{13}C gs-HMBC a 1H - ^{15}N gs-HMBC experimenty (400 MHz NMR spectrometer, Varian);
- * termická analýza s metodami termogravimetrie (TG) a diferenční termické analýzy (DTA) (Exstar TG/DTA 6200 thermal analyzer (Seiko Instruments);
- * monokrystalová rentgenová strukturní analýza (XcaliburTM2 difraktometr, Sapphire2 CCD detektor, Mo K α monochromátor, Oxford Diffraction).

Příklad 1: Syntéza a charakterizace *cis*-{dichlorido-bis(3-chlor-7-azaindol)-platnatého komplexu, *cis*- $[PtCl_2(L_2)_2]$:

0,5 mmol K_2PtCl_4 bylo za laboratorní teploty rozpuštěno v minimálním objemu destilované vody a přilito ke dvěma molárním ekvivalentům (1 mmol) 3-chlor-7-azaindolu (L_2) rozpuštěného také za laboratorní teploty v minimálním objemu ethanolu podle obecného schématu 1.

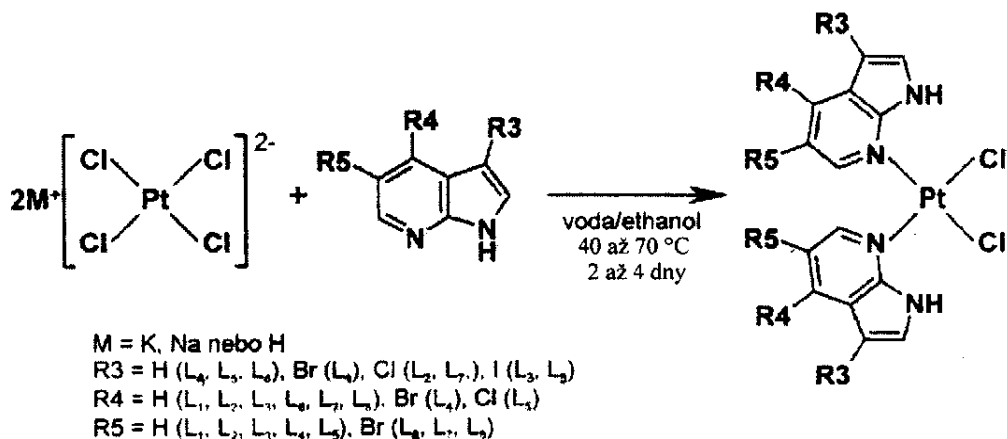
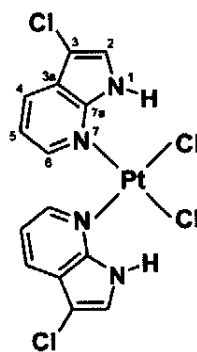


Schéma 1

- 5 Reakční směs byla míchána pod zpětným chladičem po dobu tří dnů při teplotě 50 °C. Světle béžový produkt, *cis*-[PtCl₂(L₂)₂], se znázorněním včetně číslování atomů podle vzorce 1, který se v průběhu reakce vytvořil, byl odfiltrován, vícenásobně promyt destilovanou vodou, ethanolem a diethyletherem a následně vysušen v exsikátoru nad P₄O₁₀.



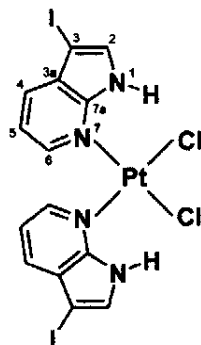
Vzorec (1)

- 10 Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro C₁₄H₁₀N₄Cl₄Pt: C, 29,44(29,02); H, 1,76(1,65); N, 9,81(9,33)%. *far*-IV ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 347, 351, 448, 473, 488, 555, 568. *mid*-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 439, 467, 485, 529, 594, 641, 664, 752, 797, 845, 897, 929, 1016, 1095, 1130, 1203, 1237, 1278, 1320, 1337, 1411, 1445, 1491, 1518, 1549, 1595, 3077, 3100, 3156, 3273, 3310. ¹H NMR (DMF-*d*₇, SiMe₄, ppm): δ 13,51 (bs, N1H, 1H), 9,02 (d, 5,6, C6H, 1H), 8,07 (d, 6,5, C4H, 1H), 8,05 (s, C2H, H1), 7,29 (m, C5H, 1H). ¹³C NMR (DMF-*d*₇, SiMe₄, ppm): δ 146,82 (C6), 146,00 (C7a), 129,17 (C4), 125,17 (C2), 120,95 (C3a), 117,50 (C5), 104,24 (C3). ¹⁵N NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ 140,9 (N1), 173,4 (N7). ¹⁹⁵Pt NMR (DMF-*d*₇, K₂PtCl₄, ppm): -2126,2.

- 20 **Příklad 2: Syntéza a charakterizace *cis*-{dichlorido-bis(3-jod-7-azaindol)-platnatého komplexu, *cis*-[PtCl₂(L₃)₂]·0,75EtOH**

- 25 0,5 mmol K₂PtCl₄ bylo za laboratorní teploty rozpuštěno v minimálním objemu destilované vody a přilito ke dvěma molárním ekvivalentům (1 mmol) 3-jod-7-azaindolu (L₃) rozpuštěného taktéž za laboratorní teploty v minimálním objemu ethanolu podle obecného schématu 1. Reakční směs byla míchána pod zpětným chladičem po dobu tří dnů při teplotě 50 °C. Světle béžový produkt, *cis*-[PtCl₂(L₃)₂]·0,75EtOH, se znázorněním včetně číslování atomů podle vzorce 2, který se v

průběhu reakce vytvořil, byl odfiltrován, vícenásobně promyt destilovanou vodou, ethanolem a diethyletherem a následně vysušen v exsikátoru nad P_4O_{10} .



Vzorec (2)

5

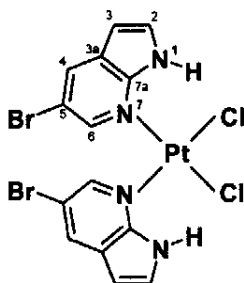
Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro $C_{14}H_{10}N_4Cl_2I_2Pt \cdot 0,75EtOH$: C, 23,61(23,32); H, 1,85(1,68); N, 7,10(6,73)%. far-IV (ν_{ATR}/cm^{-1}): 331, 339, 434, 471, 480, 492, 504, 519, 564, 592. mid-IR (ν_{ATR}/cm^{-1}): 504, 518, 562, 594, 641, 750, 793, 823, 869, 899, 929, 980, 1037, 1068, 1097, 1127, 1194, 1271, 1335, 1405, 1438, 1502, 1594, 2889, 2917, 2983, 3094, 3131, 3165, 3419. 1H NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 13,59 (bs, N1H, 1H), 8,98 (dd, 5,7, 1,1, C6H, 1H), 8,09 (d, 2,6, C2H, 1H), 7,82 (d, 7,6, C4H, 1H), 7,28 (m, C5H, 1H). ^{13}C NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 147,35 (C7a), 146,50 (C6), 132,51 (C2), 131,57 (C4), 125,66 (C3a), 117,84 (C5), 55,58 (C3). ^{15}N NMR (DMF- d_7 , ppm): δ 149,8 (N1), 173,6 (N7). ^{195}Pt NMR (DMF- d_7 , K_2PtCl_4 , ppm): -2121,6.

15

Příklad 3: Syntéza a charakterizace cis-{dichlorido-bis(5-brom-7-azaindol)-platnatého komplexu, $cis-[PtCl_2(L_6)_2]$

0,5 mmol K_2PtCl_4 bylo za laboratorní teploty rozpuštěno v minimálním objemu destilované vody a přilito ke dvěma molárním ekvivalentům (1 mmol) 5-brom-7-azaindolu (L_6) rozpuštěného taktéž za laboratorní teploty v minimálním objemu ethanolu podle obecného schématu 1. Reakční směs byla míchána pod zpětným chladičem po dobu tří dnů při teplotě 50 °C. Světle béžový produkt, $cis-[PtCl_2(L_6)_2]$, se znázorněním včetně číslování atomů podle vzorce 3, který se v průběhu reakce vytvořil, byl odfiltrován, vícenásobně promyt destilovanou vodou, ethanolem a diethyletherem a následně vysušen v exsikátoru nad P_4O_{10} .

25



Vzorec (3)

Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro $C_{14}H_{10}N_4Cl_2Br_2Pt$: C, 25,48(25,83); H, 1,53(1,43); N, 8,49(8,27)%. far-IV (ν_{ATR}/cm^{-1}): 334, 344, 468, 490, 529, 548, 555, 580. mid-IR (ν_{ATR}/cm^{-1}): 469, 494, 530, 551, 580, 624, 702, 722, 779, 808, 880, 912, 944, 1058, 1091, 1194, 1282, 1340, 1422, 1470, 1506, 1580, 3061, 3108,

30

3143, 3297, 3359, 3381. ^1H NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 13,47 (bs, N1H, 1H), 9,25 (d, 1,7, C6H, 1H), 8,31 (d, 1,6, C4H, 1H), 7,91 (t, 3,0, C2H, 1H), 6,65 (m, C3H, 1H). ^{13}C NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 146,84 (C7a), 145,19 (C6), 133,66 (C4), 129,74 (C2), 124,74 (C3a), 110,17 (C5), 101,94 (C3). ^{15}N NMR (DMF- d_7 , ppm): δ 143,5 (N1), 174,9 (N7). ^{195}Pt NMR (DMF- d_7 , K $_2$ PtCl $_4$, ppm): -2112,4.

Příklad 4: *In vitro* cytotoxická aktivita nových látek na lidských nádorových liniích

Pro stanovení cytotoxické aktivity připravených komplexů byla použita mikrotitrační analýza využívající 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT). Testem jsou detekovány životaschopné buňky, přičemž jejich počtu odpovídá množství zredukovaného MTT. *In vitro* testy cytotoxické aktivity byly provedeny na následujících lidských nádorových buněčných liniích: prsní adenokarcinom (MCF7) a osteosarkom (HOS). Linie byly udržovány v plastických lahvích v DMEM médiu (5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu, 10 % fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný) pro buněčné kultury. Suspenze buněk (*ca* $1,25 \times 10^5$ buněk ml^{-1}) byly rozpipetovány při 37 °C v CO $_2$ atmosféře po dobu 24 hodin. Testované platnaté dichlorido komplexy a *cisplatin*a byly předrozpuštěny v *N,N'*-dimethylformamidu, 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 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 h při teplotě 37 °C, 100% vlhkosti a v atmosféře CO $_2$. Poté byl přidán roztok MTT a následovala inkubace po dobu 1 hodiny. MTT analýza byla provedena spektrofotometricky (TECAN, Schoeller Instruments LLC) při 540 nm.

Inhibiční koncentrace testovaných komplexů IC $_{50}$ (μM), odpovídající koncentraci testovaných látek potřebné k inhibici růstu 50% vložených nádorových buněk, byly vypočteny z dávkových křivek a jsou uvedeny v Tabulce 1 a graficky znázorněny na obr. 4.

Tabulka 1. Výsledky (tabelizované hodnoty a grafické znázornění) *in vitro* cytotoxicity připravených platnatých dichlorido komplexů s halogenderiváty 7-azaindolu vyjádřené v hodnotách inhibiční koncentrace IC $_{50}$ (μM) a jejich porovnání s *cisplatinou*

Komplex	MCF7	HOS
<i>cis</i> -[PtCl $_2$ (L $_2$) $_2$] (I)	3,4 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,1
<i>cis</i> -[PtCl $_2$ (L $_3$) $_2$]-0,75EtOH (II)	2,0 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,1
<i>cis</i> -[PtCl $_2$ (L $_6$) $_2$] (III)	8,0 $\pm$ 0,9	3,9 $\pm$ 0,2
<i>Cisplatin</i> a (IV)	19,6 $\pm$ 4,3	34,2 $\pm$ 6,4

L $_2$ = 3-chlor-7-azaindol

L $_3$ = 3-jod-7-azaindol

L $_6$ = 5-brom-7-azaindol

MCF7 = lidský prsní adenokarcinom

HOS = lidský osteosarkom

Příklad 5: Příklady substituentů R3, R4 a R5 vybrány ze skupiny: chlor, brom nebo jod

Přehled možných příkladů substituentů R3, R4 a R5 je pak uveden v tabulce 2:

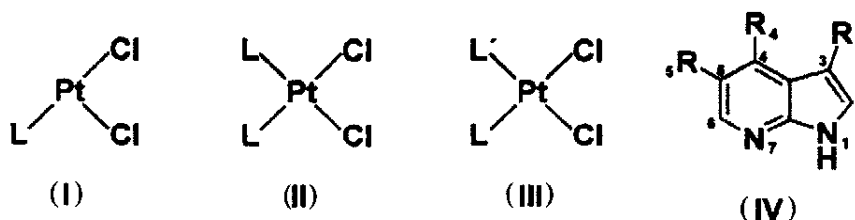
5

Halogenderivát 7-azaindolu	R3	R4	R5
3-bromo-7-azaindol (L ₁)	Br	H	H
3-chloro-7-azaindol (L ₂)	Cl	H	H
3-jodo-7-azaindol (L ₃)	I	H	H
4-bromo-7-azaindol (L ₄)	H	Br	H
4-chloro-7-azaindol (L ₅)	H	Cl	H
5-bromo-7-azaindol (L ₆)	H	H	Br
5-bromo-3-chloro-7-azaindol (L ₇)	Cl	H	Br
5-bromo-3-jodo-7-azaindol (L ₈)	I	H	Br

10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Dichlorido komplexy platiny v oxidačním stupni +II a jejich krystalosolváty zahrnující
 15 strukturní motiv I obecného vzorce II nebo III a vyjádřené strukturními vzorci *cis*-[PtCl₂(L)₂] II' nebo *cis*-[PtCl₂(L)(L')] III', kde symboly L a L' představují halogenderivát 7-azaindolu obecného vzorce IV vázaného na atom platiny přes libovolný atom dusíku nezávisle vybraný z atomů N1 nebo N7, kde jsou substituenty R3, R4 a R5 vybrány ze skupiny: chlor, brom nebo jod



20

2. Krystalosolváty platnatých dichlorido komplexů podle nároku 1, kde u sloučenin obecného
 složení *cis*-[PtCl₂(L)₂].xSolv nebo *cis*-[PtCl₂(L)(L')].xSolv udává x počet krystalových molekul 1
 až 6 a Solv je konkrétní molekula použitého rozpouštědla a/nebo některá z reakčních komponent
 25 vybraných ze skupiny voda, primární alkohol, sekundární alkohol, aceton, N,N'-dimethylform-
 amid, dimethyl sulfoxid, chloroform, dichlormethan, acetonitril nebo diethylether, a to buď
 samostatně, nebo v kombinaci uvedených solvátových molekul.

3. Způsob přípravy platnatých dichlorido komplexů podle nároku 1, **vyznačující se**
 30 **tím**, že se sloučenina obecného vzorce II nebo III připraví reakcí alkalického tetrachlorido-
 platnatanu nebo odpovídající kyseliny obecného složení M₂[PtCl₄], kde M zahrnuje především H,
 K a Na, s halogenderivátem 7-azaindolu.

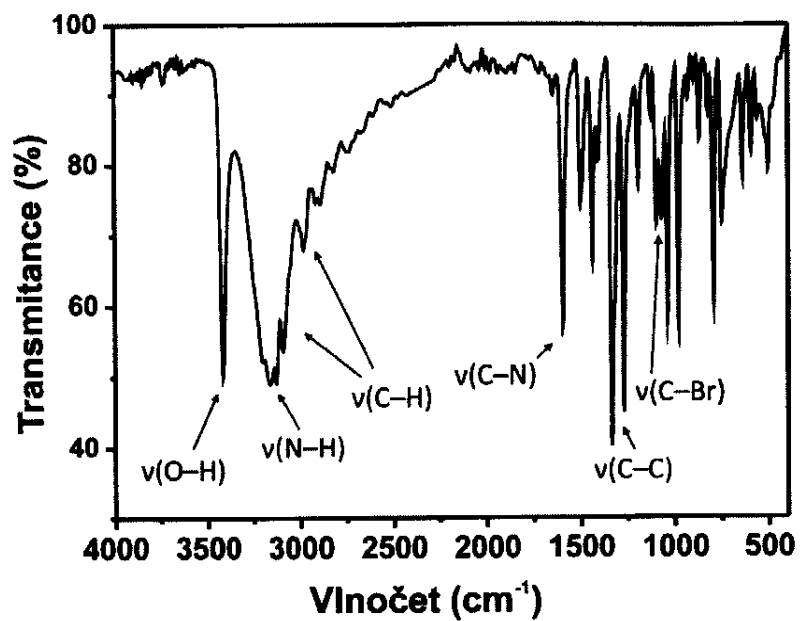
4. Způsob přípravy podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se sloučenina obecného
 35 vzorce II nebo III připraví tak, že nejdříve spolu reagují dva molární ekvivalenty halogenderivátu

7-azaindolu rozpuštěného při teplotě 20 až 70 °C v minimálním množství rozpouštědla ze skupiny primárních nebo sekundárních alkoholů nebo acetonu, s jedním molárním ekvivalentem sloučeniny $M_2[PtCl_4]$, kde M představuje H, K nebo Na, rozpuštěné v minimálním množství horké vody o teplotě 20 až 90 °C, poté se reakční směs míchá po dobu dvou až čtyř dnů při teplotě 40 až 70 °C, a následně je vzniklý produkt odfiltrován, promyt horkými použitými rozpouštědly a vysušen.

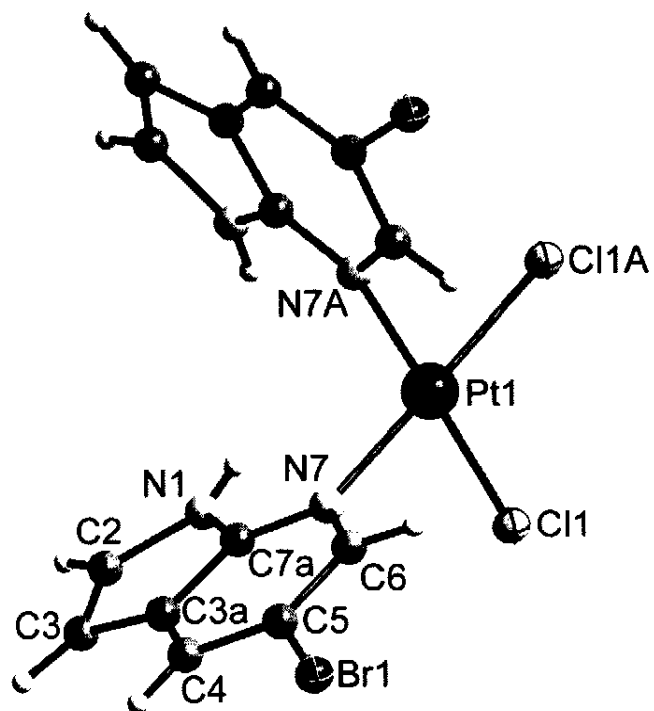
5. Farmakologický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje terapeuticky účinné množství platnatých dichlorido komplexů podle nároku 1 a nebo farmaceutickou kompozici platnatých dichlorido komplexů podle nároku 1 s jedním či více přijatelných nosičů a pomocných látek.

6. Použití dichlorido komplexů platiny podle nároku 1 pro výrobu léčiv pro léčbu nádorových onemocnění.

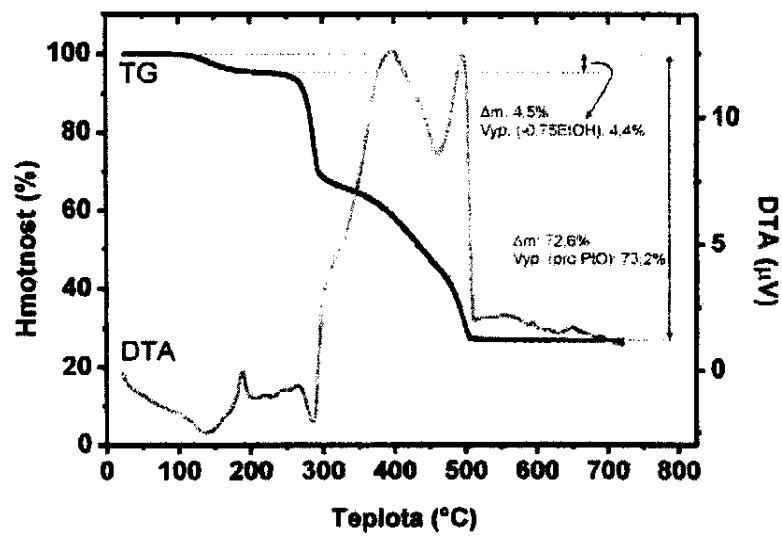
2 výkresy



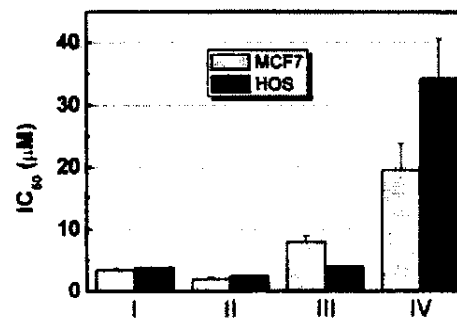
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

Konec dokumentu
