

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2013-436

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07F 15/02 (2006.01)

A61K 31/295 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.06.2013**

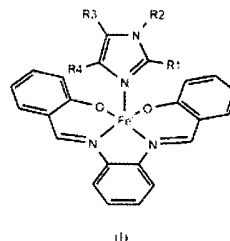
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.12.2014**

(Věstník č. 51/2014)

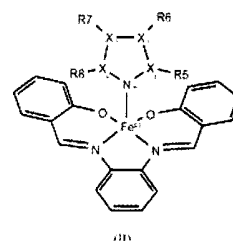
(71) Přihlašovatel:
Univerzita Palackého, Olomouc, CZ

(72) Původce:
prof. RNDr. Zdeněk Trávníček, Ph.D., Štěpánov, CZ
doc. RNDr. Zdeněk Šindelář, CSc., Lutín, CZ
prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Ph.D.DrSc.,
Olomouc, CZ

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



(I)



(II)

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Salophenové komplexy železa
s heterocyklickými N-donorovými ligandy,
způsob jejich přípravy a jejich použití jako
léčiv v protinádorové terapii**

(57) Anotace:

Komplexní sloučeniny železa v oxidačních stupních +II a +III se salophenem {2,2'-((1*E*,1'*E*)-(1,2-fenylbis(azanylyliden))bis(methanylyliden)difenolát(2-) ligand} a doplňkovými N-donorovými heterocyklickými ligandy a jejich krystalosolváty, vyjádřené strukturálními vzorci I a II, kde X₁-X₄ představuje libovolnou kombinaci *n* methanylylidenových skupin a (4-*n*) azanylylidenových skupin, kde *n* může nabývat hodnot 1 až 2, R₁-R₈ představuje atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, alkenyl, aryl, substituovaný aryl, hydroxy a amino skupinu. Způsob přípravy těchto sloučenin, farmakologický prostředek pro použití v lékařství a použití farmakologického prostředku jako léčiva pro léčbu nádorových onemocnění.

Salophenové komplexy železa s heterocyklickými N-donorovými ligandy, způsob jejich přípravy a jejich použití jako léčiv v protinádorové terapii

Oblast techniky

Předložený vynález se týká komplexů železa v oxidačních stupních +II nebo +III obecného vzorce $[\text{Fe}(\text{salophen})(\text{L})]$, kde salophen $\{2,2'-((1E,1'E)-(1,2\text{-fenylenbis(azanylyliden))bis(methanylyliden)) difenolát(2-)}\}$ vystupuje jako „nosný“ chelátový ligand a L jsou doplňkové N-donorové heterocyklické ligandy, způsobu přípravy uvedených komplexů a jejich použití v lékařské praxi jako léčiv nádorových onemocnění nebo součástí farmaceutických kompozic pro prevenci nebo léčbu nádorových onemocnění, které tyto komplexy obsahují jako účinnou látku.

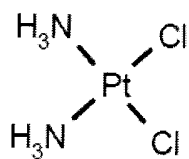
Dosavadní stav techniky

Nádorová onemocnění jsou dlouhodobě ve zdravotnických statistikách World Health Organization (WHO) na druhém místě v morbiditě i mortalitě zejména v rozvinutějších krajinách. Proto je silným společenským imperativem hledání nových, účinnějších a bezpečnějších sloučenin pro použití v terapeutické praxi těchto nemocí.

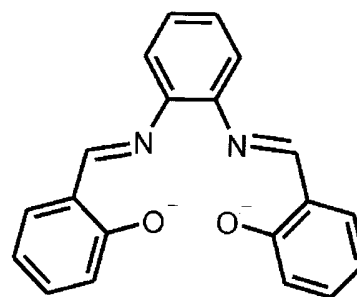
Je obecně přijímaným poznatkem, že regulace hladin železa v cílových tkáních hraje významnou roli při metabolické regulaci růstu nádorových tkání (Zhou, T. et al. *Dalton Trans.* 41, 2012, 6371-6389; Visca, P. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2013, 2432-2433). Dále bylo zjištěno, že chelatační činidla vázající nechelatované železo do stabilních komplexních sloučenin působí antiangiogenně (Terman, A. and Kurz, T. *Antioxid. Redox. Signal.* 18, 2013, 888–898), přičemž některé nízkomolekulové látky na bázi komplexů železa v oxidačních stupních +II nebo +III s ligandy odvozenými od Schiffovýchází působí jiným mechanismem, založeným na interakci s DNA a dalšími významnými biomolekulami a tak působí jako vysoce účinné protinádorové látky *in vitro* (Herchel, R. et al. *Dalton Trans.* 44, 2009, 9870–9880).

Nízkomolekulové komplexy železa v oxidačních stupních +II nebo +III s vhodnými ligandy proto tvoří viabilní alternativu k již používaným komplexním sloučeninám platiny, k jejichž stále ještě celosvětově nejhojněji používaným zástupcům patří např. *cis*-diamindichlorido-platnatý komplex (*cisplatin*) obecného vzorce (viz Schéma A), postrádají ale nedostatky v podobě rezistence na působení derivátů *cisplatin* a některé nežádoucí účinky spojené s terapeutickým používáním derivátů *cisplatin*, např. nevolnost, nefrotoxicita, ototoxicita a podobně.

V uplynulých letech bylo zjištěno, že aqua-, chlorido- a acetáto-komplexy s nosnými chelátovými ligandy typu Schiffových bází, zejména pak salophenu (viz Schéma B)



(A)



(B)

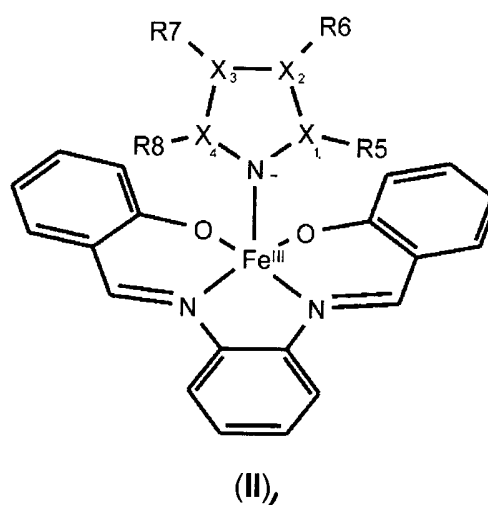
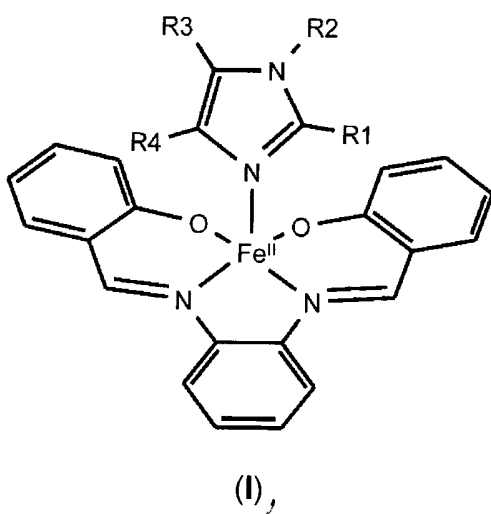
a jeho methoxy-, hydroxy-, C1-C4-alkyl-, C1-C4-alkoxy- a trihalomethyl-derivátů s centrálními atomy železa v oxidačních stupních +II nebo +III vykazují vysokou protinádorovou aktivitu *in vitro* a *in vivo* (WO 2008/090081 A1; EP 1949899 A1; US 2009326061 A1; Hille, A. et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* 14, 2009, 711–725; Hille, A. et al. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 11, 2011, 217–223; Lange, T.S. et al. *Plos ONE* 3, 2008, e2303; Lange, T.S. et al. *Drug Des. Dev. Ther.* 3, 2009, 17–26) , která je až 50krát vyšší jako aktivita *cisplatin* za srovnatelných experimentálních podmínek (Hille, A. et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* 14, 2009, 711–725) a byly popsány mechanismy, kterými tyto látky působí na různé linie lidských nádorových buněk i mechanismy, kterými tyto látky překonávají rezistenci proti léčivům odvozeným od *cisplatin* (Kim, K.K. et al. *Plos ONE* 6, 2011, e19049; Azani, M.R. et al. *Russ. J. Phys. Chem. A* 84, 2010, 2284–2289; Ansari, K.I. et al. *J. Biomol. Screen.* 16, 2011, 26–35; Lee, S.Y et al. *Leuk. Res.* 35, 2011, 387–393).

Z patentových dokumentů (WO 2008/090081 A1; EP 1949899 A1; US 2009/326061 A1) a vědeckých prací (Ross, T.M. et al. *Dalton Trans.* 2003, 149–159; Leeuwenkamp, O.R. et al. *Polyhedron* 6, 1987, 295–302; Nishida, Y. et al. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1987, 1157–1161; Choudhury, H.K. and Medhi, O.K. *Indian J. Chem. Sect A-Inorg. Bio-Inorg. Phys. Theor. Anal. Chem.* 32A, 1993, 351–354; Hernandez-Molina, R. et al. *Inorg. Chem.* 37, 1998, 5102–5108; Jana, S. et al. *Polyhedron* 48, 2012, 189–198; Nichols, P.J. et al. *Inorg. Chem.* 27, 1988, 2795–2800; Nabei, A. et al. *Inorg. Chim. Acta* 361, 2008, 3489–3493; Herchel R. et al. *Dalton Trans.* 40, 2011, 11896–11903), popisujících přípravu a biologickou aktivitu komplexů s nosným chelátovým ligandem salophenem a jeho methoxy-, hydroxy-, C1-C4-alkyl-, C1-C4-alkoxy- a trihalomethyl-deriváty s centrálními atomy železa v oxidačních stupních +II nebo +III a doplňkovými O-, S-, N- nebo *halogeno*-ligandy nebo jejich kombinací je patrné, že i malá změna jejich struktury vede k dramatické změně účinnosti, což potvrzuje i práce Hille, A. and Gust, R. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 2010, 5486–5492 popisující vliv methoxy-substituce na nosném ligandu salophenu na intenzitu a selektivitu protinádorového účinku látek. Z výše uvedeného je tedy zřejmé, proč jsou v současnosti hledány nejen vhodné možnosti substituce základního salophenového skeletu, ale také hledány vhodné doplňkové N-donorové ligandy do koordinační sféry atomu železa, vedoucí ke vzniku komplexních sloučenin železa, u kterých by byla výrazně vyšší protinádorová aktivita, než je tomu u v současnosti využívaných léčiv na bázi komplexů platiny.

Z literární rešerše je potom zřejmé, že mezi dosud známými salophenovými komplexními sloučeninami železa v oxidačních stupních +II nebo +III zcela absentují komplexy se čtvercově-pyramidální geometrií, obsahující ve své koordinační sféře kromě salophenového derivátu také jeden doplňkový N-donorový heterocyklický ligand. Příprava, charakterizace a zjištění výrazných protinádorových účinků na úrovni *in vitro*, je potom předmětem předkládaného vynálezu.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou komplexní sloučeniny železa v oxidačních stupních +II a +III s jedním salophenovým ligandem {2,2'-((1*E*,1'*E*)-(1,2-fenylenebis(azanylyliden))-bis(methanylyliden))di-fenoláto(2-)} a jedním doplňkovým *N*-donorovým heterocyklickým ligandem a jejich krystalosolváty, vyjádřené strukturálními vzorci (I) a (II),



kde

X_1-X_4 představuje kombinaci n methanylylidenových skupin a $(4-n)$ azanylylidenových skupin, kde n může nabývat hodnot 1 až 2,

R_1-R_8 představuje atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, alkenyl, aryl a substituovaný aryl, hydroxy a amino skupinu, kde termín:

– *alkyl*

jako takový nebo jako součást jiné skupiny představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 4, především pak z 1 až 2, atomů uhlíku,

– *alkenyl*

jako takový nebo jako součást jiné skupiny představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 4 atomů uhlíku obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku, zejména pak vinyl a allyl,

– *aryl*

jako takový nebo jako součást jiné skupiny představuje skupinu obsahující alespoň jeden aromatický kruh,

– *substituovaný alkyl a aryl*

jako takové nebo jako součásti jiných skupin představují alkyl a aryl substituovaný ve kterékoli pozici substituenty z množiny alkyl, alkenyl a aryl, nebo anelované s arylem.

Další podstatou vynálezu jsou krystalosolváty komplexů obecného složení $[\text{Fe}(\text{salophen})(\text{L})] \cdot x\text{Sol}/v$, kde $x=1$ až 6 a Sol/v představuje molekulu konkrétního rozpouštědla a/nebo jednu z reakčních komponent vybranou ze skupiny voda, primární alkohol, sekundární alkohol, aceton, N,N' -dimethylformamid, dimethylsulfoxid, chloroform, dichlormethan, acetonitril, nitrobenzen, nebo diethylether, a to buď samostatně nebo v kombinaci uvedených solvátových molekul.

Také je podstatou vynálezu způsob přípravy sloučenin strukturních vzorců ~~(I)~~ a ~~(II)~~, a to reakcí μ -oxo-bis(2,2'-((1*E*,1'*E*)-(1,2-fenylenbis(azanylyliden))bis(methanylyliden)) difenolátoželezitého) komplexu $[(\text{salophen})\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}(\text{salophen})]$ buď přímo s heterocyklickými sloučeninami obsahujícími dusík, nebo nepřímo z východiskové látky azido-(2,2'-((1*E*,1'*E*)-(1,2-fenylenbis(azanylyliden))bis(methanylyliden))difenolátožele-zitého) komplexu $[\text{Fe}(\text{salophen})(\text{N}_3)]$ a vhodného adiční činidla, které vytvoří vhodný heterocyklický ligand *in situ*.

Ve výhodném provedení se sloučenina obecného vzorce ~~(I)~~ připraví tak, že k jednomu molárnímu ekvivalentu komplexu $[(\text{salophen})\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}(\text{salophen})]$ rozpuštěného v minimálním množství *n*-butanolu se přidá čtyřicetinásobný nadbytek příslušného derivátu imidazolu, poté se vytvořená směs přivede k varu a z reakční soustavy se oddestilují asi 2/3 původního objemu rozpouštědla, načež se ochlazením směsi na 40°C vyloučí v *n*-butanolu téměř nerozpustný produkt, který se oddělí filtrací za sníženého tlaku.

Ve výhodném provedení se sloučenina obecného vzorce (II) připraví tak, že k jednomu molárnímu ekvivalentu komplexu $[(\text{salophen})\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}(\text{salophen})]$ rozpuštěného v minimálním množství *n*-butanolu se přidá třicetinásobný nadbytek příslušného derivátu triazolu nebo tetrazolu, poté se vytvořená směs přivede k varu a

z reakční soustavy se oddestilují asi 3/5 původního objemu rozpouštědla, načež se ochlazením směsi na laboratorní teplotu vyloučí v n-butanolu téměř nerozpustný produkt, který se oddělí filtrací za sníženého tlaku.

Ve výhodném provedení se sloučenina obecného vzorce Fe^{II} s doplňkovým ligandem 5-methyl-tetrazol-1-idem(1-) připraví tak, že jeden molární ekvivalent komplexu $[\text{Fe}(\text{salophen})(\text{N}_3)]$ se rozpustí v 3000násobném molárním nadbytku acetonitrilu a refluxuje se 30 hodin, poté se ochlazením reakční směsi na laboratorní teplotu se vyloučí produkt (5-methyltetrazol-1-ido)-2,2'-((1E,1'E)-(1,2-fenylenebis(azanylyliden))bis(methanylyliden))difenoláto(2-)-železitý komplex, který se oddělí filtrací za sníženého tlaku.

Nedílnou součástí podstaty vynálezu je také použití komplexů v lékařské praxi jako léčiv nádorových onemocnění nebo součástí farmaceutických kompozic, s jedním či více přijatelnými nosiči a pomocnými látkami pro prevenci nebo léčbu nádorových onemocnění, které tyto komplexy obsahují jako účinnou látku.

Přehled obrázků na připojených výkresech

Konkrétní příklady provedení vynálezu jsou doloženy připojenými výkresy, kde

- obr. 1 je molekulová struktura komplexu $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})(\text{imz})]$ vyřešená užitím monokrystalové rentgenové strukturní analýzy

- obr. 2 je znázornění spektra komplexu $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})(\text{imz})]$ měřeného v střední infračervené oblasti ($4000-400 \text{ cm}^{-1}$) v KBr tabletě, identifikující všechny specifické vibrace vazeb a skupin odpovídající určenému složení komplexu $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})(\text{imz})]$

- obr. 3 je znázornění měření teplotní závislosti efektivního magnetického momentu komplexu $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})(\text{imz})]$ na teplotě, potvrzující přítomnost centrálního iontu železa v oxidačním stupni +II

- obr. 4 je znázornění Mössbauerova spektra komplexu $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})(\text{imz})]$ při teplotě 300 K, přičemž hodnoty izomerního posunu $\delta = 0,851(3) \text{ mm/s}$ a kvadrupólového štěpení $E_Q = 2,085(5) \text{ mm/s}$ potvrzují přítomnost centrálního iontu železa v oxidačním stupni +II ve spinovém stavu $S=2$

- obr. 5 je znázornění Mössbauerova spektra komplexu $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})(\text{triz})]$ při teplotě 300 K, přičemž hodnoty izomerního posunu $\delta = 0,3905(17)$ mm/s a kvadrupólového štěpení $E_Q = 1,2375(34)$ mm/s potvrzují přítomnost centrálního iontu železa v oxidačním stupni +III ve spinovém stavu $S=5/2$

Příklady provedení vynálezu

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

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

- elementární analýza s procentovým zastoupením prvků C, H a N (Thermo Scientific Flash 2000)
- infračervená spektroskopie v oblasti 400 až 4000 cm^{-1} byla provedena technikou KBr tablet (FT-IR spektrometr Perkin-Elmer Spectrum One B)
- monokrystalová rentgenová strukturní analýza (Xcalibur2, Oxford Diffraction Ltd.)
- teplotní závislost magnetizace (5-300 K) a efektivní magnetický moment při teplotě 300 K (SQUID magnetometr model XL-7 od firmy Quantum Design)
- Mössbauerova spektra byla měřena na přístroji s $^{57}\text{Co}(\text{Rh})$ zdrojem při teplotě 300 K. Hodnoty isomerního posunu byly kalibrovány vůči hodnotám kovového $\alpha\text{-Fe}$.

Vynález využívá $\mu\text{-oxo-bis}(2,2'\text{-}((1E,1'E)\text{-}(1,2\text{-fenylenbis(azanylyliden))bis(methanylyliden))difenolátoželezitý})$ komplex, $[(\text{salophen})\text{Fe-O-Fe}(\text{salophen})]$, nebo azido- $(2,2'\text{-}((1E,1'E)\text{-}(1,2\text{-fenylenbis(azanylyliden))bis(methanylyliden))difenolátoželezitý})$ komplex, $[\text{Fe}(\text{salophen})(\text{N}_3)]$, jako výchozí látky pro přípravu sloučenin uvedených v patentových nárocích. Uvedené výchozí sloučeniny nejsou komerčně dostupné, nicméně lze je připravit dosud publikovanými postupy (Mitchell, P.C.H. and Parker D.A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1976, 1821-1824; Jana, S. et al. *Polyhedron* 48, 2012, 189–198).

Příklad 1: Syntéza [(imidazol- κ N3)-(2,2'-((1*E*,1'*E*)-(1,2-fenylenbis(azanylyliden))-bis(methanylyliden))difenolato(2-)]železnatého] komplexu, dále jen Fe(salophen)(imz)]

Jeden molární ekvivalent komplexu [(salophen)Fe-O-Fe(salophen)] (0,1 g; 0,26 mmol) byl rozpuštěn v 30 ml n-butanolu a byl k němu přidán čtyřicetinasobný molární nadbytek imidazolu (0,54 g; 8 mmol). Vytvořená směs se přivedla k varu (asi 118^oC) a z reakční soustavy se oddestilovalo 15²⁰ ml původního objemu rozpouštědla. Ochlazením směsi na 40^oC se vyloučily krystaly v n-butanolu téměř nerozpustného produktu, který se oddělil od nadbytku imidazolu rozpuštěného v n-butanolu filtrací za sníženého tlaku. Výtěžek: 0,07 g, t.j. 66 % (počítáno na Fe).

Získané krystaly byly vhodné pro monokrystalovou rentgenovou strukturní analýzu. Molekulová struktura komplexu [Fe(salophen)(imz)] je znázorněna v obrázku 1.

Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro C₂₃H₁₇FeN₄O₂: C, 63,18 (63,13); H, 3,92 (4,1); N, 12,81 (12,84)%. UV-Vis (νNujol/cm⁻¹): 761, 560, 435. IR (νKBr/cm⁻¹): 3437, 3134, 3050, 2927, 2856, 1606, 1579, 1536, 1464, 1446, 1381, 1315, 1183, 1149, 1068, 922, 757, 658, 538. Záznam FT-IR spektra je předložen na obrázku 2. Magnetické vlastnosti: efektivní magnetický moment při laboratorní teplotě je μ_{eff}/B.M. = 5,1, což společně s výsledky měření teplotní závislosti μ_{eff} na teplotě (záznam předložen na obrázku 3) a Mössbauerova spektra (záznam předložen na obrázku 4) potvrzují přítomnost centrálního iontu železa v oxidačním stupni +II a spinovém stavu S=2.

Příklad 2: Syntéza sesquihydrátu [(1,2,4-triazol-1-ido)-(2,2'-((1*E*,1'*E*)-(1,2-fenylenbis(azanylyliden))-bis(methanylyliden))difenolato(2-)]železitého] komplexu, dále jen [Fe(salophen)(triz)]

Jeden molární ekvivalent komplexu [(salophen)Fe-O-Fe(salophen)] (0,1 g; 0,26 mmol) byl rozmíchán v 30 ml n-butanolu a byl k němu přidán čtyřicetinasobný molární nadbytek 1,2,4-triazolu (0,55 g; 8 mmol). Vytvořená směs se přivedla k varu (asi 118^oC) a z reakční soustavy se oddestilovalo asi 18 ml původního objemu rozpouštědla. Ochlazením směsi na 40^oC se vyloučily krystaly v n-butanolu téměř nerozpustného produktu, který se oddělil od nadbytku 1,2,4-triazolu rozpuštěného v n-butanolu filtrací za sníženého tlaku. Výtěžek: 0,08 g, t.j. 70 % (počítáno na Fe).

Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro $C_{22}H_{16}FeN_5O_2$: C, 60,29 (59,25); H, 3,68 (3,75); N, 15,98 (15,23)%. UV-Vis (ν Nujol/ cm^{-1}): 761, 560, 435. IR (ν KBr/ cm^{-1}): 3428, 1606, 1579, 1535, 1462, 1136, 1310, 1191, 1150, 607, 751, 537. Magnetické vlastnosti: efektivní magnetický moment při laboratorní teplotě je $\mu_{eff}/B.M. = 5,67$, což společně s výsledky měření Mössbauerova spektra (záznam předložen na obrázku 5) jednoznačně potvrzuje přítomnost centrálního iontu železa v oxidačním stupni +III a spinovém stavu $S=5/2$.

Příklad 3: Syntéza sesquihydrátu [(benzo[d][1,2,3]triazol-1-ido)-(2,2'-((1E,1'E)-(1,2-fenylenbis(azanylyliden))-bis(methanylyliden))difenolato(2-))železitého] komplexu, dále jen [Fe(salophen)(btriz)]

Jeden molární ekvivalent komplexu [(salophen)Fe-O-Fe(salophen)] (0,1 g; 0,26 mmol) byl rozmíchán v 30 ml n-butanolu a byl k němu přidán čtyřicetinasobný molární nadbytek benzo[d][1,2,3]triazolu (0,95 g; 8 mmol). Vytvořená směs se přivedla k varu (asi 118°C) a z reakční soustavy se oddestilovalo asi 18 ml původního objemu rozpouštědla. Ochlazením směsi na 40°C se vyloučily krystaly v n-butanolu téměř nerozpustného produktu, který se oddělil od nadbytku benzo[d][1,2,3]triazolu rozpuštěného v n-butanolu filtrací za sníženého tlaku. Výtěžek: 0,08 g, t.j. 63 % (počítáno na Fe).

Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro $C_{26}H_{23}FeN_5O_{3,5}$: C, 60,60 (60,29); H, 4,11 (3,68); N, 13,59 (15,67)%. UV-Vis (ν Nujol/ cm^{-1}): 650, 570, 420. IR (ν KBr/ cm^{-1}): 3047, 1606, 1579, 1534, 1489, 1461, 1444, 1381, 1321, 1190, 1150, 1126, 921, 809, 746, 610, 537. Magnetické vlastnosti: efektivní magnetický moment při laboratorní teplotě je $\mu_{eff}/B.M. = 4,78$, což společně s výsledky měření Mössbauerových spekter (záznam předložen na obrázku 6) naznačuje na přítomnost centrálního iontu železa v oxidačním stupni +III.

Příklad 4: Syntéza [(5-amino- $\hat{\text{t}}$ etrazol-1-ido)-(2,2'-((1*E*,1'*E*)-(1,2-fenylenebis(azanylyliden))bis(methanylyliden))difenolato(2-)]železitého] komplexu, dále jen [Fe(salophen)(atz)]

Jeden molární ekvivalent komplexu [(salophen)Fe-O-Fe(salophen)] (0,1 g; 0,26 mmol) byl rozmíchán v 30 ml n-butanolu a byl k němu přidán čtyřicetinásobný molární nadbytek 5-amino- $\hat{\text{t}}$ etrazolu (0,68 g; 8 mmol). Vytvořená směs se přivedla k varu (asi 118 $^{\circ}\text{C}$) a z reakční soustavy se oddestilovalo asi 18 ml původního objemu rozpouštědla. Ochlazením směsi na 40 $^{\circ}\text{C}$ se vyloučily krystaly v n-butanolu téměř nerozpustného produktu, který se oddělil od nadbytku 5-amino-tetrazolu rozpuštěného v n-butanolu filtrací za sníženého tlaku. Výtěžek: 0,08 g, t.j. 68 % (počítáno na Fe).

Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{FeN}_7\text{O}_2$: C, 55,53 (54,81); H, 3,55 (3,19); N, 21,58 (21,99)%. UV-Vis ($\nu\text{Nujol}/\text{cm}^{-1}$): 800, 640, 460. IR ($\nu\text{KBr}/\text{cm}^{-1}$): 1627, 1599, 1542, 1467, 1446, 1341, 1304, 1085, 760, 616, 419. Magnetické vlastnosti: efektivní magnetický moment při laboratorní teplotě je $\mu_{\text{eff}}/\text{B.M.} = 5,86$, což jednoznačně dokazuje přítomnost centrálního iontu železa v oxidačním stupni +III a spinovém stavu $S=5/2$.

Příklad 5: Syntéza [(5-fenyl- $\hat{\text{t}}$ etrazol-1-ido)-(2,2'-((1*E*,1'*E*)-(1,2-fenylenebis(azanylyliden))bis(methanylyliden))difenolato(2-)]železitého] komplexu, dále jen [Fe(salophen)(phtz)]

Jeden molární ekvivalent komplexu [(salophen)Fe-O-Fe(salophen)] (0,1 g; 0,26 mmol) byl rozmíchán v 30 ml n-butanolu a byl k němu přidán čtyřicetinásobný molární nadbytek 5-fenyl-tetrazolu (1,17 g; 8 mmol). Vytvořená směs se přivedla k varu (asi 118 $^{\circ}\text{C}$) a z reakční soustavy se oddestilovalo asi 18 ml původního objemu rozpouštědla. Ochlazením směsi na 40 $^{\circ}\text{C}$ se vyloučily krystaly v n-butanolu téměř nerozpustného produktu, který se oddělil od nadbytku 5-fenyl-tetrazolu rozpuštěného v n-butanolu filtrací za sníženého tlaku. Výtěžek: 0,09 g, t.j. 67 % (počítáno na Fe).

Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro $C_{27}H_{19}FeN_6O_2$: C, 62,93 (62,78); H, 3,72 (3,65); N, 16,31 (16,38)%. UV-Vis (ν_{Nujol}/cm^{-1}): 670, 450. IR (ν_{KBr}/cm^{-1}): 3064, 3016, 1605, 1579, 1539, 1463, 1437, 1382, 1313, 1192, 1146, 815, 742, 698, 623, 538. Magnetické vlastnosti: efektivní magnetický moment při laboratorní teplotě je $\mu_{eff}/B.M. = 6,0$, což jednoznačně dokazuje přítomnost centrálního iontu železa v oxidačním stupni +III a spinovém stavu $S=5/2$.

Příklad 6: Syntéza [(5-methyltetrazol-1-ido)-(2,2'-((1E,1'E)-(1,2-fenylbis(azanylyliden))bis(methanylyliden))difenolato(2-))železitého] komplexu, dále jen [Fe(salophen)(mtz)]

Jeden molární ekvivalent komplexu [Fe(salophen)(N₃)] (0,5 g, 1,37 mmol) byl rozpuštěn v 40 ml acetonitrilu a refluxován 30 hodin. Ochlazením reakční směsi na laboratorní teplotu se vyloučil produkt (5-methyltetrazol-1-ido)-(2,2'-((1E,1'E)-(1,2-fenylbis(azanylyliden))bis(methanylyliden))difenolato(2-))železitý komplex, který byl oddělen ze směsi filtrací za sníženého tlaku a vysušen v exsikátoru nad kusovým KOH. Výtěžek: 0,4 g, t.j. 72 % (počítáno na Fe).

Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro $C_{22}H_{17}FeN_6O_2$: C, 58,30 (57,90); H, 3,78 (3,81); N, 18,54 (18,20)%. IR (ν_{KBr}/cm^{-1}): 3436, 1606, 1578, 1534, 1461, 1445, 1380, 1316, 1189, 1149, 808, 751, 608, 508. Magnetické vlastnosti: efektivní magnetický moment při laboratorní teplotě je $\mu_{eff}/B.M. = 5,89$, což jednoznačně dokazuje přítomnost centrálního iontu železa v oxidačním stupni +III a spinovém stavu $S=5/2$.

Příklad 7: *In vitro* cytotoxická aktivita měďnatých komplexů na lidských nádorových liniích

Pro stanovení cytotoxické aktivity připravených komplexů byl použit MTT test. Metoda je založena na schopnosti metabolicky aktivních buněk redukovat žlutou sůl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) za vzniku modrého formazanového barviva. Jelikož k této přeměně dochází pouze v živých buňkách, lze

tímto způsobem stanovit cytotoxicitu různých chemických látek. V rámci buňky jsou za redukci zodpovědné mitochondriální dehydrogenasy. Vznikající formazanové barvivo je nerozpustné a je následně kvantifikováno po rozpuštění v DMSO s amoniakem za použití spektrofotometrie ve viditelné oblasti.

In vitro testy cytotoxické aktivity byly provedeny na sedmi lidských nádorových buněčných liniích: lidský osteosarkom (HOS), lidský prsní adenokarcinom (MCF-7), lidský epitelální adenokarcinom (A549), cervikální karcinom (HeLa), lidský ovariální karcinomu (A2780), lidský ovariální karcinom rezistentní na cisplatinu (A2780cis) a lidský maligní melanom (G-361). Linie byly udržovány v plastických lahvích v DMEM médiu (5 g/l glukosy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitanu sodného) pro buněčné kultury.

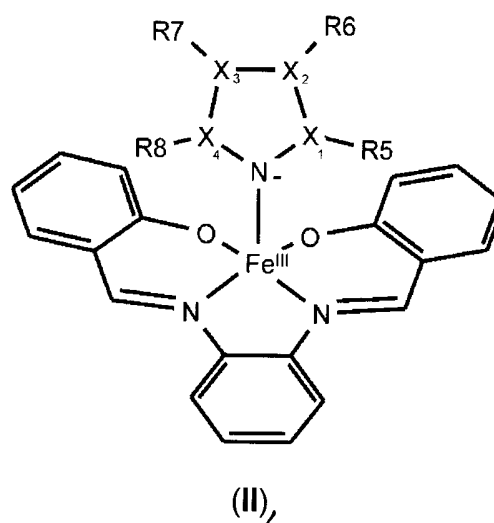
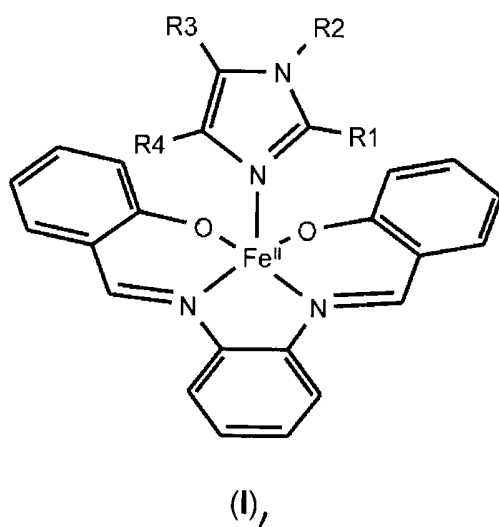
Suspenze buněk (cca $1,25 \times 10^5$ buněk v 1 ml) byly rozpipetovány po 80 µl na 96-jamkové plastové mikrotitrační destičky. Tyto byly preinkubovány při 37°C v atmosféře CO₂ po dobu 24 hodin. Testované komplexy železa a cisplatina jako terapeutický standard byly rozpuštěny v N,N'-dimetylformamidu a tyto sloužily jako zásobní roztoky. Pro vlastní experiment byly zásobní roztoky ředěny 1 000^x v kultivačním médiu (max. koncentrace 1,0 µM u komplexů železa a 50 µM u *cisplatiny*) a po odsátí kultivačního média byla směs přidána k nádorovým buňkám po inkubační dobu 24 hodin. MTT analýza byla prováděna spektrofotometricky (TECAN, Schoeller Instruments LLC) při vlnové délce 540 nm. Koncentrace testovaných komplexů (µM) toxická pro 50% nádorových buněk (inhibiční koncentrace IC₅₀) byla vypočtena z koncentračních křivek a jsou uvedeny v Tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1: IC₅₀ koncentrace *in vitro* testovaných komplexů (IC₅₀ a směrodatná odchylka ze tří nezávislých měření (S.D.), μM) toxická pro 50% lidských nádorových buněk (osteosarkom, HOS; prsní adenokarcinom, MCF-7; epiteliální adenokarcinom, A549; cervikální karcinom, HeLa; ovariální karcinom, A2780; ovariální karcinom rezistentní na cisplatinu, A2780cis a maligní melanom, G-361) ve srovnání s *cisplatinou*.

Komplex	Inhibiční koncentrace IC ₅₀ (S.D.) [μM]						
	HOS	MCF-7	A549	HeLa	A2780	A2780cis	G-361
[Fe(salophen)(imz)]	1,8(6)	0,70(8)	0,57(25)	0,67(13)	0,23(7)	0,35(3)	0,32(2)
[Fe(salophen)(triz)]	> 1	0,35(12)	> 1	0,43(9)	0,29(7)	0,32(4)	0,43(13)
[Fe(salophen)(btriz)]	1,8(4)	0,38(16)	1,9(7)	1,29(27)	0,352(5)	0,32(2)	0,42(10)
[Fe(salophen)(atz)]	> 1	0,64(27)	> 1	0,70(5)	0,31(13)	0,32(4)	0,34(11)
[Fe(salophen)(phtz)]	2,1(1)	0,70(26)	1,6(2)	0,74(25)	0,33(2)	0,35(4)	0,40(13)
[Fe(salophen)(mtz)]	> 1	0,38(11)	0,47(6)	0,50(11)	0,058(10)	0,30(2)	0,33(5)
<i>cisplatina</i>	34(6)	20(4)	> 50	40(5)	12(2)	30(6)	7(2)

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Komplexní sloučeniny železa v oxidačních stupních +II a +III se salophenem {2,2'-((1E,1'E)-(1,2-fenylenbis(azanylyliden))bis(methanylyliden))difenoláto(2-) ligand} a doplňkovými heterocyklickými N-donorovými ligandy a jejich krystalosolváty, vyjádřené strukturními vzorci (I) a (II),



kde

X_1-X_4 představuje kombinaci n methanylylidenových skupin a $(4-n)$ azanylylidenových skupin, kde n může nabývat hodnot 1 až 2,

R_1-R_8 představuje atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, alkenyl, aryl a substituovaný aryl, hydroxy a amino skupinu, kde termín:

– *alkyl*

jako takový nebo jako součást jiné skupiny představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 4, především pak z 1 až 2, atomů uhlíku,

– *alkenyl*

jako takový nebo jako součást jiné skupiny představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 4 atomů uhlíku obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku, zejména pak vinyl a allyl,

– *aryl*

jako takový nebo jako součást jiné skupiny představuje skupinu obsahující alespoň jeden aromatický kruh,

– *substituovaný alkyl a aryl*

jako takové nebo jako součásti jiných skupin představují alkyl a aryl substituovaný ve kterékoli pozici substituenty z množiny alkyl, alkenyl a aryl, nebo anelované s arylem.

2. Krystalosolváty komplexů podle nároku 1, kde u sloučenin obecného složení $[\text{Fe}(\text{salophen})(\text{L})] \cdot x\text{Sol}/v$, kde $x=1$ až 6 a Sol/v představuje molekulu konkrétního rozpouštědla a/nebo jednu z reakčních komponent vybranou ze skupiny voda, primární alkohol, sekundární alkohol, aceton, N,N' -dimethylformamid, dimethylsulfoxid, chloroform, dichlormethan, acetonitril, nitrobenzen, nebo diethylether, a to buď samostatně nebo v kombinaci uvedených solvátových molekul.
3. Způsob přípravy sloučenin dle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se sloučenina obecného vzorce (I) připraví tak, že k jednomu molárnímu ekvivalentu komplexu $[(\text{salophen})\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}(\text{salophen})]$ rozpuštěného v minimálním množství n -butanolu se přidá čtyřicetinasobný nadbytek příslušného derivátu imidazolu, poté se vytvořená směs přivede k varu a z reakční soustavy se oddestilují asi 2/3 původního objemu rozpouštědla, načež se ochlazením směsi na 40°C vyloučí v n -butanolu téměř nerozpustný produkt, který se oddělí filtrací za sníženého tlaku.
4. Způsob přípravy sloučenin dle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se sloučenina obecného vzorce (II) připraví tak, že k jednomu molárnímu ekvivalentu komplexu $[(\text{salophen})\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}(\text{salophen})]$ rozpuštěného v minimálním množství n -butanolu se přidá třicetinasobný nadbytek příslušného derivátu triazolu nebo tetrazolu, poté se vytvořená směs přivede k varu a z reakční soustavy se oddestilují asi 3/5 původního objemu rozpouštědla, načež se ochlazením směsi na laboratorní teplotu vyloučí v n -butanolu téměř nerozpustný produkt, který se oddělí filtrací za sníženého tlaku.
5. Způsob přípravy sloučenin dle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se sloučenina obecného vzorce (II) s doplňkovým ligandem 5-methyltetrazol-1-idem(1-) připraví tak, že jeden molární ekvivalent komplexu $[\text{Fe}(\text{salophen})(\text{N}_3)]$ se rozpustí v 3000-

násobném molárním nadbytku acetonitrilu a refluxuje se 30 hodin, poté se ochlazením reakční směsi na laboratorní teplotu vyloučí produkt (5-methyltetrazol-1-ido)-2,2'-((1E,1'E)-(1,2-fenylenebis(azanylyliden))bis(methanylyliden))difenoláto(2-)-železitý komplex, $[\text{Fe}(\text{salophen})(\text{mtz})]$, který se oddělí filtrací za sníženého tlaku.

6. Farmakologický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje terapeuticky účinné množství komplexů železa podle nároku 1 a/nebo farmaceutickou kompozici komplexů železa s ^{mn}jedním či více účinnými látkami, přijatelnými nosiči a pomocnými látkami.
7. Farmakologický prostředek podle nároku 6 pro použití v lékařství.
8. Použití farmakologického prostředku podle nároku 7 jako léčiva pro léčbu nádorových onemocnění.