

C07F 1/12 (2006.01)
A61K 31/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2018-87
(22) Přihlášeno: 22.02.2018
(40) Zveřejněno: 11.09.2019
(Věstník č. 37/2019)
(47) Uděleno: 31.07.2019
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 11.09.2019
(Věstník č. 37/2019)

(56) Relevantní dokumenty:

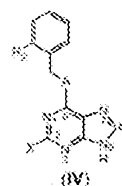
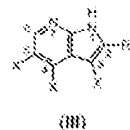
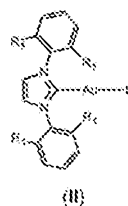
DE FRÉMONT, Pierre, a kol. Synthesis and characterization of gold (I) N-heterocyclic carbene complexes bearing biologically compatible moieties. Organometallics, 2006, 25(24) 5824-5828. ISSN: 0276-7333; ŠTARHA, Pavel, a kol. In Vitro Antitumor Active Gold (I) Triphenylphosphane Complexes Containing 7-Azaindoles. International journal of molecular sciences, 2016, 17(12): 2084. ISSN 1661-6596; SELIMAN, Adam AA, a kol. Synthesis, X-ray structure, DFT calculations and anticancer activity of a selenourea coordinated gold (I)-carbene complex. Polyhedron, 2017, 137: 197-206. ISSN 0277-5387.
CZ 303649 B6.

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

(72) Původce:
prof. RNDr. Zdeněk Trávníček, Ph.D., Štěpánov, CZ
doc. PharmDr. Ján Vančo, Ph.D., Heršpice, CZ
prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Ph.D., DSc., Olomouc, Řepčín, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Petr Soukup, tř. Svobody 43/39, 779 00 Olomouc

organická molekula, vybraná ze skupiny voda, primární alkohol, sekundární alkohol, hexan, aceton, *N,N*-dimethylformamid, dimethylsulfoxid, ethylacetát, dichlormethan, acetonitril nebo diethylether, a to buď samostatně, nebo v kombinaci uvedených solvátových molekul.



(54) Název vynálezu:

N-heterocyklické karbenové komplexy zlata s bicyklickými N-donorovými ligandy a použití těchto komplexů pro přípravu léčiv k protinádorové terapii

(57) Anotace:

N-heterocyklické karbenové (NHC) komplexy zlata v oxidačním stupni +I s deprotonizovanými bicyklickými monodentátně se koordinujícími N-donorovými ligandy obecného složení [Au(NHC)(L)] I, vyjádřeného strukturálním vzorcem II, kde symbol L představuje derivát N1-deprotonizovaného 7-azaindolu strukturálního vzorce III vázaný na atom zlata přes atom dusíku N1 nebo derivát N9-deprotonizovaného 9H-purinu strukturálního vzorce IV vázaný na atom zlata přes atom dusíku N9, kde skupina X představuje atom vodíku nebo atom halogenu vybraný ze skupiny fluor, chlor, brom, jód; skupina A představuje atom síry nebo skupinu NH; substituent R1 je atom vodíku nebo rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec tvořený z 1 až 6 atomů uhlíku; substituent R2 je atom vodíku nebo atom fluoru nebo trifluoromethylová skupina; a krystalosolváty komplexů zlata strukturálního vzorce II, jejichž složení vyjadřuje vzorec [Au(NHC)(L)]_nSolv, kde *n* udává počet krystalosolvátových molekul, který je 1 až 2, a Solv je

N-heterocyklické karbenové komplexy zlata s bicyklickými N-donorovými ligandy a použití těchto komplexů pro přípravu léčiv k protinádorové terapii

5 Oblast techniky

Předložený vynález, spadající do oblasti léčiv nádorových onemocnění na bázi koordinačních sloučenin zlata v oxidačním stupni +I se zabývá protinádorově účinnými N-heterocyklickými karbenovými (NHC) zlatnými komplexy s deprotonizovanými bicyklickými monodentátními N-donorovými ligandy a jejich použitím k přípravě léčiv v protinádorové terapii, konkrétně pak pro léčbu karcinomu vaječníků a/nebo karcinomu vaječníků rezistentnímu vůči *cisplatině* a/nebo lidského osteosarkomu.

15 Dosavadní stav techniky

V soudobé konvenční farmakoterapii (ATC klasifikace WHO, 2018) se užívá zlata a komplexů zlata pouze v indikacích souvisejících se zánětlivými onemocněními, konkrétně pak injekcí koloidálního zlata ^{198}Au pro radiační synovektomii (ATC kód V10AX06) a komplexů zlata v oxidačním stupni +I jako jsou Natrium-Aurothiomalát (ATC kód M01CB01), Natrium-Aurothiosulfát (ATC kód M01CB02), Aurothioglukosa (ATC kód M01CB04) a Aurotioprol (ATC kód M01CB05) v injekční aplikační formě, a Auranofin (ATC kód M01CB03) v perorální formě k chrysoterapii zánětlivých a autoimunitních onemocnění (Bykerk V.P. 55 - Nonimmunosuppressive disease-modifying antirheumatic drugs. In: Hochberg M.C. et al. (Eds.), Rheumatology, 6th ed. Vol. 1, Elsevier: Amsterdam, 2015, pp. 434-442). Mímoto je v současnosti evidováno 14 klinických studií (ClinicalTrials.gov, National Library of Medicine, USA), zabývajících se zejména použitím Auranofinu pro léčbu různých druhů nádorů (např. glioblastom, recidivující nemalobuněčný plicní karcinom, rakovina vaječníků nebo vejcovodů, chronická leukocytická leukémie), dále pak použitím Natrium-Aurothiomalátu pro léčbu různých druhů nádorů (např. nemalobuněčný plicní karcinom), použitím koloidním zlatem modifikovaného tumor- nekrotizujícího faktoru pro léčbu solidních a metastazujících tumorů. Z dalších klinických testů v jiných indikacích je to použití Auranofinu pro tlumení syndromu bolesti indukovaného paklitaxelem, použití Auranofinu k eliminaci latentního virálního rezervoáru u pacientů infikovaných virem HIV, použití Auranofinu k léčbě parazitárních onemocnění gastro-intestinálního traktu a tuberkulózy.

Na rozdíl od výše zmíněných komplexů zlata, organokovové sloučeniny zlata s N-heterocyklickými karbenovými ligandy našly za posledních 15 let využití v syntetické chemii zejména jako katalyzátory cykloisomerizace enynů, hydroarylací, diborací, [3,3]-přesmyků, hydroaminací, hydratací a polymerizací, a v současnosti se také zkoumá jejich uplatnění při aktivaci C-H vazeb alkanů, hydrogenaci olefinů a katalýze cross-couplingových reakcí (Marion N., Nolan S.P., N-Heterocyclic carbenes in gold catalysis. *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1776-1782). Jejich biologická aktivita, a zejména pak protinádorová aktivita (Liu W., Gust R. Update on metal N-heterocyclic carbene complexes as potential anti-tumor metallodrugs. *Coord. Chem. Rev.* 329 (2016) 191-213) se stala předmětem zájmu bioanorganických chemiků až v posledním období.

Pečlivým vyhodnocením trendů výzkumu a vývoje protinádorově-aktivních N- heterocyklických karbenových komplexů zlata bylo možné identifikovat tři hlavní směry, které dosud vedly k protinádorově účinným derivátům (Liu W., Gust R. Update on metal N-heterocyclic carbene complexes as potential anti-tumor metallodrugs. *Coord. Chem. Rev.* 329 (2016) 191-213).

První směr reprezentují bis-karbenové zlatné komplexy obecného složení $[\text{Au}(\text{NHC})_2]\text{X}$, kde X je halogen, z nichž nejúčinnější komplexy bis-[(1,3-diethylbenzylimidazol-2-yliden)]zlatné vykazaly vysokou cytotoxicitu proti buňkám pankreatického adenokarcinomu (Bxpc3, Miapaca2,

Panc1, ASPC1 při 72 h inkubační době) s hodnotami IC_{50} v rozsahu 60 až 280 nM (Cheng X. et al., A TrxR inhibiting gold(I) NHC complex induces apoptosis through ASK1-p38-MAPK signaling in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer* 13 (2014) 221) a oproti buněčné linii karcinomu prsu (MCF-7) s IC_{50} na úrovni 100 nM po 72 h inkubaci (Liu W. et al. Synthesis, Characterization, and in Vitro Studies of Bis[1,3-diethyl-4,5-diarylimidazol-2-ylidene]gold(I/III) Complexes. *J. Med. Chem.* 55 (2012) 3713-3724).

Druhým přístupem vedoucím k řadě protinádorově účinných karbenových zlatných komplexů je příprava dimerních a/nebo bimetalických komplexů. Jednou z protinádorově nejúčinnějších skupin komplexů byly identifikovány (4-fenyl-5-ferrocenyl-1,3-diethylimidazol-2-yliden)zlatné komplexy nesoucí chlorido (L) nebo trifenyfosfinové ligandy (L) na Au(I) centru obecného vzorce $[Au(Cf-NHC)(L)]X$ nebo bis-karbenové uspořádání obecného vzorce $[Au(NHC)_2]X$, kde Cf-NHC je 4-fenyl-5-ferrocenyl-1,3-diethylimidazol-2-ylidenový ligand, L = halogen nebo derivát fosfanu a X je halogenidový nebo tetrafluoroboritanový aniont (Muenzner J.K. et al. Ferrocenyl- Coupled N-Heterocyclic Carbene Complexes of Gold(I): A Successful Approach to Multinuclear Anticancer Drugs. *Chem. Eur. J.* 22 (2016) 18953-18962). Tyto komplexy vykázaly nejlepší *in vitro* cytotoxicitu proti buněčným liniím karcinomu tlustého střeva (HCT-116) a kolorektálního karcinomu (HT-29) s hodnotami IC_{50} v rozsahu 90 až 160 nM po 72 h inkubaci. Další z vysoce účinných skupin heterobimetalických komplexů byly identifikovány komplexy obecného vzorce $\{[R^II Cl_2(p-Cym)]-(Ph_2P-Me-PPh_2)-[Au^I(NHC)]\}ClO_4$, kde *p*-Cym reprezentuje η^6 -*p*-cymenový ligand a $Ph_2P-Me-PPh_2$ můstkující methandiylbis(difenyfosfanový) ligand a NHC je imidazol-2-ylidenový ligand, který je různě substituován v polohách 1 a 3 arenovými nebo alkylovými substituenty (Fernández-Gallardo J. et al. Versatile synthesis of cationic N-heterocyclic carbene-gold(I) complexes containing a second ancillary ligand. Design of heterobimetallic ruthenium-gold anticancer agents. *Chem. Commun.* 52 (2016) 3155-3158). Tato skupina komplexů vykazovala synergický efekt obou kovových center na *in vitro* cytotoxicitu látek proti liniím renálního karcinomu (Caki-1) a karcinomu tlustého střeva (HCT-116) s hodnotami IC_{50} v rozsahu 3,8 až 8,1 μ M po 72 h inkubaci, přičemž byly shledány netoxickými vůči lidským embryonálním buňkám ledvin (HEK-293T) až do 100 μ M koncentrace.

Třetí skupinou zlatných komplexů, z níž některé dosáhly pozoruhodných výsledků při screeningu protinádorové aktivity, je skupina mononukleárních N- heterocyklických karbenových komplexů zlata s dalšími vhodnými ligandy, koordinovanými na kovovém centru. Skupina možných ko-ligandů je přitom celkem rozsáhlá a zahrnuje zejména:

a) halogenido-ligandy (X), např. u látek obecného složení $[Au(NHC)(X)]$, kde NHC je derivát 1,2,4-triazol-5-ylidenového ligandu, byla nalezena protinádorová aktivita vůči lidským leukemickým liniím (HL60 a CCRF CEM po 72 h inkubaci) s hodnotami IC_{50} v rozsahu 1,25 až 2,52 μ M (Turek J. et al. 1,2,4-Triazole-based N-heterocyclic carbene complexes of gold(I): synthesis, characterization and biological activity. *Appl. Organomet. Chem.* 30 (2016) 318-322) nebo komplex kde NHC = 1,3-dibenzyl-4,5-difenyylimidazol-2-yliden byl testován na panelu NCI-60, na kterém dosáhl hodnot poloviční koncentrace inhibice růstu GI_{50} v rozsahu 0,32 až 7,28 μ M (Walther W. et al. In Vitro and In Vivo Investigations into the Carbene Gold Chloride and Thioglucoside Anticancer Drug Candidates NHC-AuCl and NHC-AuSR. *Lett. Drug. Des. Discover.* 14 (2017) 125-134),

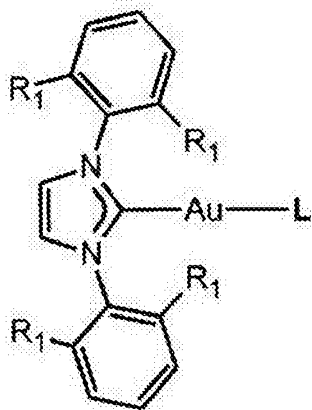
b) *P*-donorové ligandy, obvykle deriváty fosfanu PR_3 , kde R je např. fenyl jako u protinádorově vysoce účinného komplexu $[Au(NHC)(PPh_3)]I$, který vykázal vysokou cytotoxicitu proti buňkám pankreatického adenokarcinomu (Bxpc3, Miapaca2, Panc1, ASPC1 při 72 h inkubaci) s hodnotami IC_{50} v rozsahu 8 až 820 nM (Cheng X. et al., A TrxR inhibiting gold(I) NHC complex induces apoptosis through ASK1-p38-MAPK signaling in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer* 13 (2014) 221),

c) *S*-donorové ligandy, zejména ze skupin pseudohalogenidů, thiolů, thionů nebo dithiokarbamátů, příkladem protinádorově účinných komplexů z této skupiny látek je komplex

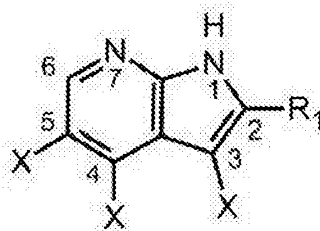
- thiokyanáto-(1,3-dibenzyl-4,5-difenyylimidazol-2-yliden)zlatný komplex, $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{SCN})]$, který prokázal vysokou účinnost vůči buněčným liniím karcinomu prsu (MCF-7), renálního karcinomu (SN12C), leukemickým buňkám (K-562) a karcinomu tlustého střeva (COLO 205) s hodnotami GI_{50} v rozmezí 290 až 470 nM (Dada O. et al. Synthesis and cytotoxicity studies of novel NHC-Gold(I) pseudohalides and thiolates. *J. Organomet. Chem.* 840 (2017) 30-37) nebo komplexy obecného vzorce $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{SL})]$ nebo $\{[\text{Au}(\text{NHC})]2-\mu\text{-S}_L\}$, kde S_L představuje monodentátně nebo bidentátně koordinovaný dithiokarbamatový ligand, dosahující vůči buňkám ovariálního karcinomu resistentního vůči cisplatině po 72 h inkubaci hodnoty IC_{50} na úrovni 820 nM, jak je popsáno v dokumentech US9573967 B2 a (Sun R.W.Y et al. Dinuclear Gold(I) Pyrrolidinedithiocarbamate Complex: Cytotoxic and Antimigratory Activities on Cancer Cells and the Use of Metal-Organic Framework. *Chem. Eur. J.* 21 (2015) 18534-18538),
- d) O-donorové ligandy, zejména karboxyláto-ligandy (Hackenberg F. et al. Novel Ruthenium(II) and Gold(I) NHC Complexes: Synthesis, Characterization, and Evaluation of Their Anticancer Properties. *Organometallics* 32 (2013) 5551-5560),
- e) C-donorové ligandy, reprezentované zejména alkynylovými ligandy (Bertrand B., Casini A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans.* 43 (2014) 4209-4219), přičemž komplexy obecného složení $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{L})]$, kde $\text{L} = \dots$, s těmito ligandy prokázaly vysokou protinádorovou účinnost, např. vůči buňkám kolorektálního adenokarcinomu (HT-29) nebo karcinomu prsu (MCF-7) na úrovni $\text{IC}_{50} = 0,8$ až $9,0 \mu\text{M}$ jak je patrné například z patentových spisů EP2776017 B1, JP5181480 B2, nebo JP5594139 B2.
- f) N-donorové ligandy, přičemž tato skupina NHC zlatných komplexů je jednoznačně nejmenší. Dosud byly tyto látky studovány zejména jako katalyzátory organických reakcí, což dokumentují komplexy obecného složení $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{N}_L)]$, kde N_L jsou např. deriváty pyridinu jako katalyzátory oxidace benzylalkoholu (Chiou J.Y.Z. et al. Gold(I) Complexes of N-Heterocyclic Carbenes and Pyridines. *Eur. J. Inorg. Chem.* (2009) 1950-1959) nebo karbazol (Wang H.M.J. et al. Gold(I) N-Heterocyclic Carbene and Carbazolate Complexes. *Organometallics* 24 (2005) 486-493). Využití N-heterocyklických karbenových zlatných komplexů s aziny pro přípravu emisní vrstvy OLED zařízení popisuje spis WO 2017/046572 A1.
- I když skupinu NHC-komplexů zlata s N-donorovými ligandy tvoří cca. desítky látek, protinádorová aktivita těchto látek byla testována pouze ojedinele, konkrétně pak u komplexu (1,2,3,4,6,7,8,9-octahydropyridazino[1,2-a]indazolin-11-yliden)zlatného s 4-dimethylaminopyridinem, obecně popsaného vzorcem $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{L})]\text{X}$, kde $\text{L} = 4$ -dimethylaminopyridin (Sivaram H. et al. Cationic gold(I) heteroleptic complexes bearing a pyrazole-derived N-heterocyclic carbene: syntheses, characterizations, and cytotoxic activities. *Dalton Trans.* 42 (2013) 12421-12428) a (bis(2,6-diisopropylfenyl)imidazol-2-yliden)zlatného s deprotonovanou N-atomem koordinovanou molekulou sacharinu, obecně popsaného vzorcem $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{L})]$, kde HL reprezentuje molekulu sacharinu (Weaver J. et al. Cytotoxicity of Gold(I) N- Heterocyclic Carbene Complexes Assessed by Using Human Tumor Cell Lines. *Chem. Eur. J.* 17 (2011) 6620-6624). V obou případech tyto komplexy byly shledány jako protinádorově neúčinné. Toto zjištění také potvrzuje obecný trend vyplývající z analýzy závislosti mezi složením a protinádorovou aktivitou ve skupině NHC-komplexů zlata s různými ko-ligandy, a to že konkrétní míra protinádorové aktivity není u nových látek predikovatelná.
- Použití iontových zlatných komplexů obecného vzorce $[\text{Au}(\text{L})(\text{Py})]\text{X}$, kde L je NHC nebo derivát fosfanu, Py je derivát pyridinu a X je „farmaceuticky akceptovatelný“ aniont, pro použití k léčbě rakoviny popisuje spis W02014/048480 A1. Jako protinádorově účinné látky byly identifikovány také zlatité NHC-komplexy s dvou- nebo tří-donorovými ligandy typu $\{C,N\}$, $\{C,N,C\}$, $\{C,N,N\}$ a $\{N,N,N\}$ jak je dokumentováno ve spisech EP2493896 B1 a US8828984 B2 a přehledném článku (Bertrand B., Casini A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans.* 43 (2014) 4209-4219).

Podstata vynálezu

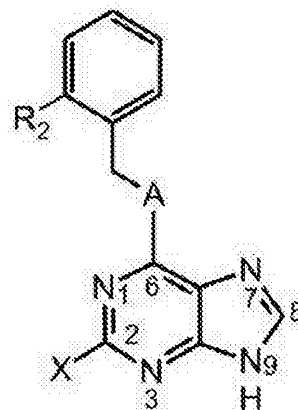
Podstatou vynálezu jsou N-heterocyklické karbenové komplexy zlata v oxidačním stupni +I s deprotonizovanými bicyklickými monodentátně se koordinujícími N-donorovými ligandy obecného složení $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{L})]$ I, vyjádřeného strukturním vzorcem II, kde symbol L představuje derivát N1-deprotonizovaného 7-azaindolu strukturního vzorce III vázaného na atom zlata přes atom dusíku N1 nebo derivátu N9-deprotonizovaného 9H-purinu strukturního vzorce IV vázaný na atom zlata přes atom dusíku N9,



(II)



(III)



(IV)

kde:

- skupina X představuje atom vodíku nebo atom halogenu vybraný ze skupiny fluor, chlor, brom, jód,
- skupina A představuje atom síry nebo skupinu NH
- substituent R1 je atom vodíku nebo rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec tvořený z 1 až 6 atomů uhlíku,
- substituent R2 je atom vodíku nebo atom halogenu nebo methylová skupina nebo trifluoromethylová skupina,
- a krystalosolváty komplexů zlata strukturního vzorce II, jejichž složení vyjadřuje vzorec $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{L})] \cdot n\text{Solv}$ v němž jsou
- L a NHC definovány výše,
- n udává počet krystalosolvátových molekul, který je 1 až 2, a
- Solv je organická molekula, vybraná ze skupiny voda, primární alkohol, sekundární alkohol, hexan, aceton, N,N-dimethylformamid, dimethylsulfoxid, ethylacetát, dichlormethan, acetonitril nebo diethylether, a to buď samostatně, nebo v kombinaci uvedených solvátových molekul.

Taktéž je podstatou vynálezu farmakologický prostředek obsahující terapeuticky účinné množství zlatných komplexů strukturního vzorce II nebo jejich krystalosolvátů, nebo farmaceutickou kompozici zlatných komplexů vzorce II nebo jejich krystalosolvátů s jedním či více přijatelnými nosiči a pomocnými látkami určený pro použití v lékařství pro výrobu léčiv pro léčení nádorových onemocnění, zejména pro léčbu karcinomu vaječníků a/nebo karcinomu vaječníků rezistentního vůči *cisplatině* a/nebo lidského osteosarkomu.

Objasnění výkresů

Konkrétní příklady provedení vynálezu jsou doloženy připojenými výkresy, kde:

- Obr. 1 je ^{13}C NMR spektrum komplexu $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{L}_1)]$ 1 rozpuštěného v CDCl_3 měřené při teplotě 298 K a prezentované společně s přiřazením jednotlivých uhlíkových atomů.
- Obr. 2 je ^{13}C NMR spektrum komplexu $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{L}_2)]$ 4 rozpuštěného v CDCl_3 měřené při teplotě 298 K a prezentované společně s přiřazením jednotlivých uhlíkových atomů.
- Obr. 3 je zobrazení molekulové struktury komplexu $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{L}_2)] \cdot n\text{-Hex}$ - 4-*n*-Hex, tj. *n*-hexanového krystalosolvátu látky 4. Atomy vodíku byly vynechány z důvodu větší přehlednosti.

Příklady uskutečnění vynálezu

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

- hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI+ i ESI- technikou), (LCQ Fleet, Thermo Scientific)
- nukleární magnetická rezonance - ^1H , ^{13}C , ^{19}F (400 MHz NMR spektrometr, Varian a 600 MHz NMR spektrometr JNM-ECA600II, Jeol)
- X-ray monokrystalová difraktoimetrie (monokrystalový difraktometr Bruker D8 QUEST vybavený PHOTON 100 CMOS detektorem).

Pro stanovení *in vitro* cytotoxicity připravených NHC-komplexů zlata byla použita mikrotitrační metoda, která hodnotí životaschopnost buněk na základě schopnosti metabolicky aktivních buněk redukovat 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) za vzniku modrého formazanového barviva. Jelikož k této redukci dochází pouze v živých buňkách, lze tímto způsobem stanovit cytotoxicitu chemických látek. V buňce jsou za redukci zodpovědné enzymy mitochondriálních dehydrogenas. Modré formazanové barvivo je nerozpustné a je následně kvantifikováno po rozpuštění v DMSO s amoniakem za použití klasického spektrofotometru (ELISA reader). *In vitro* testy protinádorové aktivity byly provedeny na následujících lidských nádorových buněčných liniích: A2780 = karcinom vaječníků; A2780R = karcinom vaječníků resistentní vůči cisplatině a HOS = osteosarkom. 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. 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 komplexy byly rozpuštěny nejdříve 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 až 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% CO_2 . Následně 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. Inhibiční koncentrace testovaných komplexů IC_{50} (µM), odpovídající koncentraci testovaných látek toxické pro 50% vložených nádorových buněk, byly vypočteny z koncentračních křivek.

Příklad 1: Obecná metoda přípravy a charakterizace zlatných NHC-komplexů s deprotonizovanými N-donorovými ligandy odvozenými od 7-azaindolu a purinu.

Prekurzor pro přípravu cílových komplexů, chlorido-[1,3-bis(2,6-diisopropylfenyl)imidazol-2-yliden]zlatný komplex byl připraven třístupňovou syntézou dle postupů popsanych v literatuře (Arduengo, A.J. et al. Imidazolydenes, Imidazolydenes and Imidazolidines. *Tetrahedron* 1999, 55, 14523-14534; Collado, A. et al. Straightforward synthesis of $[\text{Au}(\text{NHC})\text{X}]$ (NHC = W-

heterocyclic carbene, X = Cl, Br, I) complexes. *Chem. Comm.* 2013, 49, 5541-5543) z komerčně dostupného chlorido-(dimethylsulfid)zlatného komplexu, vodného roztoku glyoxalu (40 hm. % v H₂O) a 2,6-diisopropylanilinu. Prekurzorový komplex byl izolován v podobě bílého prášku a rekrystalizován z acetonu.

5

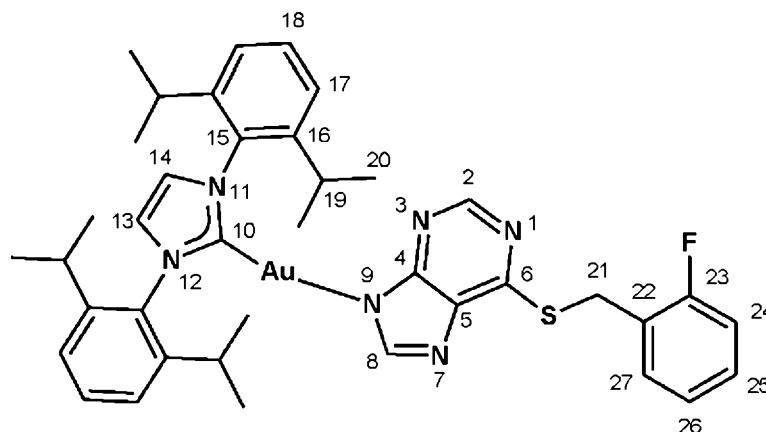
V druhém kroku byl chlorido-ligand prekurzoru substituován reakcí s ligandem (HL₁ = 6-[(2-fluorofenyl)sulfanyl]-9H-purin; HL₂ = 6-[(2-trifluoromethylfenyl)sulfanyl]-9H-purin; HL₃ = 2-fluoro-6-benzylamino-9H-purin; HL₄ = 5-fluoro-7-azaindol; HL₅ = 2-methyl-4-chloro-7-azaindol; HL₆ = 3-chloro-7-azaindol) přidaného v 1,1-násobném nadbytku v suchém propan-2-olu za přítomnosti 1,3-násobného nadbytku uhličitanu cesného při 55 °C po dobu 16 h. Finální komplexy byly izolovány jako bezbarvé pevné látky ve výtěžku vyšším jak 60 %.

10

Následně byl produkt vysušen v exsikátoru nad hydroxidem draselným za sníženého tlaku po dobu minimálně 2 dnů.

15

{6-[(2-fluorofenyl)sulfanyl]purin-9-ato}-[1,3-bis(2,6-diisopropylfenyl)imidazol-2-yliden]zlatný komplex 1



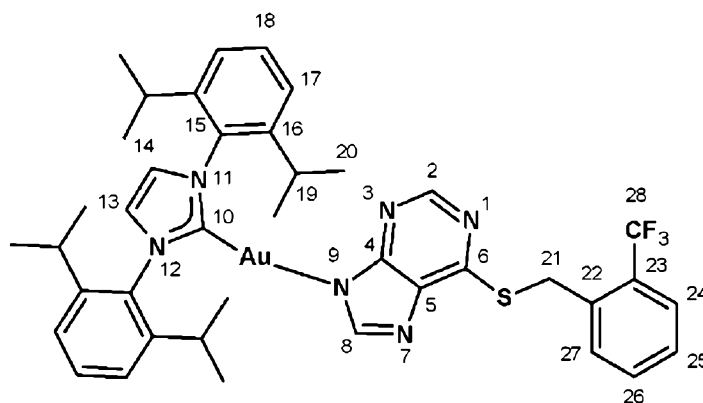
(1)

20

Výtěžek: 50 %. Elementární složení pro C₃₉H₄₄AuFN₆S vypočteno (nalezeno): C, 55,4 (55,2); H, 5,3 (5,4); N, 10,0 (9,6)%. ESI+ MS (methanol, m/z): 845 (vyp. 845) [Au(NHC)L+H]⁺, 1429 (vyp. 1429) [M₂(NHC)₂L]⁺. ESI- MS (methanol, m/z): 843 (vyp. 843) [Au(NHC)L-H]⁻. ¹H NMR (CDCl₃, ppm, SiMe₄): 8,63 (s, CH₂, 1H), 7,46 (t, C₁₈H, 2H), 7,41 (s, CH₈, 1H), 7,37-7,30 (m, C₂₆H, C₂₅H, 2H), 7,27-7,23 (m, C₁₃H, C₁₄H, C₁₇H, 6H), 7,07 (m, C₂₄H, 1H), 7,01 (td, C₂₇H, 1H), 4,45 (s, CH₂₁, 2H), 2,57 (sept, 19CH, 4H), 1,28 (d, C₂₀, 12H), 1,22 (d, C₂₀, 12H). ¹⁹F NMR (CDCl₃, ppm, externí CF₃CO₂H): -118. ¹³C NMR (CDCl₃, ppm, SiMe₄): 174,9 (C₁₀), 159,7 (C₆), 159,1 (C₄), 153,5 (C₈), 152,7 (C₂₃), 150,1 (C₂), 145,8 (C₁₆), 134,0 (s, C₁₅), 131,8 (C₂₇), 130,9 (C₁₈), 129,6 (C₅), 128,6 (C₂₅), 126,1 (C₂₂), 124,4 (s, C₁₇), 124,2 (C₂₆), 123,6 (C₁₃, C₁₄), 114,9 (C₂₄), 29,0 (19C), 25,5 (C₂₁), 24,5 (C₂₀), 24,3 (C₂₀).

30

{6-[(2-trifluoromethylfenyl)sulfanyl]purin-9-ato}-[1,3-bis(2,6-diisopropylfenyl)imidazol-2-yliden]zlatný komplex 2

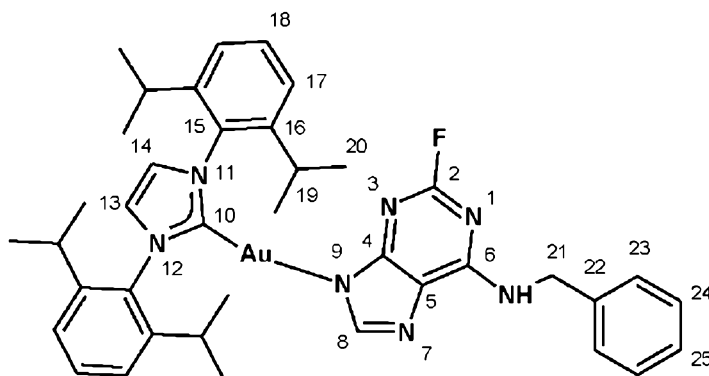


(2)

Výtěžek: 54 %. Elementární složení pro $C_{40}H_{44}AuF_3N_6S$ vypočteno (nalezeno): C, 53,7 (53,6);
 5 H, 5,0 (4,9); N, 9,4 (9,1)%. ESI+ MS (methanol, m/z): 895 (vyp 895) $[Au(NHC)L+H]^+$. ESI- MS
 (methanol, m/z): 309 (vyp 309) $[L-H]^-$, 893 (vyp 893) $[Au(NHC)L-H]^-$. 1H NMR (CDCl₃ ppm,
 SiMe₄): 8,59 (s, 1H), 7,68 (d, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,41-7,39 (m, 2H), 7,31 (d, 2H, C17H), 7,20 (s,
 2H), 7,19 (s, 1H, C18H), 4,64 (s, 2H), 2,58 (sept, 4H), 1,29 (d, 12H), 1,21 (d, 12H). ^{19}F NMR
 (CDCl₃, ppm, externí CF₃CO₂H): -59. ^{13}C NMR (CDCl₃, ppm, SiMe₄): 174,7 (s), 159,1 (s),
 10 153,6, 152,2, 150,2 (C2/C8), 145,8 (s, C15), 134 (s, C17), 132, 131,4, 130,9, 129,5, 126,8, 124,4
 (s, C16), 123,7, 29,1 (s, -CH₂-Ph), 29,0 (s, 19C), 24,5 (s, 20,21C), 24,3 (s, 20,21C).

(2-fluoro-6-benzylaminopurin-9-ato)-[1,3-bis(2,6-diisopropylfenyl)imidazol-2-yliden]zlatný
 komplex 3

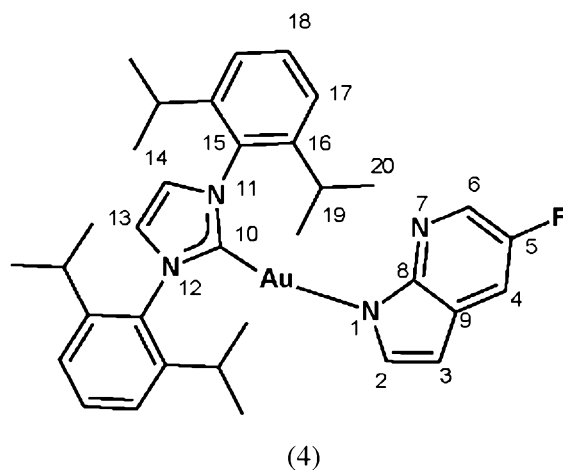
15



(3)

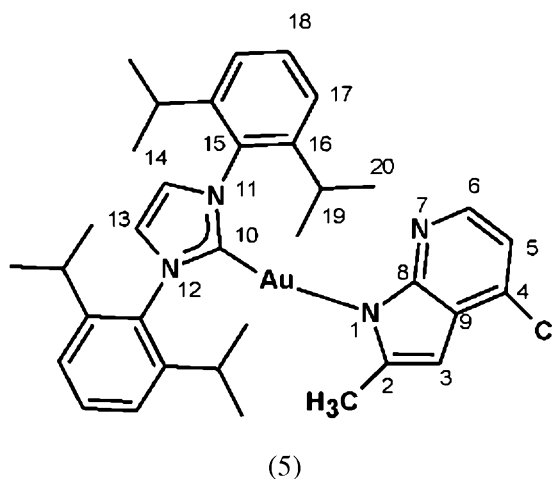
Výtěžek: 51 %, Elementární složení pro $C_{39}H_{45}AuFN_7$ vypočteno (nalezeno): C, 56,6 (56,3); H,
 20 5,5 (5,6); N, 11,8 (11,6)%. ESI+ MS (methanol, m/z): 828 (vyp 828) $[Au(NHC)L_3+H]^+$, 1413
 (vyp 1413) $[M_2(NHC)_2L_3]^+$. ESI- MS (methanol, m/z): 826 (vyp 826) $[Au(NHC)L-H]^-$. 1H NMR
 (CDCl₃ ppm, SiMe₄): 7,76 (C8H, 1H), 7,63 (NH), 7,54-7,49 (C18H, 2H), 7,55-7,40
 (C23H, C24H, 2H), 7,32-7,29 (C17H, 4H), 7,28 (C13H, C14H, 2H), 7,07 (C25H, 1H), 6,96-6,86
 (C23H, C24H, 2H), 4,79 (C21H, 2H), 2,57 (C19H, 4H), 1,36 (C20H, 12H), 1,25 (C20H, 12H).
 25 ^{19}F NMR (CDCl₃ ppm, externí CF₃CO₂H): -119. ^{13}C NMR (CDCl₃, ppm, SiMe₄): ^{13}C NMR
 (CDCl₃ ppm, SiMe₄): 172,6 (C10), 154,6 (C4), 152,2 (C8), 151,5 (C6), 145,6 (C16), 142,8
 (C22), 142,0 (C8), 133,6 (C15), 131,2 (C18), 129,2 (C25), 128,2 (C25), 124,5 (C17), 124,1
 (C23), 123,8 (C13, C14), 112,3 (C5), 37,9 (C21), 29,1 (C18), 24,7 (C20), 24,2 (C20).

30 (5-fluoro-7-azaindol-1-ato)-[1,3-bis(2,6-diisopropylfenyl)imidazol-2-yliden]zlatný komplex 4



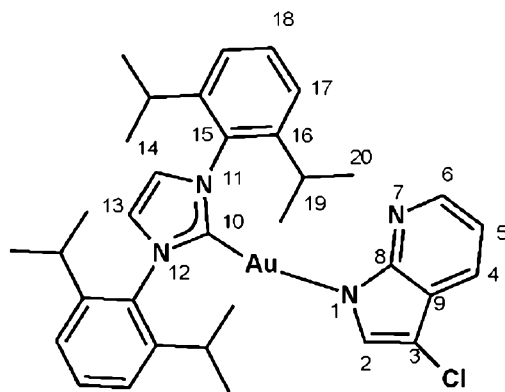
Výtěžek: 83 %, Elementární složení pro $C_{34}H_{40}AuFN_4$ vypočteno (nalezeno): C, 56,7 (56,3); H, 5,8 (6,0); N, 7,4 (7,0)%. ESI+ MS (methanol, m/z): 721 (vyp 721) $[Au(NHC)L_4+H]^+$. ESI- MS (methanol, m/z): 719 (vyp 719) $[Au(NHC)L_4-H]^-$. 1H NMR ($CDCl_3$, ppm, SiMe₄): 7,86-7,84 (C6H, 1H), 7,48 (C18H, 2H), 7,37 (C4H, 1H), 7,30-7,26 (C17H, 4H), 7,23 (C13H, C14H, 2H), 6,98 (C2H, 1H), 6,16 (C3H, 1H), 2,68 (C19H, 4H), 1,43 (d, C20H, 12H), 1,26 (C20H, 12H). ^{19}F NMR ($CDCl_3$, ppm, externí CF_3CO_2H): -144. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, ppm, SiMe₄): 177,4 (C10), 156,0 (C4), 145,8 (C16), 139,3 (C2), 134,3 (C15), 130,7 (C18), 129,1 (C6), 128,8 (C5), 124,3 (C17), 123,3 (C13, C14), 120,1 (C9), 111,3 (C4), 97,9 (C3), 29,1 (C19), 24,5 (C19), 24,2 (C20).

(2-methyl-4-chloro-7-azaindol-1-ato)-[1,3-bis(2,6-diisopropylfenyl)imidazol-2-yliden]zlatný komplex 5



Výtěžek: 54 %. Elementární složení pro: $C_{35}H_{42}AuClN_4$ vypočteno (nelezeno) %C 55,9 (55,8), %H 5,8 (5,9), %N 7,1 (6,9). ESI+ MS (methanol, m/z): 751 (vyp. 751) $[Au(NHC)L_5+H]^+$. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 1,25 (d, C20H, 12H), 1,41 (d, C20H, 12H), 1,97 (d, CH₃, 3H), 2,68 (sept, C19H, 4H), 5,97 (d, C3H, 1H), 6,66 (d, C6H, 1H), 7,23 (s, C13H, C14H, 2H), 7,30 (d, C17H, 4H), 7,49 (t, C4H, 1H) ppm. ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 17,3 (s, C20), 24,3 (s, C19, C20), 24,5 (s, C19, C20), 29,1 (s, C19), 94,8 (s, C3), 113,0 (s, C4), 121,0 (s, C9), 123,2 (s, C13, C14), 124,3 (s, C17), 130,7 (s, C5), 131,5 (s, C17), 134,4 (s, C18), 139,7 (s, C2), 145,9 (s, C15), 147,1 (s, C16), 157,9 (s, C4), 178,3 (s, C10) ppm.

(3-chloro-7-azaindol-1-ato)-[1,3-bis(2,6-diisopropylfenyl)imidazol-2-yliden]zlatný komplex 6



(6)

Výtěžek: 91 %. Elementární složení pro $C_{35}H_{40}AuClN_4$ vypočteno (nalezeno): %C 54,6 (55,0), %H 5,4 (5,5), %N 7,5 (7,1). ESI+ MS (methanol, m/z): 737 (vyp. 737) $[Au(NHC)L_6+H]^+$. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ 298 K): 1,25 (t, C20H, 12H), 1,42 (t, C20H, 12H), 2,66 (sept, C19H, 4H), 6,76 (dd, C2H, 1H), 6,82 (s, C6H, 1H), 7,22 (s, C13H, C14H, 2H), 7,29 (d, C17H, 4H), 7,48 (t, C18H, 2H), 7,68 (dd, C4H, 1H), 8,00 (dd, C5H, 1H) ppm. ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 24,3 (s, C20), 24,6 (s, C19), 29,1 (s, C19), 99,8 (s, C5), 113,8 (s, C4), 118,1 (s, C9), 123,3 (s, C13, C14), 124,2-124,3 (s, C17), 130,7 (s, C18), 133,3 (s, C15), 134,3 (s, C16), 141,8 (s, C2), 145,8 (s, C6), 154,6 (s, C3), 177,1 (s, C10) ppm.

Příklad 2: Molekulová struktura n-hexanového krystalosolvátu komplexu $[Au(NHC)(L_4)] \cdot n$ -Hex-**4-n-Hex** stanovená monokrystalovou rentgenovou strukturní analýzou.

Základní krystalografické parametry n-hexanového krystalosolvátu komplexu $[Au(NHC)(L_4)] \cdot n$ -Hex-**4-n-Hex**: mřížkové parametry: a (Å) 22.347(5), b (Å) 14.160(3), c (Å) 24.868(6), α (°) 90, β (°) 119.567(10), γ (°) 90, prostorová grupa: C2/c, teplota při experimentu: 120 K, vybrané strukturní parametry: vazebné délky Au-C1 = 2,002(3) Å, Au-N3 = 2,054(2) Å a velikost vazebného úhlu C1-Au-N3 = 175.43(10)°. (viz obrázek 3). Délky vazeb v krystalografii se konvenčně udávají v jednotkách Å, přičemž platí převodní vztah 1 Å = 10^{-10} m.

Příklad 3: *In vitro* cytotoxicita zlatných komplexů na vybraných lidských nádorových liniích.

Pro stanovení *in vitro* cytotoxicity studovaných komplexů $[Au(NHC)(L_1)]$ **1**, $[Au(NHC)(L_2)]$ **2**, $[Au(NHC)(L_3)]$ **3**, $[Au(NHC)(L_4)]$ **4** a *cisplatinu* byl využit výše popsáný MTT test (HL_1 = 6-[(2-fluorofenyl)sulfanyl]-9H-purin; HL_2 = 6-[(2-trifluoromethylfenyl)sulfanyl]-9H-purin; HL_3 = 2-fluoro-6-benzylamino-9H-purin; HL_4 = 5-fluoro-7-azaindol). Hodnoty *in vitro* protinádorové aktivity studovaných komplexů a *cisplatinu*, jako zvoleného standardu, vyjádřené v průměrných hodnotách inhibiční koncentrace $IC_{50} \pm S.D.$ (μM) jsou uvedené v Tabulce 1.

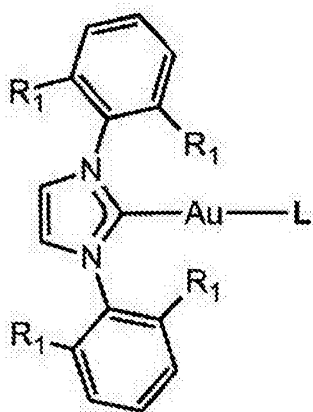
Tabulka 1: Výsledky *in vitro* cytotoxicity připravených komplexů **1** až **4** vůči vybraným lidským nádorovým liniím a lidským hepatocytům a jejich srovnání s léčivem *cisplatinou* vyjádřené v hodnotách inhibiční koncentrace $IC_{50} \pm S.D.$ (μM)

Komplex	$IC_{50} \pm S.D. (MM)$			
	A2780	A2780R	HOS	Hep220
$[Au(NHC)(L_1)]$ 1	3.2 ± 0.7	7.4 ± 2.3	6.2 ± 1.1	> 50
$[Au(NHC)(L_2)]$ 2	6.4 ± 1.9	5.5 ± 2.4	8.6 ± 0.5	> 50
$[Au(NHC)(L_3)]$ 3	13.3 ± 2.5	7.8 ± 0.5	8.7 ± 0.7	> 20
$[Au(NHC)(L_4)]$ 4	1.8 ± 0.2	3.4 ± 0.7	9.2 ± 1.6	> 50
<i>cisplatina</i>	20.1 ± 0.3	45.7 ± 3.3	47.4 ± 1.3	> 50

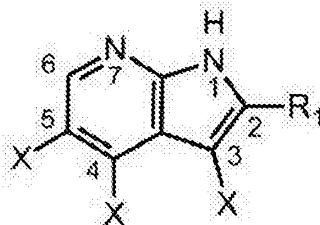
A2780 = karcinom vaječníků; A2780R = karcinom vaječníků resistantní vůči *cisplatině*; HOS = osteosarkom; HEP220 = primární kultura lidských hepatocytů; Toxicita vůči HEP220 byla testována jen do uvedené koncentrace v důsledku omezené rozpustnosti komplexů. S.D. = směrodatná odchylka

PATENTOVÉ NÁROKY

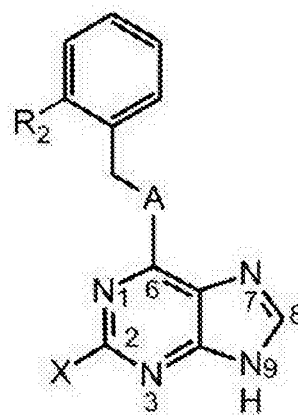
1. N-heterocyklické karbenové -NHC- komplexy zlata v oxidačním stupni +I s deprotonizovanými bicyckými monodentátními *N*-donorovými ligandy obecného složení [Au(NHC)(L)] I, vyjádřeného strukturním vzorcem II, kde symbol L představuje derivát N1-deprotonizovaného 7-azaindolu strukturního vzorce III vázaný na atom zlata přes atom dusíku N1 nebo derivát N9-deprotonizovaného 9*H*-purinu strukturního vzorce IV vázaný na atom zlata přes atom dusíku N9,



(II)



(III)



(IV)

kde:

- skupina X představuje atom vodíku nebo atom halogenu vybraný ze skupiny fluor, chlor, brom, jód,
- skupina A představuje atom síry nebo skupinu NH
- substituent R1 je atom vodíku nebo rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec tvořený z 1 až 6 atomů uhlíku,
- substituent R2 je atom vodíku nebo atom halogenu nebo methylová skupina nebo trifluoromethylová skupina,
- a krystalosolváty komplexů zlata strukturního vzorce II, jejichž složení vyjadřuje vzorec [Au(NHC)(L)]·*nSolv* v němž jsou
- L a NHC definovány výše,
- *n* udává počet krystalosolvátových molekul, který je 1 až 2, a
- *Solv* je organická molekula, vybraná ze skupiny voda, primární alkohol, sekundární alkohol, hexan, aceton, *N,N*-dimethylformamid, dimethylsulfoxid, ethylacetát, dichlormethan, acetonitril nebo diethylether, a to buď samostatně, nebo v kombinaci uvedených solvátových molekul.

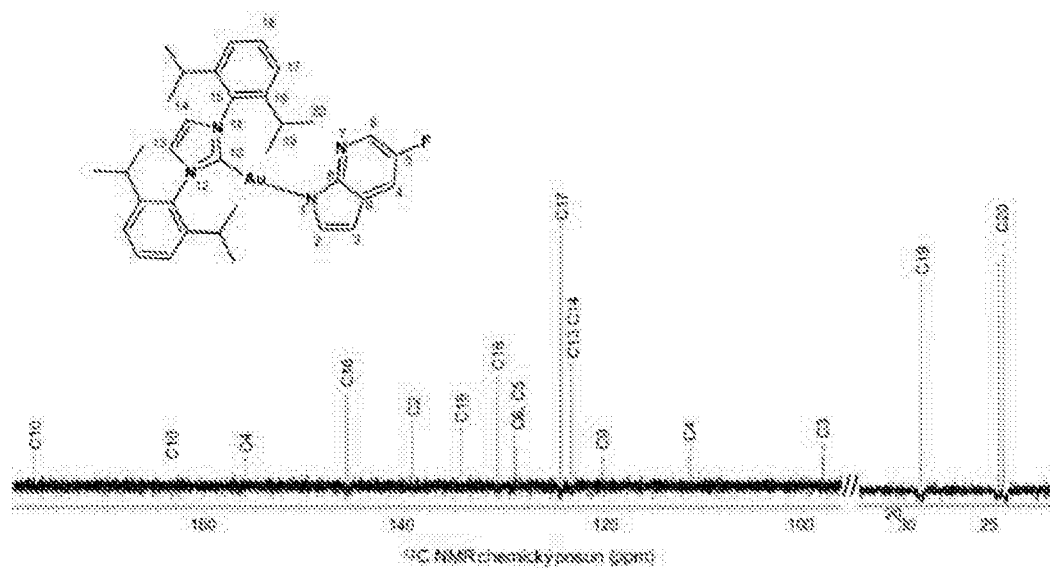
2. Farmakologický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje terapeuticky účinné množství komplexů zlata strukturního vzorce II podle nároku 1 nebo jejich krystalosolvátů s jedním nebo více přijatelnými nosiči a pomocnými látkami.

3. Farmakologický prostředek podle nároku 2 pro použití v lékařství.

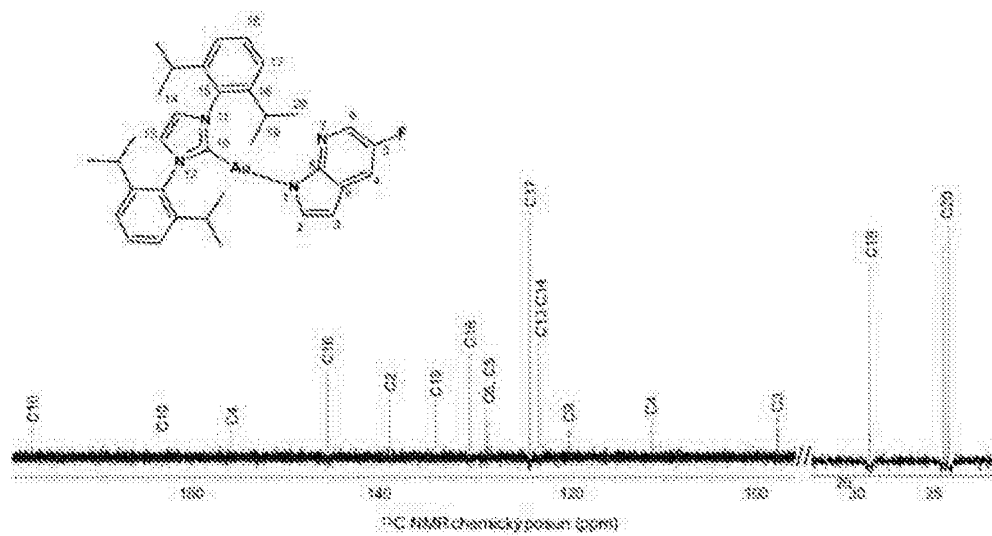
4. Použití farmakologického prostředku podle nároku 3 pro výrobu léčiv pro léčení nádorových onemocnění, zejména pro léčení karcinomu vaječníků a/nebo karcinomu vaječníků rezistentnímu vůči *cisplatině* a/nebo lidského osteosarkomu.

5

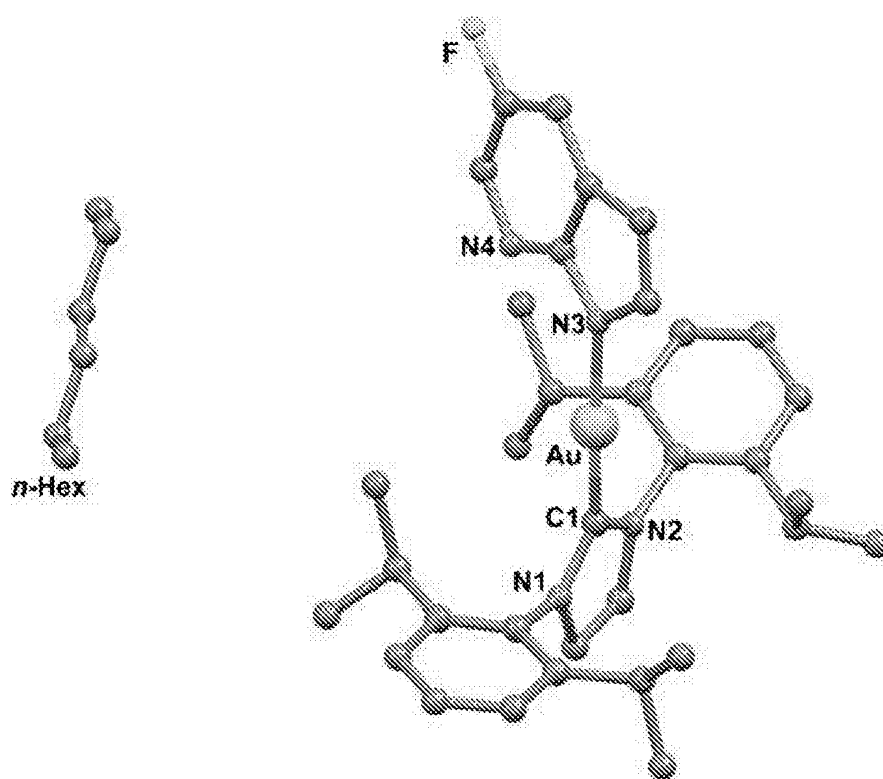
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3