

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2012-159

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.03.2012**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **05.12.2012**
(Věstník č. 49/2012)

(51) Int. Cl.:

A61K 31/282 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Univerzita Palackého, Olomouc, CZ

(72) Původce:

Trávníček Zdeněk Prof. RNDr. Ph.D., Štěpánov, CZ

Štarha Pavel Mgr. Ph.D., Dub nad Moravou, CZ

Dvořák Zdeněk Prof. RNDr. Ph.D., Olomouc, CZ

(74) Zástupce:

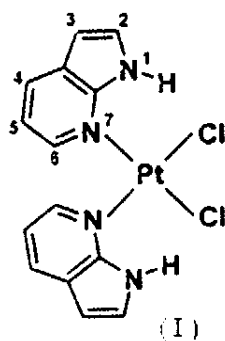
Ing. Petr Soukup, Vídeňská 8, Olomouc, 77200

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití dichlorido komplexů platiny s
halogenderiváty 7-azaindolu pro přípravu
léčiv pro léčbu nádorových onemocnění**

(57) Anotace:

Použití dichlorido komplexů platiny v oxidačním stupni +II a jejich krystalosolvátů vycházejících ze strukturního vzorce I, kde je alespoň jeden z atomů vodíku lokalizovaných na atomech uhlíků C3, C4 nebo C5 na 7-azaindolovém skeletu substituován alespoň jedním atomem ze skupiny chlor, brom nebo jod pro přípravu léčiv pro léčbu karcinomu vaječníku a/nebo cisplatin-resistentní lidské nádorové linie karcinomu vaječníku a/nebo karcinomu prostaty a/nebo karcinomu plic a/nebo karcinomu děložního čípku a/nebo maligního melanomu.



Použití dichlorido komplexů platiny s halogenderiváty 7-azaindolu pro přípravu léčiv pro léčbu nádorových onemocnění

Oblast techniky

Předložený vynález se týká použití dichlorido komplexů platiny s halogenderiváty 7-azaindolu pro přípravu léčiv pro léčbu nádorových onemocnění, konkrétně pak pro léčbu karcinomu vaječníku, karcinomu prostaty, karcinomu plic, karcinomu děložního čípku a nebo maligního melanomu.

Dosavadní stav techniky

Cis-diamindichlorido-platnatý komplex, $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, (*cisplatina*) je v klinické praxi používaným dichlorido komplexem platiny v oxidačním stupni +II. Je součástí protinádorové terapie a je účinný při léčbě karcinomů (např. plic nebo vaječníků), sarkomů a lymfomů. Terapeutická aplikace *cisplatiny* je nicméně provázena četnými negativními vedlejšími účinky, jako je nefrotoxicita, neurotoxicita, myelosuprese nebo nausea. Mnohé typy nádorů navíc vykazují přirozenou nebo získanou rezistenci vůči *cisplatině*. Pro výše uvedené důvody je jedním ze směrů výzkumu protinádorově aktivních substancí příprava komplexů platiny, které by vykazovaly vyšší aktivitu a jejich aplikace by nebyla provázena problémy s rezistencí a zmíněnými vedlejšími negativními účinky.

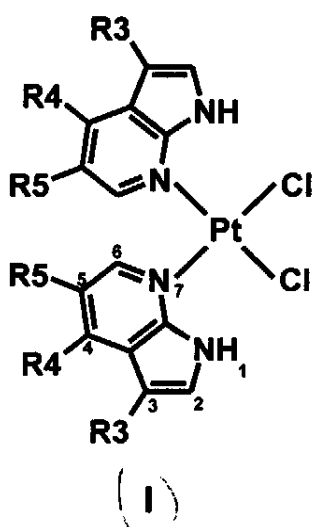
Z pohledu bioanorganické chemie lze v molekule *cisplatiny* rozlišit dva typy ligandů, a to ligandy odstupující (dva chloridové anionty, které jsou ve fyziologickém prostředí substituovány a následně jsou těmito pozicemi koordinovány nukleobáze molekuly DNA) a tzv. "carrier" ligandy (dvě molekuly NH_3 , které ve fyziologickém prostředí substituovány nejsou). V souladu se současnými poznatky vědy je pak patrné, že vliv na výslednou protinádorovou aktivitu komplexů platiny v oxidačním stupni +II bude mít substituce alespoň jednoho z typů ligandů nebo obou těchto typů ligandů.

Vědecký projekt č. 14-01-0001

Předložené platnaté dichlorido komplexy s halogeno-deriváty 7-azaindolu (L), $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{L})_2\text{Cl}_2]$, jsou příkladem derivátů *cisplatin*y, které se od původní sloučeniny liší právě "carrier" ligandy, kdy jsou obě molekuly NH_3 nahrazeny halogeno-derivátem 7-azaindolu koordinovaným přes atom dusíku. U těchto v nedávné době připravených komplexů byla zjištěna ve srovnání s *cisplatinou* výrazně vyšší *in vitro* protinádorová aktivita vůči lidským nádorovým liniím osteosarkomu HOS a prsního adenokarcinomu MCF7, jak je uvedeno ve spise CZ 23204 U1, kde je také v daleko podrobnější míře uveden současný stav problematiky.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je ochrana nového použití dichlorido komplexů platiny v oxidačním stupni +II a jejich krystalosolvátů vyjádřených strukturním vzorcem (I),



kde je alespoň jeden ze substituentů R3, R4 a R5 vybrán ze skupiny: chlor, brom nebo jod, pro přípravu léčiv pro léčbu karcinomu vaječníku a/nebo *cisplatin*-resistentní lidské nádorové linie karcinomu vaječníku a/nebo karcinomu prostaty a/nebo karcinomu plic a/nebo karcinomu děložního čípku a/nebo maligního melanomu.

V návaznosti na stávající výsledky průzkumu bylo neočekávaně zjištěno, že dichlorido komplexy platiny s halogenderiváty 7-azaindolu vyjádřené obecným vzorcem $cis-[PtCl_2(L)_2]$ a jejich krystalosolváty vykazují výraznou *in vitro* protinádorovou aktivitu vůči širokému spektru lidských nádorových linií, konkrétně vůči liniím karcinomu vaječníku, karcinomu prostaty, karcinomu plic, karcinomu děložního čípku a nebo maligního melanomu. Následným studiem na zmíněných lidských nádorových liniích a současně získaných výsledcích tedy bylo prokázáno, že protinádorová účinnost těchto komplexů je daleko širokospektrálnější, než bylo uvedeno v CZ 23204 U1 a CZ 2011-626 A3, což zvyšuje aplikovatelnost připravených sloučenin. Je třeba zdůraznit, že příčinou a nositelem výsledné protinádorové aktivity je komplex platiny a nikoliv reakční komponenty, které jsou vůči testovaným nádorovým liniím neaktivní. Velkou výhodou přihlašovaného řešení pak je zjištěný fakt, že komplexy jsou obecně aktivnější, například vůči *cisplatin*-rezistentní vaječnickové linii (A2780R) více jak 10x ve srovnání s *cisplatinou*.

Právě širokospektrálnost protinádorových účinků a tedy i spektrum možného použití uvedených sloučenin pak společně se současnou selektivitou v působení vůči *cisplatin*-rezistentní vaječnickové linii (A2780R) představují přínos předložené přihlášky vůči současnému stavu poznání.

Přehled obrázků na připojených výkresech

Konkrétní příklady provedení vynálezu jsou doloženy připojenými výkresy, kde:

- obr. 1 je graf *in vitro* protinádorové aktivity komplexů $cis-[PtCl_2(L_2)_2]$ (1), $cis-[PtCl_2(L_3)_2] \cdot 0,75EtOH$ (2) a $cis-[PtCl_2(L_6)_2]$ (3) vůči lidské nádorové linii karcinomu plic A549 a jejich srovnání s *cisplatinou*; L_2 = 3-chlor-7-azaindol, L_3 = 3-jod-7-azaindol, L_6 = 5-brom-7-azaindol

- obr. 2 je graf *in vitro* protinádorové aktivity komplexů $cis-[PtCl_2(L_2)_2]$ (1), $cis-[PtCl_2(L_3)_2] \cdot 0,75EtOH$ (2) a $cis-[PtCl_2(L_6)_2]$ (3) vůči lidské nádorové linii maligního melanomu G361 a jejich srovnání s *cisplatinou*; L_2 = 3-chlor-7-azaindol, L_3 = 3-jod-7-azaindol, L_6 = 5-brom-7-azaindol

- obr. 3 je graf *in vitro* protinádorové aktivity komplexů $cis-[PtCl_2(L_2)_2]$ (1), $cis-[PtCl_2(L_3)_2] \cdot 0,75EtOH$ (2) a $cis-[PtCl_2(L_6)_2]$ (3) vůči lidské nádorové linii karcinomu děložního čípku HeLa a jejich srovnání s *cisplatinou*; $L_2 = 3\text{-chlor-7-azaindol}$, $L_3 = 3\text{-jod-7-azaindol}$, $L_6 = 5\text{-brom-7-azaindol}$

- obr. 4 je graf *in vitro* protinádorové aktivity komplexů $cis-[PtCl_2(L_2)_2]$ (1), $cis-[PtCl_2(L_3)_2] \cdot 0,75EtOH$ (2) a $cis-[PtCl_2(L_6)_2]$ (3) vůči lidské nádorové linii karcinomu vaječníku A2780 a jejich srovnání s *cisplatinou*; $L_2 = 3\text{-chlor-7-azaindol}$, $L_3 = 3\text{-jod-7-azaindol}$, $L_6 = 5\text{-brom-7-azaindol}$

- obr. 5 je graf *in vitro* protinádorové aktivity komplexů $cis-[PtCl_2(L_2)_2]$ (1), $cis-[PtCl_2(L_3)_2] \cdot 0,75EtOH$ (2) a $cis-[PtCl_2(L_6)_2]$ (3) vůči *cisplatin*-resistentní lidské nádorové linii karcinomu vaječníku A2780R a jejich srovnání s *cisplatinou*; $L_2 = 3\text{-chlor-7-azaindol}$, $L_3 = 3\text{-jod-7-azaindol}$, $L_6 = 5\text{-brom-7-azaindol}$

- obr. 6 je graf *in vitro* protinádorové aktivity komplexů $cis-[PtCl_2(L_2)_2]$ (1), $cis-[PtCl_2(L_3)_2] \cdot 0,75EtOH$ (2) a $cis-[PtCl_2(L_6)_2]$ (3) vůči lidské nádorové linii karcinomu prostaty LNCaP a jejich srovnání s *cisplatinou*; $L_2 = 3\text{-chlor-7-azaindol}$, $L_3 = 3\text{-jod-7-azaindol}$, $L_6 = 5\text{-brom-7-azaindol}$

Příklady provedení vynálezu

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

Pro stanovení *in vitro* protinádorové aktivity připravených komplexů, jak je uvedeno v příkladech 1-6 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 protinádorové aktivity byly provedeny na následujících lidských nádorových buněčných liniích: karcinom plic A549, maligní melanom G361, karcinom děložního čípku HeLa, karcinom vaječníku A2780, *cisplatin*-resistentní karcinom vaječníku A2780R a karcinom prostaty LNCaP. Linie byly udržovány v plastických

lahvích v DMEM médiu (5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný) pro buněčné kultury. Suspenze buněk (ca 1.25×10^5 buněk ml⁻¹) byly rozpipetovány po 80 µl na devadesátišesti jamkové mikrotitrační destičky. Tyto byly preinkubovány při 37 °C v CO₂ atmosféře po dobu 24 hodin. Testované platnaté dichlorido komplexy a *cisplatin*a byly předrozpuštěny v *N,N'*-dimetylformamidu, naředěny do koncentrace 50.0 mM a tyto sloužily jako zásobní roztoky. Pro vlastní experiment byly zásobní roztoky ředěny 1000× 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 CO₂. 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 IC₅₀ (µM), odpovídající koncentraci testovaných látek potřebné k inhibici růstu 50% vložených nádorových buněk, byly vypočteny z dávkových křivek.

Příklad 1: *In vitro* protinádorová aktivita studovaných komplexů vůči lidské nádorové linii karcinomu plic A549 a jejich srovnání s *cisplatinou*

Pro stanovení *in vitro* protinádorové aktivity studovaných komplexů *cis*-[PtCl₂(L₂)₂] (1), *cis*-[PtCl₂(L₃)₂]·0,75EtOH (2) a *cis*-[PtCl₂(L₆)₂] (3) a *cisplatin*y vůči lidské nádorové linii karcinomu plic A549 byla použita výše popsaná mikrotitrační analýza využívající MTT (L₂ = 3-chlor-7-azaindol, L₃ = 3-jod-7-azaindol, L₆ = 5-brom-7-azaindol).

Inhibiční koncentrace studovaných komplexů IC₅₀ (µM) se rovnají 7,2±2,3 (komplex 1), 10,3±4,3 (komplex 2) a 4,9±1,7 (komplex 3), hodnota pro *cisplatinu* je 25,8±7,1 (viz obrázek 1).

Příklad 2: *In vitro* protinádorová aktivita studovaných komplexů vůči lidské nádorové linii maligního melanomu G361 a jejich srovnání s *cisplatinou*

Pro stanovení *in vitro* protinádorové aktivity studovaných komplexů *cis*-[PtCl₂(L₂)₂] (1), *cis*-[PtCl₂(L₃)₂]·0,75EtOH (2) a *cis*-[PtCl₂(L₆)₂] (3) a *cisplatinu* vůči lidské nádorové linii maligního melanomu G361 byla použita výše popsaná mikrotitrační analýza využívající MTT (L₂ = 3-chlor-7-azaindol, L₃ = 3-iod-7-azaindol, L₆ = 5-brom-7-azaindol).

Inhibiční koncentrace studovaných komplexů IC₅₀ (μM) se rovnají 2,0±0,6 (komplex 1), 3,0±1,7 (komplex 2) a 0,6±0,2 (komplex 3), hodnota pro *cisplatinu* je 3,4±0,1 (viz obrázek 2).

Příklad 3: *In vitro* protinádorová aktivita studovaných komplexů vůči lidské nádorové linii karcinomu děložního čípku HeLa a jejich srovnání s *cisplatinou*

Pro stanovení *in vitro* protinádorové aktivity studovaných komplexů *cis*-[PtCl₂(L₂)₂] (1), *cis*-[PtCl₂(L₃)₂]·0,75EtOH (2) a *cis*-[PtCl₂(L₆)₂] (3) a *cisplatinu* vůči lidské nádorové linii karcinomu děložního čípku HeLa byla použita výše popsaná mikrotitrační analýza využívající MTT (L₂ = 3-chlor-7-azaindol, L₃ = 3-iod-7-azaindol, L₆ = 5-brom-7-azaindol).

Inhibiční koncentrace studovaných komplexů IC₅₀ (μM) se rovnají 4,5±2,9 (komplex 1), 5,0±1,9 (komplex 2) a 4,3±1,8 (komplex 3), hodnota pro *cisplatinu* je 10,0±2,6 (viz obrázek 3).

Příklad 4: *In vitro* protinádorová aktivita studovaných komplexů vůči lidské nádorové linii karcinomu vaječníku A2780 a jejich srovnání s *cisplatinou*

Pro stanovení *in vitro* protinádorové aktivity studovaných komplexů *cis*-[PtCl₂(L₂)₂] (1), *cis*-[PtCl₂(L₃)₂]·0,75EtOH (2) a *cis*-[PtCl₂(L₆)₂] (3) a *cisplatinu* vůči lidské nádorové linii karcinomu vaječníku A2780 byla použita výše popsaná mikrotitrační analýza využívající MTT (L₂ = 3-chlor-7-azaindol, L₃ = 3-iod-7-azaindol, L₆ = 5-brom-7-azaindol).

Inhibiční koncentrace studovaných komplexů IC_{50} (μM) se rovnají $2,6 \pm 0,4$ (komplex 1), $2,4 \pm 0,7$ (komplex 2) a $1,8 \pm 0,7$ (komplex 3), hodnota pro *cisplatinu* je $12,0 \pm 0,8$ (viz obrázek 4).

Příklad 5: *In vitro* protinádorová aktivita studovaných komplexů vůči lidské nádorové linii *cisplatin*-resistentnímu karcinomu vaječníku A2780R a jejich srovnání s *cisplatinou*

Pro stanovení *in vitro* protinádorové aktivity studovaných komplexů *cis*- $[PtCl_2(L_2)_2]$ (1), *cis*- $[PtCl_2(L_3)_2] \cdot 0,75EtOH$ (2) a *cis*- $[PtCl_2(L_6)_2]$ (3) a *cisplatinu* vůči lidské nádorové linii *cisplatin*-resistentního karcinomu vaječníku A2780R byla použita výše popsaná mikrotitrační analýza využívající MTT (L_2 = 3-chlor-7-azaindol, L_3 = 3-jod-7-azaindol, L_6 = 5-brom-7-azaindol).

Inhibiční koncentrace studovaných komplexů IC_{50} (μM) se rovnají $2,7 \pm 0,7$ (komplex 1), $2,8 \pm 0,8$ (komplex 2) a $2,1 \pm 0,7$ (komplex 3), hodnota pro *cisplatinu* je $27,0 \pm 4,6$ (viz obrázek 5).

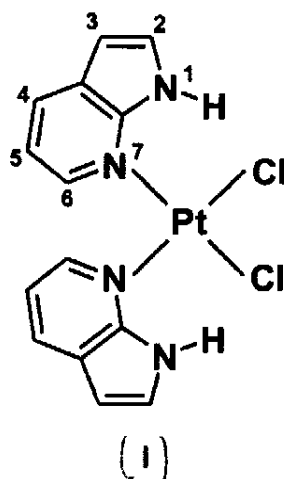
Příklad 6: *In vitro* protinádorová aktivita studovaných komplexů vůči lidské nádorové linii karcinomu prostaty LNCaP a jejich srovnání s *cisplatinou*

Pro stanovení *in vitro* protinádorové aktivity studovaných komplexů *cis*- $[PtCl_2(L_2)_2]$ (1), *cis*- $[PtCl_2(L_3)_2] \cdot 0,75EtOH$ (2) a *cis*- $[PtCl_2(L_6)_2]$ (3) a *cisplatinu* vůči lidské nádorové linii karcinomu prostaty LNCaP byla použita výše popsaná mikrotitrační analýza využívající MTT (L_2 = 3-chlor-7-azaindol, L_3 = 3-jod-7-azaindol, L_6 = 5-brom-7-azaindol).

Inhibiční koncentrace studovaných komplexů IC_{50} (μM) se rovnají $3,3 \pm 0,7$ (komplex 1), $3,8 \pm 1,3$ (komplex 2) a $1,5 \pm 0,4$ (komplex 3), hodnota pro *cisplatinu* je $3,8 \pm 1,5$ (viz obrázek 6).

PATENTOVÉ NÁROKY

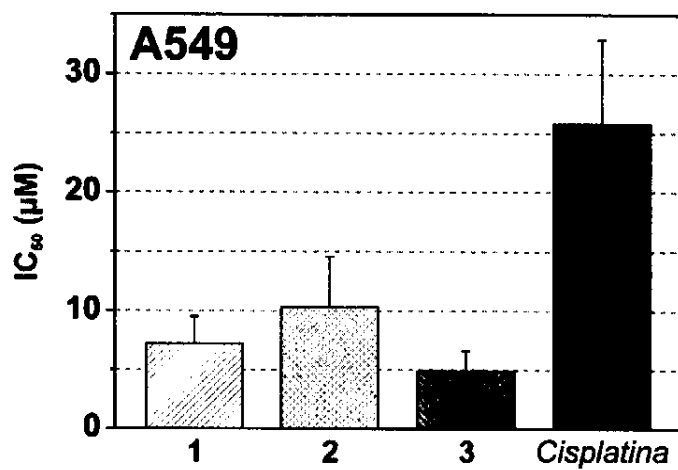
Použití dichlorido komplexů platiny v oxidačním stupni +II a jejich krystalosolvátů vycházejících ze strukturního vzorce (I),



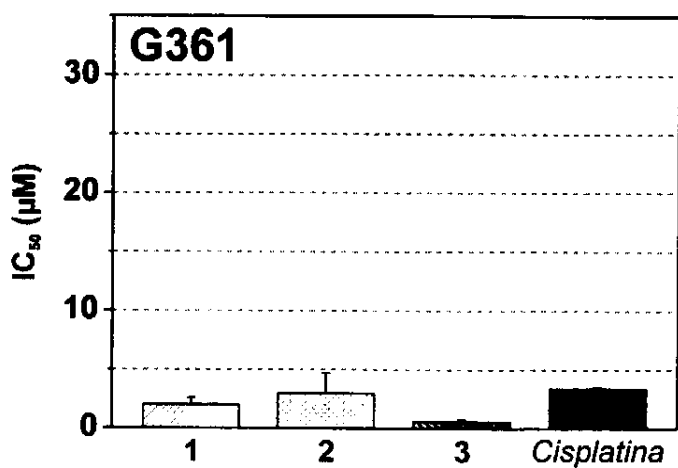
kde je alespoň jeden z atomů vodíku lokalizovaných na atomech uhlíků C3, C4 nebo C5 na 7-azaindolovém skeletu substituován alespoň jedním atomem ze skupiny chlor, brom nebo jod pro přípravu léčiv pro léčbu karcinomu vaječníku a/nebo *cisplatin*-resistentní lidské nádorové linie karcinomu vaječníku a/nebo karcinomu prostaty a/nebo karcinomu plic a/nebo karcinomu děložního čípku a/nebo maligního melanomu.

TISK

IV 2012-11-13
07:00:12

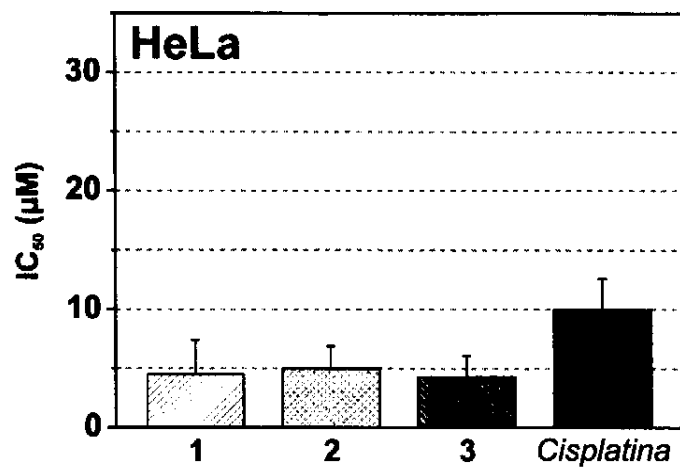


OBR. 1

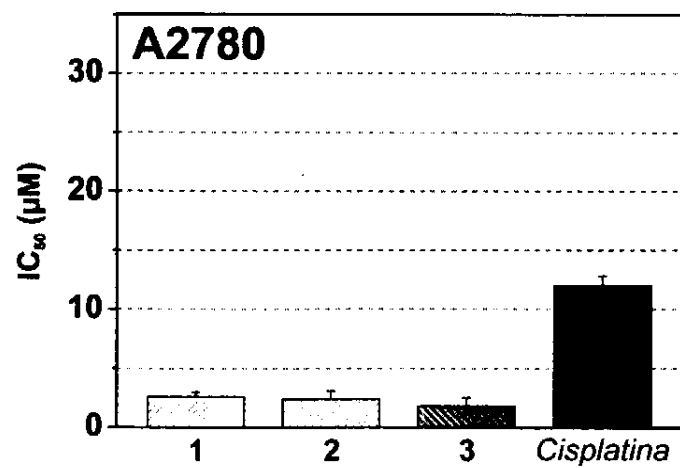


OBR. 2

1/3



OBR. 3



OBR. 4

