

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 305 624

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C07D 487/04* (2006.01)  
*C07F 9/535* (2006.01)  
*C07F 1/12* (2006.01)  
*A61K 31/519* (2006.01)  
*A61K 31/555* (2006.01)  
*A61K 33/42* (2006.01)  
*A61K 33/24* (2006.01)  
*A61P 29/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/04* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLVÉHO  
VLASTNICTVÍ

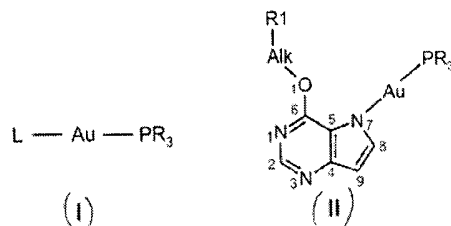
(21) Číslo přihlášky: **2014-258**  
 (22) Přihlášeno: **15.04.2014**  
 (40) Zveřejněno: **29.10.2015**  
**(Věstník č. 43/2015)**  
 (47) Uděleno: **02.12.2015**  
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **13.01.2016**  
**(Věstník č. 2/2016)**

(56) Relevantní dokumenty:  
 Rubbiani R. et al.: ChemMedChem 2014, 9 (6); Rosopulos Y. et al.: Chemische Berichte 1985, 118 (3).  
 CZ 303 649; EP 0 191 624.

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

(72) Původce:  
 prof. RNDr. Zdeněk Trávníček, Ph.D., Štěpánov, CZ  
 RNDr. Jana Gálíková, Ph.D., Martin- Priekopa, SK  
 RNDr. Jan Hošek, Ph.D., Brno, CZ  
 PharmDr. Ján Vančo, Ph.D., Heršpice, CZ

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



(54) Název vynálezu:  
**Komplexy zlata s ω-substituovanými deriváty 6-alkyloxy-9-deazapurinů a deriváty fosfanu a použití těchto komplexů pro přípravu léčiv k terapii zánětlivých a nádorových onemocnění**

(57) Anotace:  
 Komplexy zlata v oxidačním stavu (+I) s ω-substituovanými deriváty 6-alkyloxy-9-deazapurinu a deriváty fosfanu, a jejich krystalosolváty, obecného vzorce I a II, kde substituent R1 je vybrán ze skupiny atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, alkenyl, substituovaný alkenyl, alkynyl, substituovaný alkynyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl, substituovaný cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, substituovaný cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl, substituovaný cykloheteroalkenyl, aryl, heteroaryl. Komplexy jsou určeny pro použití v lékařství pro výrobu léčiv pro léčení zánětlivých a/nebo nádorových onemocnění, zejména pro léčení adenokarcinomu prsu a/nebo osteosarkomu a/nebo karcinomu plic a/nebo maligního melanomu a/nebo karcinomu děložního čípku a/nebo karcinomu vaječníků a/nebo karcinomu vaječníků rezistentnímu vůči *cisplatině* a/nebo karcinomu prostaty.

CZ 305624 B6

# Komplexy zlata s $\omega$ -substituovanými deriváty 6-alkyloxy-9-deazapurinů a deriváty fosfanu a použití těchto komplexů pro přípravu léčiv k terapii zánětlivých a nádorových onemocnění

5

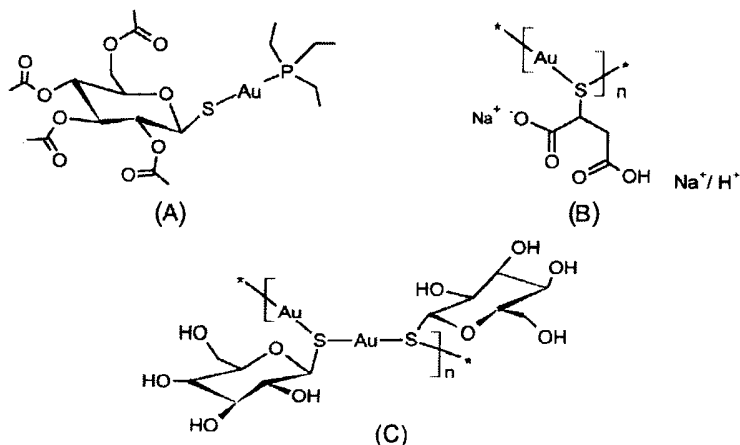
## Oblast techniky

Předložený vynález se týká zlatných komplexů s  $\omega$ -substituovanými deriváty 6-alkyloxy-9-deazapurinu a deriváty fosfanu a jejich použití pro přípravu léčiv k terapii zánětlivých onemocnění a nádorových onemocnění, konkrétně pak k léčbě adenokarcinomu prsu, osteosarkomu, karcinomu plic, maligního melanomu, karcinomu děložního čípku, karcinomu vaječníků, karcinomu vaječníků rezistentnímu vůči *cisplatině* a/nebo karcinomu prostaty.

15

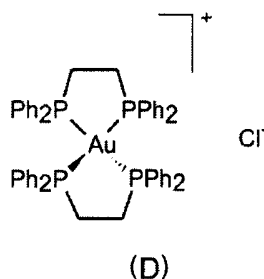
## Dosavadní stav techniky

Předložené komplexy zlata v oxidačním stavu (+) můžeme zařadit do skupiny elektroneutrálních sloučenin zlata(I), které jsou strukturně blízké komerčně používanému léčivu v protizánětlivé terapii Auranofinu, a to přítomností derivátu fosfanu, koordinovaného na centrální atom zlata v oxidačním stupni (+I). Syntéza Auranofinu, 3,4,5-triacetyloxy-6-(acetyloxymethyl)-oxan-2-thiolátotriethylfosfan)-zlatný komplex (vzorec A), je popsána v patentech US4200738, US4115642, US4125711, US4125710, US4122254, US4133952 nebo US4131732, zatímco jsou terapeutické využití je popsáno v patentovém spise WO2010091381. Mezi další světově používaná protizánětlivá léčiva na bázi zlata v oxidačním stupni (+I) patří sodná sůl 2-merkaptobutan-2,3-diolát-zlatného komplexu (natrium-aurothiomalát, vzorec B) a polymerní komplex ((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-oxan-2-thiolát)zlatný (aurothioglukosa, vzorec C).



Výše uvedená protizánětlivá léčiva na bázi zlata se vyznačují přítomností přes atom síry se koordinujícího ligandu v molekule, nebo jeho kombinací s derivátem fosfanu, koordinujícím se přes atom fosforu, jako je tomu v případě Auranofinu. V aktuálním patentovém dokumentu CZ 303 649 a publikaci Z. Trávníček et al. *J. Med. Chem.* 55, 2012, 4568 bylo prokázáno, že vysokou protizánětlivou aktivitu vykazují tak zlatné komplexy s deriváty 6-benzylamino(purinu) a deriváty fosfanu. Naproti tomu bylo v publikaci J. Hošek et al. *PlosONE* 8, 2013, e82441 prokázáno, že i malá modifikace struktury takového *N*-donorového ligandu může vést k zásadní modifikaci protizánětlivé aktivity nebo až k jejímu vymizení. Také z tohoto důvodu není dosud možné ve skupině zlatných komplexů definovat jak kvalitativní, tak kvantitativní vztahy mezi strukturou a protizánětlivou aktivitou, nelze tedy v obecné rovině predikovat, že komplexy splňující výše uvedené strukturní motivy budou vykazovat protizánětlivé účinky.

Auranofin, kromě protizánětlivých účinků, taktéž projevuje *in vitro* cytotoxicitu a *in vivo* antitumorovou aktivitu vůči leukemickým buňkám myši buněčné linie P388, *in vitro* cytotoxicitu vůči melanomu B16, jak je popsáno v publikaci C. K. Mirabelli et al. *Cancer Res.* 45, 1985, 32, a vůči nádorovým buněčným liniím děložního čípku HeLa, viz publikace T. M. Simon et al. *Cancer* 44, 1979, 1965. Aplikací Auranofinu a jeho analogů pro léčbu nádorových onemocnění se zabývá také patentový spis WO2012142615. Tyto poznatky vedly k dalšímu studiu *in vitro* cytotoxické aktivity a *in vivo* antitumorové aktivity u analogů Auranofinu (C. K. Mirabelli et al. *J. Med. Chem.* 29, 1986, 218), jako i u dalších lineárních komplexů Au(I) s deriváty fosfanu zahrnující *S*-donorové ligandy jako thionukleobáze a dithiokarbamáty (E. R. T. Tiekink *Inflammopharmacology* 16, 2008, 138; E. R. T. Tiekink *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 2002, 225), arylsulfanylpropenoáty (E. Barreiro, *J. Inorg. Biochem.* 102, 2008, 184), deriváty azakumarinu (J. S. Casas et al. *Inorg. Chem.* 46, 2007, 6236), naftalimidu (I. Ott et al. *J. Med. Chem.* 52, 2009, 763) a 2-methyl-1,4-naftochinonu (J. S. Casas et al. *J. Inorg. Biochem.* 100, 2006, 1858). Další skupinou protinádorově působících komplexních sloučenin zlata(I) s deriváty fosfanu představují komplexy zlata s chelátově vázaným difosfanem, např. chlorid-bis{ethan-1,2-diylbis(difenylofosfan)} zlatný(I), ([Au(dppe)<sub>2</sub>]Cl, vzorec D) a celá řada jeho analogů.



Práce (S. J. Berners-Price et al. *Cancer Res.* 46, 1986, 5486) poukázala na signifikantní *in vivo* antitumorovou aktivitu komplexu [Au(dppe)<sub>2</sub>]Cl vůči různým modelům rakoviny u myši, což vedlo k dalšímu studiu cytotoxicity a antitumorové aktivity u podobných systémů (C. K. Mirabelli et al. *J. Med. Chem.* 30, 1987, 2181; S. J. Berners-Price et al. *Inorg. Chem.* 26, 1987, 3074; S. J. Berners-Price et al. *Struct. Bonding (Berlin)* 70, 1988, 27; S. J. Berners-Price et al. *J. Med. Chem.* 33, 1990, 1386).

V některých případech bylo zjištěno, že komplexy zlata(I) a fosfanu vykazují cytotoxicitu vůči rakovinovým buněčným liniím, které jsou rezistentní k *cisplatině*, jak je popsáno např. v publikaci C. Marzano et al. *Free Radical Biol. Med.* 42, 2007, 872; E. Viry et al. *Chem. Med. Chem.* 3, 2008, 1667; J. J. Liu et al. *J. Inorg. Biochem.* 102, 2008, 303.

Další skupinu protinádorově aktivních zlatných komplexů jsou komplexy s kombinací heterocyklického *N*-donorového ligandu a derivátu fosfanu. Například v publikacích R. Gallassi et al. *Dalton Trans.* 41, 2012, 5307; M. Serratrice et al. *Inorg. Chem.* 51, 2012, 3161 a C. Abbehausen et al. *Inorg. Chem.* 52, 2013, 11280 byly popsány zlatné komplexy s deriváty pyrazolu, imidazolu a dalšími heterocyklickými ligandy a jejich *in vitro* cytotoxicita vůči lidským rakovinným buněčným liniím, jako jsou prsní karcinom MCF7, plicní adenokarcinom A549, karcinom hrubého střeva LoVo a LoVo MDR, karcinom vaječníku 2008 a C13<sup>+</sup>. Publikace N. A. Illán-Cabeza et al. *Eur. J. Med. Chem.* 64, 2013, 260 popisuje *in vivo* antitumorovou aktivitu komplexu [Au(MANUH-1)PPh<sub>3</sub>], kde MANUH představuje 6-amino-1-methyl-5-nitrosouracil, na modelu C6 gliomu. Z výše uvedeného přehledu vyplývá, že stejně jako v případě protizánětlivé aktivity, ani v případě protinádorové aktivity není dosud možné ve skupině zlatných komplexů definovat jak kvalitativní, tak kvantitativní vztahy mezi strukturou a antitumorovou aktivitou.

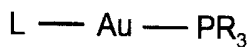
Předložené komplexy zlata v oxidačním stavu (+I) s  $\omega$ -substituovanými deriváty 6-alkyloxy-9-deazapurinu a s deriváty fosfanu představují zcela novou, v literatuře doposud nepopsanou, sku-

pinu biologicky aktivních komplexů zlata, které ve své struktuře obsahují molekulu 9-deazahypoxanthinu a/nebo jeho derivátu.

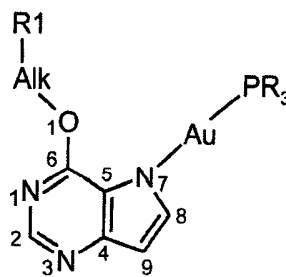
- Příprava 9-deazahypoxantinu a jeho různých derivátů je popsána v publikacích O.S. Sizova et al. *Pharm. Chem. J.* 16, 1982, 834; L. V. Éktova et al. *Pharm. Chem. J.* 22, 1988, 572; O. S. Sizova et al. *Pharm. Chem. J.* 18, 1984, 567; R. G. Glushkov et al. *Pharm. Chem. J.* 20, 1986, 415; V. P. Kamath et al. *Org. Process Res. Dev.* 13, 2009, 928; R. Novotná et al. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* C69, 2013, 928; R. Novotná et al. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* C69, 2013, 158 a v patentovém dokumentu EP 2532667. C9-substituované deriváty 9-deazahypoxantinu patří do skupiny inhibitorů purin nukleosid fosforylasy (PNP-inhibitory), které představují novou skupinu potenciálních selektivních imunosupresiv na léčbu autoimunitních a lymfoproliferativních nádorových onemocnění (Bantia et al. *Int. Immunopharmacol.* 1, 2001, 1199). Zástupci této skupiny organických látek immucillin-H (BCX-1777, 7-[2*S*,3*S*,4*R*,5*R*]-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-pyrrolidin-2-yl]-1,5-dihydropyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on) a DADMe-immucillin-H (BCX-4208, 7-{[3*R*,4*R*]-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)pyrrolidin-1-yl}methyl}-1,5-dihydro-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on) jsou v současné době ve fázi klinických testů na pacientech trpících nádorovým onemocněním lymfatického systému, viz publikace K. Clinch et al. *J. Med. Chem.* 52, 2009, 1162; T. Robak et al. *Molecules*, 14, 2009, 1183; T. Robak et al. *Curr. Pharm. Des.*, 18, 2012, 3373; K. Balakrishnan et al. *Blood*, 116, 2010, 886. Předložené komplexy zlata obsahují ve své struktuře  $\omega$ -substituované deriváty 6-alkyloxy-9-deazapurinu. Příprava  $\omega$ -substituovaných derivátů 6-alkyloxy-9-deazapurinu je popsána ve spise WO 2009082247 jako i v publikaci V. P. Kamath et al. *Org. Process Res. Dev.* 13, 2009, 928.

#### Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou komplexy zlata v oxidačním stavu (+I) s  $\omega$ -substituovanými deriváty 6-alkyloxy-9-deazapurinu a deriváty fosfanu, a jejich krystalosolváty, zahrnující strukturní motiv I obecného vzorce [Au(L)(PR<sub>3</sub>)] a vyjádřené strukturním vzorcem II,



(I)



(II)

kde

- symbol L představuje deprotonovaný  $\omega$ -substituovaný derivát 6-alkyloxy-9-deazapurinu vázaný na atom zlata přes atom dusíku N7,
- PR<sub>3</sub> je derivát fosfanu,
- substituenty R jsou nezávisle vybrány ze skupiny alkyl, cykloalkyl, substituovaný alkyl, substituovaný cykloalkyl, aryl, nebo heteroaryl, a/nebo jejich libovolné kombinace,
- skupina Alk představuje alkyl nebo substituovaný alkyl, který je na  $\omega$ -uhlíku substituován skupinou R1,
- příčemž
- substituent R1 je vybrán ze skupiny atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, alkenyl, substituovaný alkenyl, alkynyl, substituovaný alkynyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cyklohetero-

roalkyl, substituovaný cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, substituovaný cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl, substituovaný cykloheteroalkenyl, aryl, heteroaryl,

kde termín:

– *alkyl*

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

– *alkenyl*

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

10 – *alkynyl*

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

– *cykloalkyl*

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

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

20 – *cykloalkenyl* představuje cykloalkyl obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku,

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

25 – *substituovaný alkyl*, *substituovaný alkenyl*, *substituovaný cykloalkyl*, *substituovaný cykloheteroalkyl*, *substituovaný cykloalkenyl*, *substituovaný cykloheteroalkenyl* představují alkyl, alkenyl, alkynyl, cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl substituované substituenty z množiny halogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl a funkční skupina,

– *aryl* představuje fenyl,

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

Také jsou podstatou vynálezu krystalosolváty komplexů zlata vzorce (II), kde u sloučenin obecného složení  $[\text{Au}(\text{L})(\text{PR}_3)] \cdot n\text{Solv}$  jsou

– L a  $\text{PR}_3$  definovány v nároku 1,

35 – *n* udává počet krystalosolvátových molekul, především 1 až 6, a

– *Solv* představuje molekulu použitého rozpouštědla a/nebo jednu z reakčních komponent, vybranou ze skupiny voda, primární alkohol, sekundární alkohol, aceton, *N,N'*-dimethylformamid, dimethylsulfoxid, chloroform, dichlormethan, acetonitril nebo diethylether, a to buď samostatně nebo v kombinaci uvedených solvátových molekul.

40

Nedílnou součástí vynálezu je farmakologický prostředek obsahující terapeuticky účinné množství zlatných komplexů 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, zejména pro použití pro výrobu léčiv pro léčení zánětlivých a/nebo nádorových onemocnění, zejména pro léčení adenokarcinomu prsu a/nebo osteosarkomu a/nebo karcinomu plic a/nebo maligního melanomu a/nebo karcinomu děložního čípku a/nebo karcinomu vaječníků a/nebo karcinomu vaječníků rezistentnímu vůči *cisplatině* a/nebo karcinomu prostaty.

50

Objasnění výkresů

Konkrétní příklady provedení vynálezu jsou doloženy připojenými výkresy, kde:

- 5 – Obr. 1 je  $^1\text{H}$  NMR spektrum komplexu  $[\text{Au}(\text{L}^1)(\text{PPh}_3)]$  (1) ( $\text{HL}^1 = 6\text{-(ethoxy)-9-deazapurin}$ ) rozpuštěného v  $\text{DMF-}d_7$ .
- Obr. 2 je  $^1\text{H}$  NMR spektrum komplexu  $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$  (2) ( $\text{HL}^2 = 6\text{-(isopropoxy)-9-deazapurin}$ ) rozpuštěného v  $\text{DMF-}d_7$ .
- Obr. 3 je  $^1\text{H}$  NMR spektrum komplexu  $[\text{Au}(\text{L}^3)(\text{PPh}_3)]$  (3) ( $\text{HL}^3 = 6\text{-(tetrahydrofuran-2-ylmethoxy)-9-deazapurin}$ ) rozpuštěného v  $\text{DMF-}d_7$ .
- 10 – Obr. 4 je  $^1\text{H}$  NMR spektrum komplexu  $[\text{Au}(\text{L}^4)(\text{PPh}_3)]$  (4) ( $\text{HL}^4 = 6\text{-(benzyloxy)-9-deazapurin}$ ) rozpuštěného v  $\text{DMF-}d_7$ .
- Obr. 5 je  $^1\text{H}$  NMR spektrum komplexu  $[\text{Au}(\text{L}^5)(\text{PPh}_3)]$  (5) ( $\text{HL}^5 = 6\text{-(fenethyloxy)-9-deazapurin}$ ) rozpuštěného v  $\text{DMF-}d_7$ .
- 15 – Obr. 6 je  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  gs-HMQC NMR spektrum komplexu  $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$  (2) ( $\text{HL}^2 = 6\text{-(isopropoxy)-9-deazapurin}$ ) rozpuštěného v  $\text{DMF-}d_7$ .
- Obr. 7 je molekulová struktura komplexu  $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$  (2) kde  $\text{HL}^2 = 6\text{-(isopropoxy)-9-deazapurin}$ .
- Obr. 8 je graf *in vitro* protizánětlivé aktivity komplexů  $[\text{Au}(\text{L}^1)(\text{PPh}_3)]$  (1),  $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$  (2),  $[\text{Au}(\text{L}^3)(\text{PPh}_3)]$  (3),  $[\text{Au}(\text{L}^4)(\text{PPh}_3)]$  (4) a  $[\text{Au}(\text{L}^5)(\text{PPh}_3)]$  (5) ukazující na snížení sekrece prozánětlivého cytokinu  $\text{TNF-}\alpha$  a jejich srovnání s Auranofinem a vehikulem (maximální odpověď buněk na zánětlivý stimul (LPS)),  $\text{HL}^1 = 6\text{-(ethoxy)-9-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^2 = 6\text{-(isopropoxy)-9-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^3 = 6\text{-(tetrahydrofuran-2-ylmethoxy)-9-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^4 = 6\text{-(benzyloxy)-9-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^5 = 6\text{-(fenethyloxy)-9-deazapurin}$ , \*\*\* signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ( $p < 0,001$ )
- 20 – Obr. 9 je graf *in vitro* protizánětlivé aktivity komplexů  $[\text{Au}(\text{L}^1)(\text{PPh}_3)]$  (1),  $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$  (2),  $[\text{Au}(\text{L}^3)(\text{PPh}_3)]$  (3),  $[\text{Au}(\text{L}^4)(\text{PPh}_3)]$  (4) a  $[\text{Au}(\text{L}^5)(\text{PPh}_3)]$  (5) ukazující snížení sekrece prozánětlivého cytokinu  $\text{IL-1}\beta$  a jejich srovnání s Auranofinem a vehikulem (maximální odpověď buněk na zánětlivý stimul (LPS)),  $\text{HL}^1 = 6\text{-(ethoxy)-9-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^2 = 6\text{-(isopropoxy)-9-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^3 = 6\text{-(tetrahydrofuran-2-ylmethoxy)-9-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^4 = 6\text{-(benzyloxy)-9-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^5 = 6\text{-(fenethyloxy)-9-deazapurin}$ , \*\*\* signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ( $p < 0,001$ ), \*\*\* signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ( $p < 0,001$ ), ### signifikantní rozdíl v porovnání s Auranofinem ( $p < 0,001$ )
- 25 – Obr. 10 je graf *in vitro* protizánětlivé aktivity komplexů  $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$  (2) a  $[\text{Au}(\text{L}^5)(\text{PPh}_3)]$  (5) ukazující ovlivnění transkripce genů prozánětlivého cytokinu  $\text{TNF-}\alpha$  a jejich srovnání s Auranofinem a vehikulem (maximální odpověď buněk na zánětlivý stimul (LPS)),  $\text{HL}^2 = 6\text{-(isopropoxy)-9-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^5 = 6\text{-(fenethyloxy)-9-deazapurin}$ , \* signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ( $p < 0,05$ ), \*\* signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ( $p < 0,01$ )
- 30 – Obr. 11 je graf *in vitro* protizánětlivé aktivity komplexů  $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$  (2) a  $[\text{Au}(\text{L}^5)(\text{PPh}_3)]$  (5) ukazující ovlivnění transkripce genů prozánětlivého cytokinu  $\text{IL-1}\beta$  a jejich srovnání s Auranofinem a vehikulem (maximální odpověď buněk na zánětlivý stimul (LPS)),  $\text{HL}^2 = 6\text{-(isopropoxy)-9-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^5 = 6\text{-(fenethyloxy)-9-deazapurin}$ , \* signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ( $p < 0,05$ ), \*\* signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ( $p < 0,01$ ), \*\*\* signifikantní rozdíl v porovnání s vehikulem ( $p < 0,001$ )

45

Příklady uskutečnění 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 instrumentálními metodami:

- elementární analýza se stanovením procentuálního zastoupení uhlíku, vodíku a dusíku (CHN(O)S analyzátor Flash 2000, Thermo Scientific),
- 1D a 2D nukleární magnetická rezonance –  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  gs–COSY,  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  gs–HMQC,  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  gs–HMBC experimenty (400 MHz NMR spektrometr, Varian),
- monokrystalová rentgenová strukturní analýza (difraktometr Xcalibur2+CCD detektor Sapphire2, Oxford Diffraction).

Pro určení *in vitro* protizánětlivého potenciálu testovaných komplexů zlata(I) byly použity makrofágům podobné buňky odvozené z lidské buněčné linie THP–1. Buňky THP–1 byly kultivovány v plastových lahvích s RPMI 1640 médiem suplementovaným 2mm L–glutaminem, 10% fetálním bovinním sérem, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100  $\mu\text{g/ml}$ ) (tzv. kompletní medium) při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5%  $\text{CO}_2$ . Za účelem diferenciacce byla připravena buněčná suspenze  $5 \times 10^5$  buněk/ml. Tato buněčná suspenze byla rozpipetována po 100  $\mu\text{l}$  do 96–ti jamkové mikrotitrační destičky. Diferenciace byla zpuštěna přidáním 1  $\mu\text{l}$  5  $\mu\text{g/ml}$  12–*O*–tetradekanoyl–forbol–13–acetátu rozpuštěného v 5% DMSO v RPMI 1640 mediu. Buňky byly poté inkubovány 24 hodin při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5%  $\text{CO}_2$ . Diferenciované buňky adhezovaly na dno kultivační láhve. Medium s nediferencovanými buňkami bylo odsáto a nahrazeno čerstvým kompletním RPMI 1640 médiem bez 12–*O*–tetradekanoyl–forbol–13–acetátu. Buňky byly kultivovány dalších 24 hodin. Poté bylo odsáto kultivační medium, buňky byly promyty fosfátovým pufrem (pH=7,4) a bylo k nim přidáno 100  $\mu\text{l}$  kompletního kultivačního media bez bovinního séra; takto byly buňky inkubovány dalších 24 hodin. Takto připravené makrofágům podobné buňky byly použity na stanovení protizánětlivé aktivity testovaných komplexů.

Protizánětlivá aktivita byla testována na několika úrovních. První úroveň bylo stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na sekreci prozánětlivých cytokinů TNF– $\alpha$  a IL–1 $\beta$ . K diferencovaným buňkám v 96jamkové mikrotitrační destičce (objem media 100  $\mu\text{l}$  na jamku) bylo přidáno 1  $\mu\text{l}$  30  $\mu\text{M}$  roztoku testovaných látek rozpuštěných v 10% (w/w) DMSO v RPMI 1640 mediu. Buňky byly s testovanými látkami preinkubovány hodinu. Následně byl k buňkám přidán 1  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{g/ml}$  lipopolysacharidu (LPS) z *Escherichia coli* 0111:B4 rozpuštěným v RPMI 1640 mediu, který simuluje zánětlivou reakci aktivací TLR–4 receptoru, a buňky byly dále inkubovány 24 hodin při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5%  $\text{CO}_2$ . Po této inkubaci bylo odebráno kultivační médium, ve kterém se po centrifugaci stanovil obsah prozánětlivých cytokinů TNF– $\alpha$  a IL–1 $\beta$  metodou ELISA (Enzyme–Linked ImmunoSorbent Assay).

Příklad 1: Příprava a charakterizace zlatných komplexů s  $\omega$ –substituovanými deriváty 6–alkyloxy–9–deazapurinu a trifenyfosfanu.

Předložené komplexy zlata v oxidačním čísle (+I) s  $\omega$ –substituovanými deriváty 6–alkyloxy–9–deazapurinu a trifenyfosfanem byly připraveny mírnou modifikací postupu syntézy popsané v patentovém spisu CZ 303 649 a v publikaci Z. Trávníček et al. *J. Med. Chem.* 55, 2012, 4568. Výchozí látky pro syntézu byly komerčně dostupné nebo byly připravené postupy uvedenými v publikacích O. S. Sizova et al. *Pharm. Chem. J.* 16, 1982, 834; L. V. Éktova et al. *Pharm. Chem. J.* 22, 1988, 572; O. S. Sizova et al. *Pharm. Chem. J.* 18, 1984, 567; R. G. Glushkov et al. *Pharm. Chem. J.* 20, 1986, 415; V. P. Kamath et al. *Org. Process Res. Dev.* 13, 2009, 928; R. Novotná et al. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* C69, 2013, 158 a nebo v patentovém spisu EP 2532667.

[Au(L<sup>1</sup>)(PPh<sup>3</sup>)] (1): Prvkové složení pro C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>OPAu vypočteno (nalezeno): C, 50,2 (50,3); H, 3,7 (3,8); N, 6,8 (6,3)%. <sup>1</sup>H NMR (DMF-*d*<sub>7</sub>, ppm, SiMe<sub>4</sub>): 8,28 (s, C2H, 1H), 7,78 (m, C21H, C25H, C31H, C35H, C41H, C45H, 6H, PPh<sub>3</sub>), 7,71 (m, C22H, C23H, C24H, C32H, C33H, C34H, C42H, C43H, C44H, 9H, PPh<sub>3</sub>), 7,64 (m, C8H, 1H), 6,54 (m, C9H, 1H), 4,54 (q, 6,8, C10H, 2H), 1,17 (t, 6,8, C11H, 3H). <sup>13</sup>C NMR (DMF-*d*<sub>7</sub>, ppm, SiMe<sub>4</sub>): 156,66 (C6), 152,16 (C4), 147,42 (C2), 140,47 (C8), 134,67, 134,53 (C21, C25, C31, C35, C41, C45, PPh<sub>3</sub>), 132,65, 132,67, (C22, C24, C32, C34, C42, C44, PPh<sub>3</sub>), 130,06, 129,94, (C23, C33, C43, PPh<sub>3</sub>), 129,75, (C20, C30, C40, PPh<sub>3</sub>), 122,67 (C5), 101,32 (C9), 61,43 (C10), 14,68 (C11).

[Au(L<sup>2</sup>)(PPh<sup>3</sup>)] (2): Prvkové složení pro C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>OPAu vypočteno (nalezeno): C, 51,0 (50,9); H, 4,0 (4,0); N, 6,6 (6,4)%. <sup>1</sup>H NMR (DMF-*d*<sub>7</sub>, ppm, SiMe<sub>4</sub>): 8,27 (s, C2H, 1H), 7,80 (m, C21H, C25H, C31H, C35H, C41H, C45H, 6H, PPh<sub>3</sub>), 7,71 (m, C22H, C23H, C24H, C32H, C33H, C34H, C42H, C43H, C44H, 9H, PPh<sub>3</sub>), 7,64 (d, 2,3, C8H, 1H), 6,54 (m, 2,3 C9H, 1H), 5,56 (m, C10H, 1H), 1,15 (d, 5,9, C11H, C12H, 6H). <sup>13</sup>C NMR (DMF-*d*<sub>7</sub>, ppm, SiMe<sub>4</sub>): 156,40 (C6), 152,17 (C4), 147,45 (C2), 140,36 (C8), 134,73, 134,60 (C21, C25, C31, C35, C41, C45, PPh<sub>3</sub>), 132,67, 132,65, (C22, C24, C32, C34, C42, C44, PPh<sub>3</sub>), 130,08, 129,96, (C23, C33, C43, PPh<sub>3</sub>), 129,76, (C20, C30, C40, PPh<sub>3</sub>), 123,14 (C5), 101,32 (C9), 68,06 (C10), 22,01 (C11, C12).

[Au(L<sup>3</sup>)(PPh<sup>3</sup>)] (3): Prvkové složení pro C<sub>29</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>PAu vypočteno (nalezeno): C, 50,2 (50,3); H, 3,7 (3,8); N, 6,8 (6,3)%. <sup>1</sup>H NMR (DMF-*d*<sub>7</sub>, ppm, SiMe<sub>4</sub>): 8,28 (bs, C2H, 1H), 7,79 (m, C21H, C25H, C31H, C35H, C41H, C45H, 6H, PPh<sub>3</sub>), 7,71 (m, C22H, C23H, C24H, C32H, C33H, C34H, C42H, C43H, C44H, 9H, PPh<sub>3</sub>), 7,66 (d, 2, C8H, 1H), 6,55 (m, C9H, 1H), 4,52–4,44 (m, C10H, 2H), 3,91 (m, C11H, 1H), 3,60–3,36 (m, C14H, 2H), 1,67–1,54 (m, C12H, C13H, 4H). <sup>13</sup>C NMR (DMF-*d*<sub>7</sub>, ppm, SiMe<sub>4</sub>): 156,60 (C6), 152,26 (C4), 147,29 (C2), 140,71 (C8), 134,77, 134,64 (C21, C25, C31, C35, C41, C45, PPh<sub>3</sub>), 132,60, 132,67, (C22, C24, C32, C34, C42, C44, PPh<sub>3</sub>), 130,01, 129,90, (C23, C33, C43, PPh<sub>3</sub>), 129,72, (C20, C30, C40, PPh<sub>3</sub>), 122,70 (C5), 101,35 (C9), 76,96, 76,90 (C11), 67,82, 67,77 (C14, C10), 28,45, 25,49 (C12, C13).

[Au(L<sup>4</sup>)(PPh<sup>3</sup>)] (4): Prvkové složení pro C<sub>31</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>OPAu vypočteno (nalezeno): C, 54,5 (54,5); H, 3,7 (3,8); N, 6,2 (5,9)%. <sup>1</sup>H NMR (DMF-*d*<sub>7</sub>, ppm, SiMe<sub>4</sub>): 8,32 (s, C2H, 1H), 7,68 (m, C21H, C25H, C31H, C35H, C41H, C45H, 6H, PPh<sub>3</sub>, C8H, 1H), 7,64 (m, C22H, C23H, C24H, C32H, C33H, C34H, C42H, C43H, C44H, 9H, PPh<sub>3</sub>), 7,4 (d, 7,5, C12H, C16H, 2H), 7,1 (m, C14H, 1H), 7,01 (m, C13H, C15H, 2H), 6,59 (d, 2,2 C9H, 1H), 5,68 (s, C10H, 2H). <sup>13</sup>C NMR (DMF-*d*<sub>7</sub>, ppm, SiMe<sub>4</sub>): 156,37 (C6), 152,46 (C4), 147,25 (C2), 140,84 (C8), 138,07 (C11), 134,63, 134,50 (C21, C25, C31, C35, C41, C45, PPh<sub>3</sub>), 132,56, 132,54, (C22, C24, C32, C34, C42, C44, PPh<sub>3</sub>), 130,00, 129,88, (C23, C33, C43, PPh<sub>3</sub>), 129,61, (C20, C30, C40, PPh<sub>3</sub>), 128,99 (C11), 128,57 (C13, C15), 127,92 (C12, C16), 127,83 (C14), 122,81 (C5), 101,46 (C9), 66,69 (C10).

[Au(L<sup>5</sup>)(PPh<sup>3</sup>)] (5): Prvkové složení pro C<sub>32</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>OPAu vypočteno (nalezeno): C, 55,1 (55,3); H, 3,9 (3,9); N, 6,0 (6,0)%. <sup>1</sup>H NMR (DMF-*d*<sub>7</sub>, ppm, SiMe<sub>4</sub>): 8,31 (s, C2H, 1H), 7,75 (m, C21H, C25H, C31H, C35H, C41H, C45H, 6H, PPh<sub>3</sub>), 7,70 (m, C22H, C23H, C24H, C32H, C33H, C34H, C42H, C43H, C44H, 9H, PPh<sub>3</sub>), 7,68 (m, C8H, 1H), 7,17 (m, C13H, C14H, C16H, C17H, 4H), 7,07 (m, C15H, 1H), 6,58 (d, 1,6 C9H, 1H), 4,72 (t, 7,2 C10H, 2H), 2,89 (m, C11H, 2H). <sup>13</sup>C NMR (DMF-*d*<sub>7</sub>, ppm, SiMe<sub>4</sub>): 156,49 (C6), 152,33 (C4), 147,29 (C2), 140,72 (C8), 138,73 (C12), 134,70, 134,56 (C21, C25, C31, C35, C41, C45, PPh<sub>3</sub>), 132,64, 132,62, (C22, C24, C32, C34, C42, C44, PPh<sub>3</sub>), 130,05, 129,94, (C23, C33, C43, PPh<sub>3</sub>), 129,67, (C20, C30, C40, PPh<sub>3</sub>), 129,24, 129,05, 128,64 (C13, C14, C16, C17), 126,54 (C15), 122,80 (C5), 101,39 (C9), 66,31 (C10), 35,42 (C11).

Příklad 2: Molekulová struktura komplexu [Au(L<sup>2</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (2), HL<sup>2</sup> = 6-(isopropoxy)-9-deazapurin, stanovená za využití monokrystalové rentgenové strukturní analýzy, kde krystalografické parametry jsou uváděny v jednotkách Å, pro které platí převodní vztah: Å = 10<sup>-10</sup> m.

Základní krystalografické parametry komplexu  $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$  (2): mřížkové parametry:  $a$  (Å) 9,91540(17),  $b$  (Å) 13,4387(2),  $c$  (Å) 18,1518(3),  $\alpha$  (°) 90,  $\beta$  (°) 91,3508(15),  $\gamma$  (°) 90, prostorová grupa:  $P2_1/c$ , vazebné délky: Au(1)–N(7) 2,041(2), Au(1)–P(1) 2,2272(7) Å, vazebný úhel: N(7)–Au(1)–P(1) 176,35(6)° (viz obrázek 7).

Příklad 3: *In vitro* cytotoxická aktivita zlatných komplexů a volných ligandů HL<sup>1-5</sup> na lidské leukemické linii THP-1.

Před samotným stanovením *in vitro* protizánětlivého potenciálu připravených komplexů zlata(I) se stanovila *in vitro* cytotoxicita u lidských leukemických buněk THP-1 použitím WST-1 testu. Během tohoto testu živé (metabolicky aktivní) buňky redukují sůl 4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonát (WST-1) na žlutý formazan. Tato reakce je řízená enzymem sukcinát-tetrazolium reduktázou, která je součástí respiračního řetězce v mitochondriích a je aktivní pouze v živých buňkách. Množství vzniklého formazanu je tedy přímo úměrné množství metabolicky aktivních buněk v médiu a může být kvantitativně zjištěno měřením absorbance spektrofotometricky. THP-1 buněčná linie byla kultivována v plastových lahvích s RPMI 1640 médiem suplementovaným 2mM L-glutaminem, 10% fetálním bovinním sérem, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml) při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Pro účely stanovení vlastní cytotoxické aktivity byla připravena buněčná suspenze 5 x 10<sup>5</sup> buněk/ml v kultivačním mediu RPMI 1640 (viz výše), které neobsahovalo boviní sérum. Tato buněčná suspenze byla rozpipetována po 100 µl do 96jamkové mikrotitrační destičky. Testované zlatné komplexy a ligandy byly nejprve rozpuštěny v dimethyl sulfoxidu, a pak naředěny do koncentrace 10 mM a tyto sloužily jako zásobní roztoky. Zásobní roztoky byly před každým testováním 10x zředěny kultivačním médiem bez séra a 1 µl tohoto roztoku byl přidán k buněčné suspenzi. Směsi byly následně inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C, 100% vlhkosti a v atmosféře CO<sub>2</sub>. Poté byl přidán roztok WST-1 a následovala inkubace po dobu 45 minut. Vzniklý formazan byl kvantifikován spektrofotometricky (Synergy HT, BioTek) při 440 nm a referenční vlnové délce 630 nm.

Inhibiční koncentrace testovaných komplexů IC<sub>50</sub> (µM), odpovídající koncentraci testovaných látek potřebné k inhibici růstu 50% nádorových buněk, byly vypočteny z dávkových křivek a jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Výsledky *in vitro* cytotoxicity komplexů 1 až 5 a volných ligandů HL<sup>1</sup> až HL<sup>5</sup> vůči lidské leukemické linii THP-1 a stanovené za využití WST-1 testu. Výsledky jsou vyjádřeny v hodnotách inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> (µM) a porovnány s Auranofinem jako zvoleným standardem.

| Testovaná látka                             | IC <sub>50</sub> (µM)<br>THP-1 |
|---------------------------------------------|--------------------------------|
| $[\text{Au}(\text{L}^1)(\text{PPh}_3)]$ (1) | 0,84±0,05                      |
| $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$ (2) | 0,78±0,03                      |
| $[\text{Au}(\text{L}^3)(\text{PPh}_3)]$ (3) | 0,96±0,05                      |
| $[\text{Au}(\text{L}^4)(\text{PPh}_3)]$ (4) | 1,69±0,14                      |
| $[\text{Au}(\text{L}^5)(\text{PPh}_3)]$ (5) | 1,39±0,11                      |
| Auranofin                                   | 0,88±0,04                      |
| HL <sup>1</sup>                             | >10                            |
| HL <sup>2</sup>                             | >10                            |
| HL <sup>3</sup>                             | >10                            |
| HL <sup>4</sup>                             | >10                            |
| HL <sup>5</sup>                             | >10                            |

HL<sup>1</sup> = 6-(ethoxy)-9-deazapurin; HL<sup>2</sup> = 6-(isopropoxy)-9-deazapurin; HL<sup>3</sup> = 6-(tetrahydrofuran-2-ylmethoxy)-9-deazapurin; HL<sup>4</sup> = 6-(benzyloxy)-9-deazapurin; HL<sup>5</sup> = 6-(fenethyl-oxy)-9-deazapurin.

5

Příklad 4: Stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na sekreci prozánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$  ve srovnání s Auranofinem a vehikulem.

Pro stanovení *in vitro* protizánětlivé aktivity studovaných komplexů [Au(L<sup>1</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (1), [Au(L<sup>2</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (2), [Au(L<sup>3</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (3), [Au(L<sup>4</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (4), [Au(L<sup>5</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (5) a Auranofinu byla použita výše popsaná metoda na stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na sekreci prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  (HL<sup>1</sup> = 6-(ethoxy)-9-deazapurin, HL<sup>2</sup> = 6-(isopropoxy)-9-deazapurin, HL<sup>3</sup> = 6-(tetrahydrofuran-2-ylmethoxy)-9-deazapurin, HL<sup>4</sup> = 6-(benzyloxy)-9-deazapurin, HL<sup>5</sup> = 6-(fenethyl-oxy)-9-deazapurin). Statistická analýza byla provedena programem ANOVA a Tuckey testem pro vícenásobné porovnání.

Výsledné koncentrace TNF- $\alpha$  (pg/ml) u studovaných komplexů se rovnají 6264 $\pm$ 104 (komplex 1), 5873 $\pm$ 915 (komplex 2), 5061 $\pm$ 794 (komplex 3), 5239 $\pm$ 815 (komplex 4), 4306 $\pm$ 94 (komplex 5), hodnota pro Auranofin je 5254 $\pm$ 865 a pro vehikulum (buňky, ke kterým byl přidán pouze LPS) je 8804 $\pm$ 960 (viz obrázek 8).

Příklad 5: Stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na sekreci prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  ve srovnání s Auranofinem a vehikulem.

25

Pro stanovení *in vitro* protizánětlivé aktivity studovaných komplexů [Au(L<sup>1</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (1), [Au(L<sup>2</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (2), [Au(L<sup>3</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (3), [Au(L<sup>4</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (4), [Au(L<sup>5</sup>)(PPh<sub>3</sub>)] (5) a Auranofinu byla použita výše popsaná metoda na stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na sekreci prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  (HL<sup>1</sup> = 6-(ethoxy)-9-deazapurin, HL<sup>2</sup> = 6-(isopropoxy)-9-deazapurin, HL<sup>3</sup> = 6-(tetrahydrofuran-2-ylmethoxy)-9-deazapurin, HL<sup>4</sup> = 6-(benzyloxy)-9-deazapurin, HL<sup>5</sup> = 6-(fenethyl-oxy)-9-deazapurin). Statistická analýza byla provedena programem ANOVA a Tuckey testem pro vícenásobné porovnání.

Výsledné koncentrace IL-1 $\beta$  (pg/ml) u studovaných komplexů se rovnají 478,2 $\pm$ 51,7 (komplex 1), 315,9 $\pm$ 12,1 (komplex 2), 329,4 $\pm$ 41,4 (komplex 3), 253,4 $\pm$ 13,6 (komplex 4), 304,8 $\pm$ 33,2 (komplex 5), hodnota pro Auranofin je 210,5 $\pm$ 15,8 a pro vehikulum (buňky, ke kterým byl přidán pouze LPS) je 703,2 $\pm$ 130,2 (viz obrázek 9).

Příklad 6: Stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na transkripci genů prozánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$  ve srovnání s Auranofinem a vehikulem.

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

trola kvantifikace byla použita mRNA (respektive cDNA) genu pro  $\beta$ -aktin. Relativní změna genové exprese  $\text{TNF-}\alpha$  po působení zlatnými komplexy byla vypočtena metodou  $\Delta\Delta C_T$ .

Pro stanovení *in vitro* protizánětlivé aktivity studovaných komplexů  $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$  (2),  $[\text{Au}(\text{L}^5)(\text{PPh}_3)]$  (5) a Auranofinu byla použita výše popsaná metoda na stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na transkripci genů prozánětlivých cytokinů  $\text{TNF-}\alpha$  ( $\text{HL}^2 = 6-(\text{isopropyloxy})-9\text{-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^5 = 6-(\text{fenethyloxy})-9\text{-deazapurin}$ ). Statistická analýza byla provedena programem ANOVA a Tuckey testem pro vícenásobné porovnání.

Výsledná genová transkripce  $\text{TNF-}\alpha$  (A.U.) u studovaných komplexů se rovná  $51,90 \pm 12,49$  (komplex 2),  $40,46 \pm 5,49$  (komplex 5), hodnota pro Auranofin je  $43,59 \pm 8,41$  a pro vehikulum (buňky, ke kterým byl přidán pouze LPS) je  $79,72 \pm 14,62$  (viz obrázek 10).

Příklad 7: Stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na transkripci genů prozánětlivého cytokinu  $\text{IL-1}\beta$  ve srovnání s Auranofinem a vehikulem.

Další úrovní testování protizánětlivé aktivity bylo posouzení vlivu testovaných látek na transkripci genů prozánětlivého cytokinu  $\text{IL-1}\beta$ . K diferencovaným buňkám v 96-ti jamkové mikrotitrační destičce (objem media 100  $\mu\text{l}$  na jamku) byl přidán 1  $\mu\text{l}$  30  $\mu\text{M}$  roztoku testovaných látek rozpuštěných v 10% (w/w) DMSO v RPMI 1  $\mu\text{l}$  30  $\mu\text{M}$  roztoku testovaných látek rozpuštěných v 10% (w/w) DMSO v RPMI 1640 mediu. Buňky byly s testovanými látkami preinkubovány hodinu. Následně byl k buňkám přidán 1  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{g/ml}$  lipopolysacharidu (LPS) z *Escherichia coli* 0111:B4 rozpuštěným v RPMI 1640 mediu, který simuluje zánětlivou reakci aktivací TLR-4 receptoru, a buňky byly dále inkubovány 2 hodiny při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5%  $\text{CO}_2$ . Následně bylo inkubační médium odsáto a buňky byly promyty ledovým PBS (pH 7,4). Přisedlé buňky byly rozloženy komerčně dostupným lyzačním pufrem s obsahem inhibitorů RNas. Uvolněná mRNA byla převedena na cDNA pomocí reverzní transkriptázy. Množství získané cDNA bylo kvantifikováno metodou real-time PCR (qPCR), přičemž jako endogenní kontrola kvantifikace byla použita mRNA (respektive cDNA) genu pro  $\beta$ -aktin. Relativní změna genové exprese  $\text{IL-1}\beta$  po působení zlatnými komplexy byla vypočtena metodou  $\Delta\Delta C_T$ .

Pro stanovení *in vitro* protizánětlivé aktivity studovaných komplexů  $[\text{Au}(\text{L}^2)(\text{PPh}_3)]$  (2),  $[\text{Au}(\text{L}^5)(\text{PPh}_3)]$  (5) a Auranofinu byla použita výše popsaná metoda na stanovení vlivu testovaných zlatných komplexů na transkripci genů prozánětlivého cytokinu  $\text{IL-1}\beta$  ( $\text{HL}^2 = 6-(\text{isopropyloxy})-9\text{-deazapurin}$ ,  $\text{HL}^5 = 6-(\text{fenethyloxy})-9\text{-deazapurin}$ ). Statistická analýza byla provedena programem ANOVA a Tuckey testem pro vícenásobné porovnání.

Výsledná genová transkripce  $\text{IL-1}\beta$  (a.u.) u studovaných komplexů se rovná  $1,305 \pm 0,120$  (komplex 2),  $1,791 \pm 0,765$  (komplex 5), hodnota pro Auranofin je  $2,258 \pm 0,345$  a pro vehikulum (buňky, ke kterým byl přidán pouze LPS) je  $4,197 \pm 0,965$  (viz obrázek 11).

Příklad 8: *In vitro* cytotoxická aktivita zlatných komplexů na zvolených lidských nádorových liniích.

Pro stanovení *in vitro* protinádorové aktivity připravených komplexů zlata(I) byl použit MTT test. Jedná se o mikrotitrační metodu hodnotící životaschopnost buněk redukcí 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) za vzniku modrého formazanového barviva. Jelikož k této přeměně dochází pouze v živých buňkách, kde jejich počet odpovídá množství zredukovaného MTT, lze tímto způsobem stanovit cytotoxicitu různých chemických látek. V rámci buňky jsou za redukci zodpovědné enzymy mitochondriálních dehydrogenáz. Vznikající formazanové barvivo je nerozpustné a je následně kvantifikováno po rozpuštění v DMSO za použití klasického spektrofotometru (ELISA reader). *In vitro* testy protinádorové aktivity byly pro-

vedeny na následujících lidských nádorových buněčných liniích: osteosarkom (HOS), prsní adenokarcinom (MCF7), karcinom plic (A549), maligní melanom (G361), karcinom děložního čípku (HeLa), karcinom vaječníku (A2780), karcinom vaječníku rezistentní na *cisplatinu* (A2780R) a karcinom prostaty (22Rv1). Linie byly udržovány v kultivačních lahvích v DMEM médiu (4,5 g/l glukosy, 2 mM L-glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný) pro buněčné kultury A549, HeLa, HOS, MCF7, v RPMI-1610 médiu (2 mM L-glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitanu sodného) pro buněčné kultury A2780, A2780R, LNCaP a v McCoy's médiu (2 mM L-glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitanu sodného) pro buněčné kultury G361. Suspenze buněk (25 000 buněk/jamka) byly rozpipetovány po 200 µl na 96-ti jamkové mikrotitrační destičky. Tyto byly preinkubovány při 37 °C v atmosféře CO<sub>2</sub> po dobu 24 hodin. Testované zlatné komplexy a ligandy 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 (20,0–50,0 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<sub>2</sub>. Poté byl přidán zředěný roztok MTT v sérovém médiu (0,3 mg/ml) a následovala inkubace po dobu 1 hodiny. Analýza koncentrace MTT formazanu byla provedena spektrofotometricky (TECAN, Schoeller Instruments LLC) při 540 nm.

V Tabulce 2 jsou uvedeny inhibiční koncentrace testovaných komplexů IC<sub>50</sub> (µM).

Tabulka 2: Výsledky *in vitro* cytotoxicity připravených komplexů 1 až 5 a volných ligandů HL<sup>1</sup> až HL<sup>5</sup> zjištěné pomocí MTT testu a vyjádřené v hodnotách inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> (µM), a jejich porovnání s *cisplatinou* jako zvoleným standardem.

| Komplex                                      | IC <sub>50</sub> (µM) |     |          |          |         |          |          |
|----------------------------------------------|-----------------------|-----|----------|----------|---------|----------|----------|
|                                              | MCF7                  | HOS | A549     | G361     | HeLa    | A2780    | A2780R   |
| [Au(L <sup>1</sup> )(PPh <sub>3</sub> )] (1) | 3,1±0,6               |     | 3,3±0,4  | 20,7±2,9 | 3,5±0,5 | 22,0±1,9 | 4,8±0,3  |
| [Au(L <sup>2</sup> )(PPh <sub>3</sub> )] (2) | 0,6±0,4               |     | 0,9±0,5  | 17,2±2,2 | 3,4±0,3 | 16,0±0,7 | 4,0±0,5  |
| [Au(L <sup>3</sup> )(PPh <sub>3</sub> )] (3) | 2,2±0,5               |     | 4±1,8    | 21,4±0,5 | 3,4±0,5 | 20,7±0,5 | 4,8±0,9  |
| [Au(L <sup>4</sup> )(PPh <sub>3</sub> )] (4) | 4,0±2,8               |     | 1,8±1,0  | >20      | 3,5±0,6 | 14,3±0,5 | 4,6±0,7  |
| [Au(L <sup>5</sup> )(PPh <sub>3</sub> )] (5) | >50                   |     | 2,9±0,2  | 18,3±1,5 | 3,5±0,6 | 22,8±1,4 | 4,4±0,8  |
| <i>cisplatina</i>                            | 17,9±3,5              |     | 20,5±0,3 | >50      | 5,3±0,7 | >50      | 21,6±0,6 |
| HL <sup>1</sup>                              | >50                   |     | >50      | >50      | >50     | >50      | >50      |
| HL <sup>2</sup>                              | >50                   |     | >50      | >50      | >50     | >50      | >50      |
| HL <sup>3</sup>                              | >50                   |     | >50      | >50      | >50     | >50      | >50      |
| HL <sup>4</sup>                              | >50                   |     | >50      | >50      | >50     | >50      | >50      |
| HL <sup>5</sup>                              | >50                   |     | >50      | >50      | >50     | >50      | >50      |

HL<sup>1</sup> = 6-(ethoxy)-9-deazapurin, HL<sup>2</sup> = 6-(isopropoxy)-9-deazapurin, HL<sup>3</sup> = 6-(tetrahydrofuran-2-ylmethoxy)-9-deazapurin, HL<sup>4</sup> = 6-(benzyloxy)-9-deazapurin, HL<sup>5</sup> = 6-(fenethyl-oxy)-9-deazapurin, MCF7 = lidský prsní adenokarcinom;

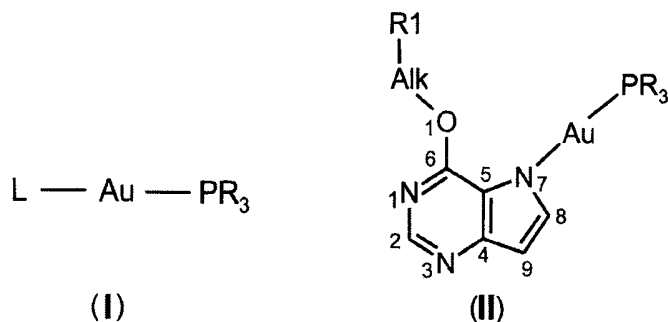
HOS = lidský osteosarkom; A549 = lidský karcinom plic;

G361 = lidský maligní melanom; HeLa = lidský karcinom děložního čípku;

A2780 = lidský karcinom vaječníků; A2780R = lidský karcinom vaječníků rezistentní vůči *cisplatině*; 22Rv1 = lidský karcinom prostaty

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Komplexy zlata v oxidačním stavu (+I) s  $\omega$ -substituovanými deriváty 6-alkyloxy-9-deazapurinu a deriváty fosfanu, a jejich krystalosolváty, zahrnující strukturní motiv I obecného vzorce [Au(L)(PR<sub>3</sub>)] a vyjádřené strukturním vzorcem II,

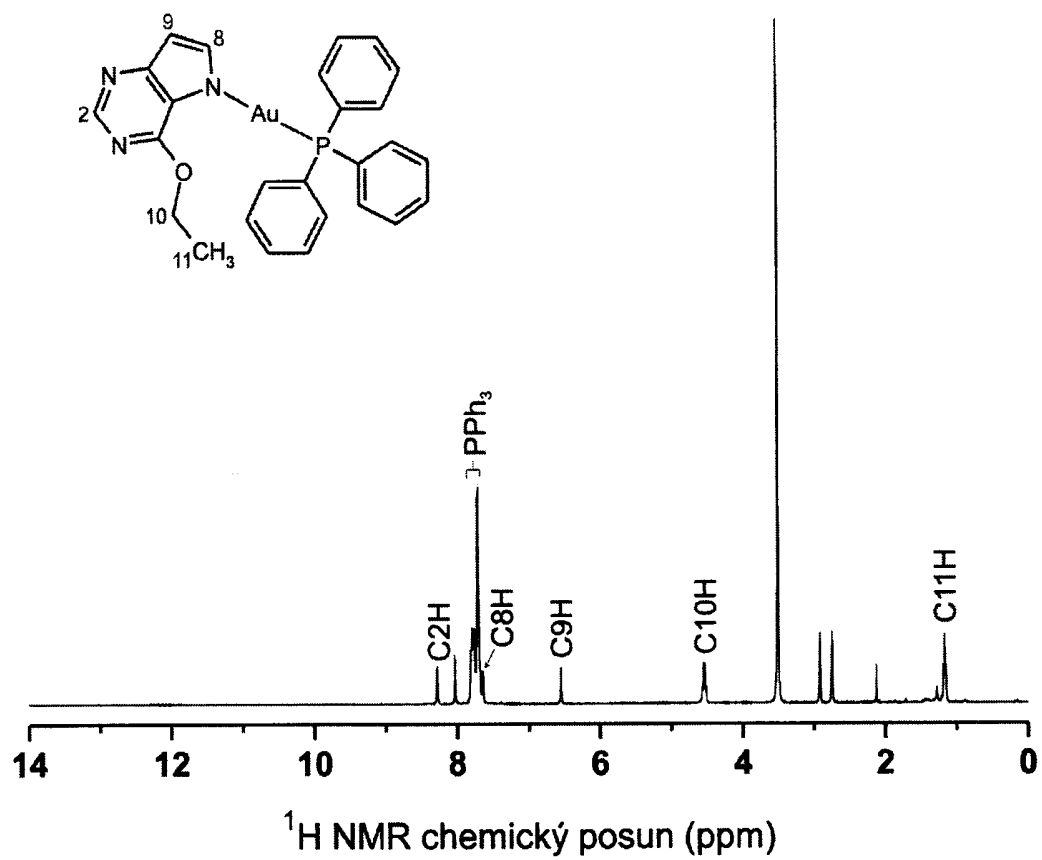


10

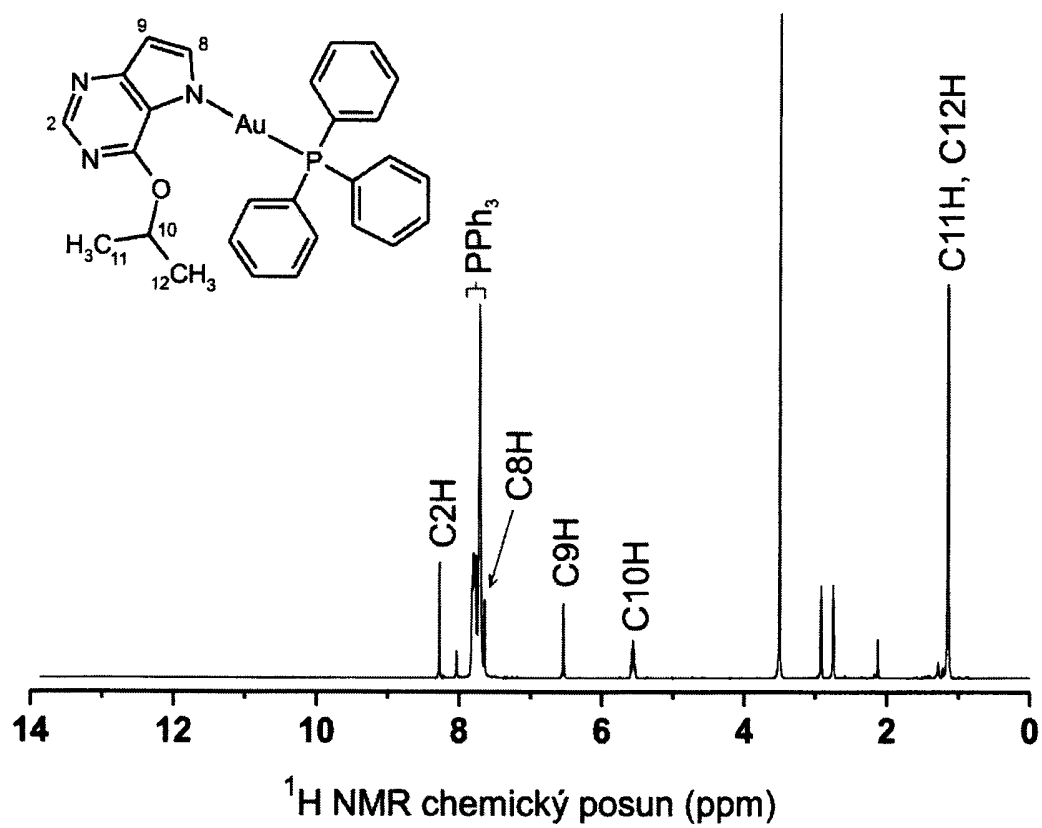
kde

- symbol L představuje deprotonizovaný  $\omega$ -substituovaný derivát 6-alkyloxy-9-deazapurinu vázaný na atom zlata přes atom dusíku N7,
- PR<sub>3</sub> je derivát fosfanu,
- substituenty R jsou nezávisle vybrány ze skupiny alkyl, cykloalkyl, substituovaný alkyl, substituovaný cykloalkyl, aryl, nebo heteroaryl, a/nebo jejich libovolné kombinace,
- skupina Alk představuje alkyl nebo substituovaný alkyl, který je na  $\omega$ -uhlíku substituován skupinou R1,
- příčemž
- substituent R1 je vybrán ze skupiny atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, alkenyl, substituovaný alkenyl, alkynyl, substituovaný alkynyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl, substituovaný cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, substituovaný cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl, substituovaný cykloheteroalkenyl, aryl, heteroaryl,
- kde termín:
- *alkyl* představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 8, především pak z 1 až 6 atomů uhlíku,
- *alkenyl* představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 12, především pak ze 3 až 6 atomů uhlíku, obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku,
- *alkynyl* představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec z až 12, především pak ze 3 až 6 atomů uhlíku, obsahující alespoň jednu trojnou vazbu mezi atomy uhlíku,
- *cykloalkyl* představuje cyklický uhlovodík ze 3 až 12, především pak ze 3 až 8 atomů uhlíku, a to včetně kondenzovaných cyklů nezávisle vybraných ze skupiny cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl,
- *cykloheteroalkyl* představuje cykloalkyl s alespoň jedním atomem uhlíku zaměněným za heteroatom ze skupiny dusík, kyslík, nebo síra,
- *cykloalkenyl* představuje cykloalkyl obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku,
- *cykloheteroalkenyl* představuje cykloheteroalkyl obsahující alespoň jednu dvojnou vazbu mezi dvěma atomy uhlíku, atomem uhlíku a heteroatomem, nebo dvěma heteroatomy,

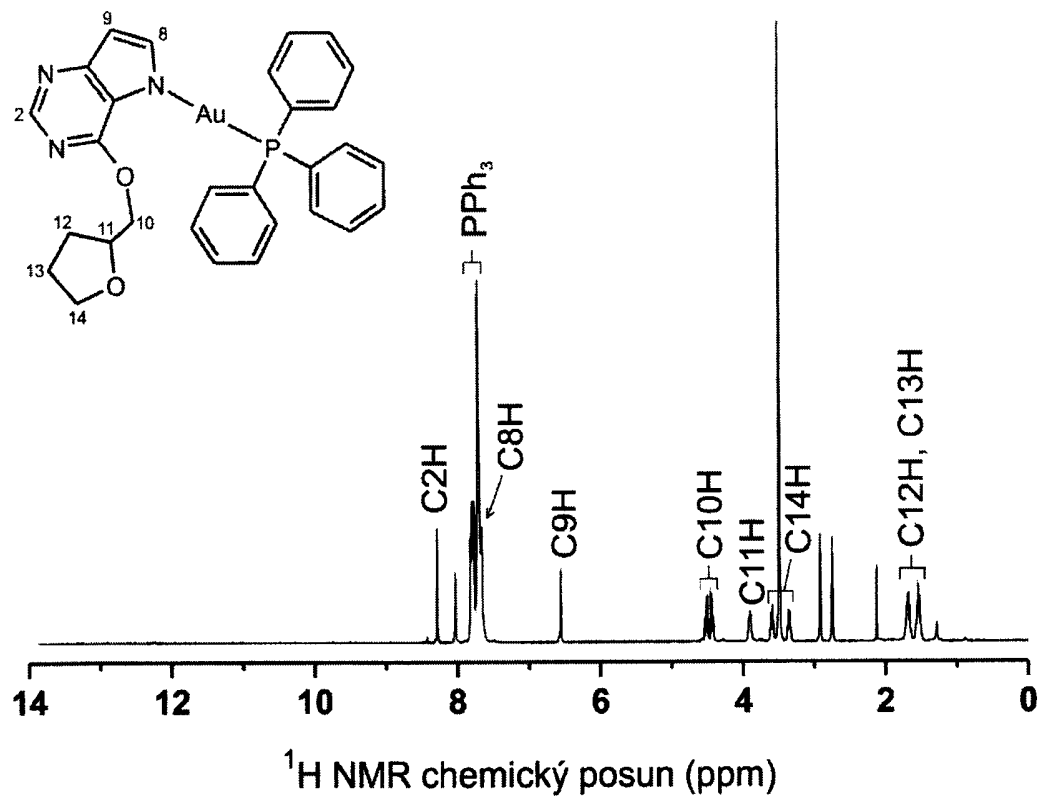
- *substituovaný alkyl, substituovaný alkenyl, substituovaný alkynyl, substituovaný cykloalkyl, substituovaný cykloheteroalkyl, substituovaný cykloalkenyl, substituovaný cykloheteroalkenyl* představují alkyl, alkenyl, alkynyl, cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl substituované substituenty z množiny halogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, cykloalkyl, cykloheteroalkyl, cykloalkenyl, cykloheteroalkenyl,
- *aryl* představuje fenyl,
- *heteroaryl* představuje aryl s alespoň jedním atomem uhlíku zaměněným za heteroatom ze skupiny dusík, kyslík, nebo síra.
2. Krystalosolváty komplexů zlata vzorce (II) podle nároku 1, kde u sloučenin obecného složení  $[\text{Au}(\text{L})(\text{PR}_3)] \cdot n\text{Solv}$  jsou
- L a  $\text{PR}_3$  definovány v nároku 1,
- $n$  udává počet krystalosolvátových molekul, především 1 až 6, a
- *Solv* představuje molekulu použitého rozpouštědla a/nebo jednu z reakčních komponent, vybranou ze skupiny voda, primární alkohol, sekundární alkohol, aceton, *N,N'*-dimethylformamid, dimethylsulfoxid, chloroform, dichlormethan, acetonitril nebo diethylether, a to buď samostatně, nebo v kombinaci uvedených solvátových molekul.
3. Farmakologický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje terapeuticky účinné množství zlatných komplexů vzorce II podle nároku 1 nebo jejich krystalosolvátů podle nároku 2 a/nebo farmaceutickou kompozici zlatných komplexů vzorce (II) podle nároku 1 nebo jejich krystalosolvátů podle nároku 2 s jedním či více přijatelnými nosiči a pomocnými látkami.
4. Farmakologický prostředek podle nároku 3 pro použití v lékařství.
5. Použití farmakologického prostředku podle nároku 3 pro výrobu léčiv pro léčení zánětlivých a/nebo nádorových onemocnění, zejména pro léčení adenokarcinomu prsu a/nebo osteosarkomu a/nebo karcinomu plic a/nebo maligního melanomu a/nebo karcinomu děložního čípku a/nebo karcinomu vaječníků a/nebo karcinomu vaječníků rezistentnímu vůči *cisplatině* a/nebo karcinomu prostaty.



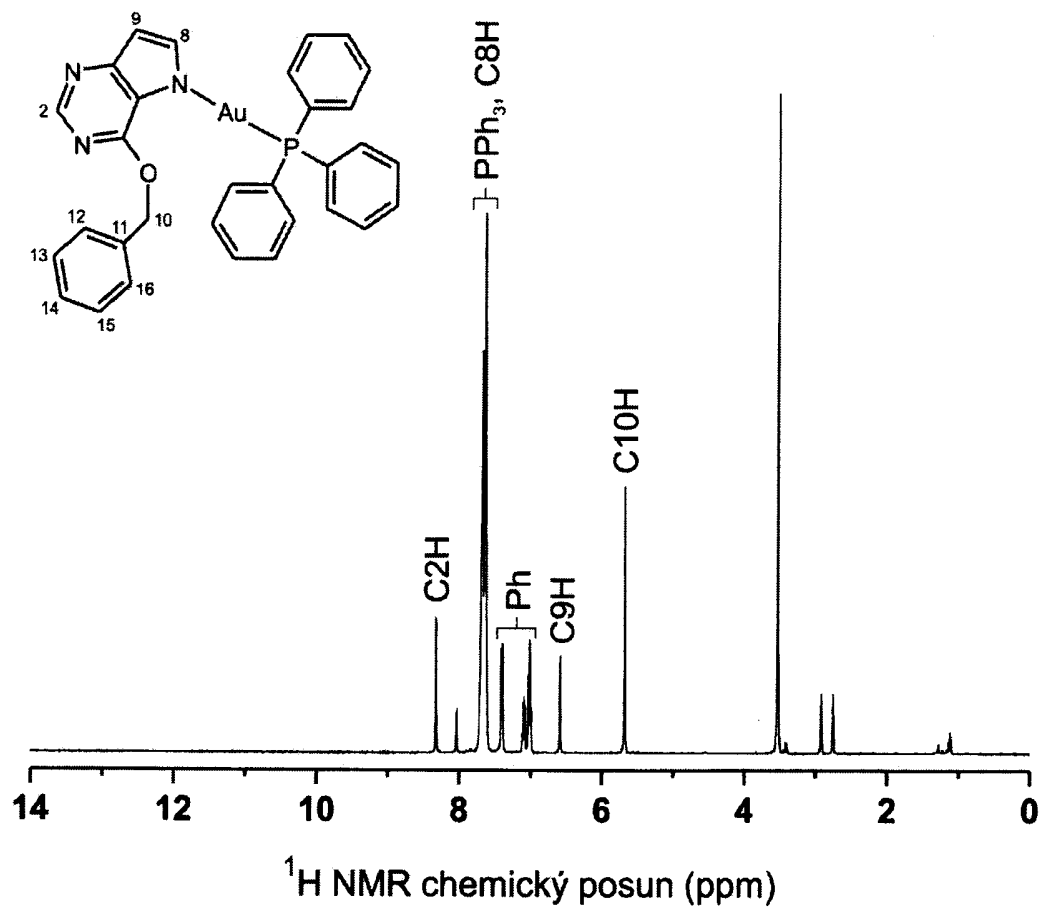
OBR. 1



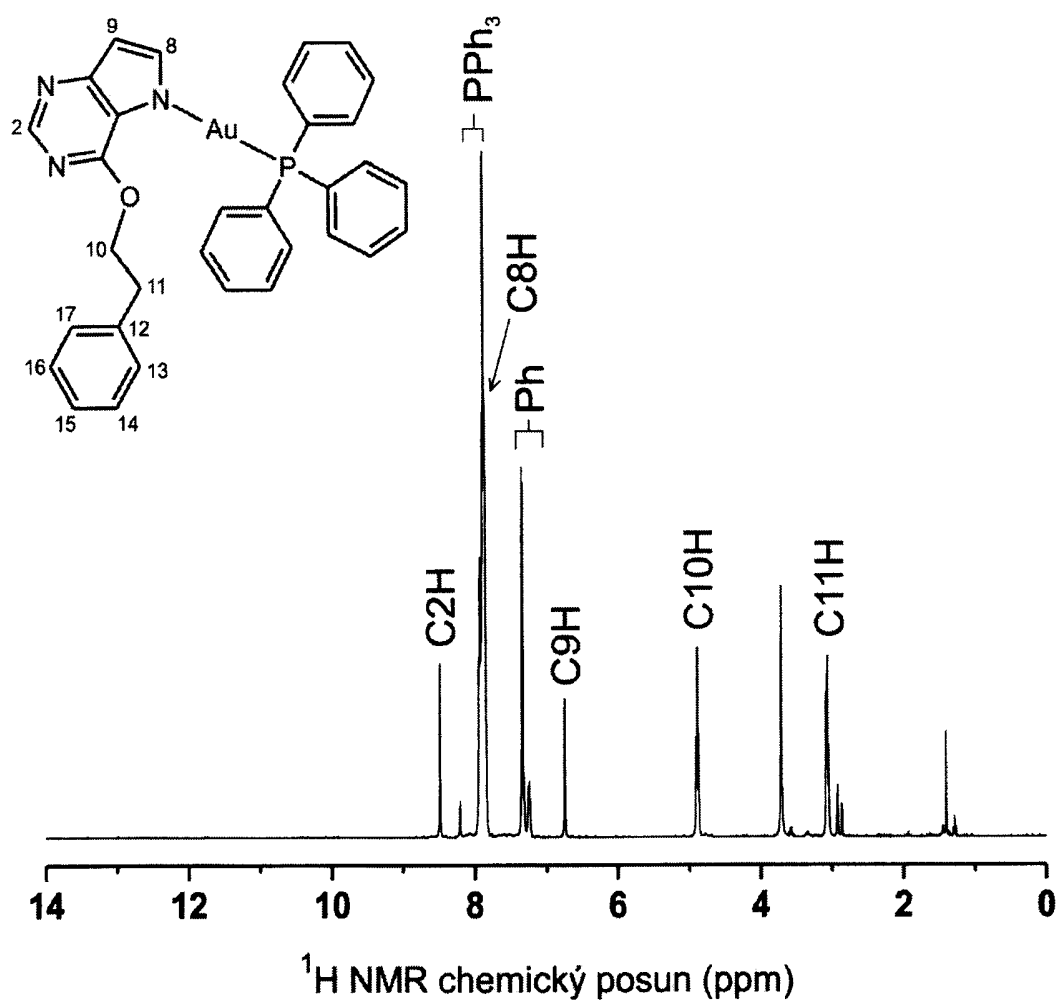
OBR. 2



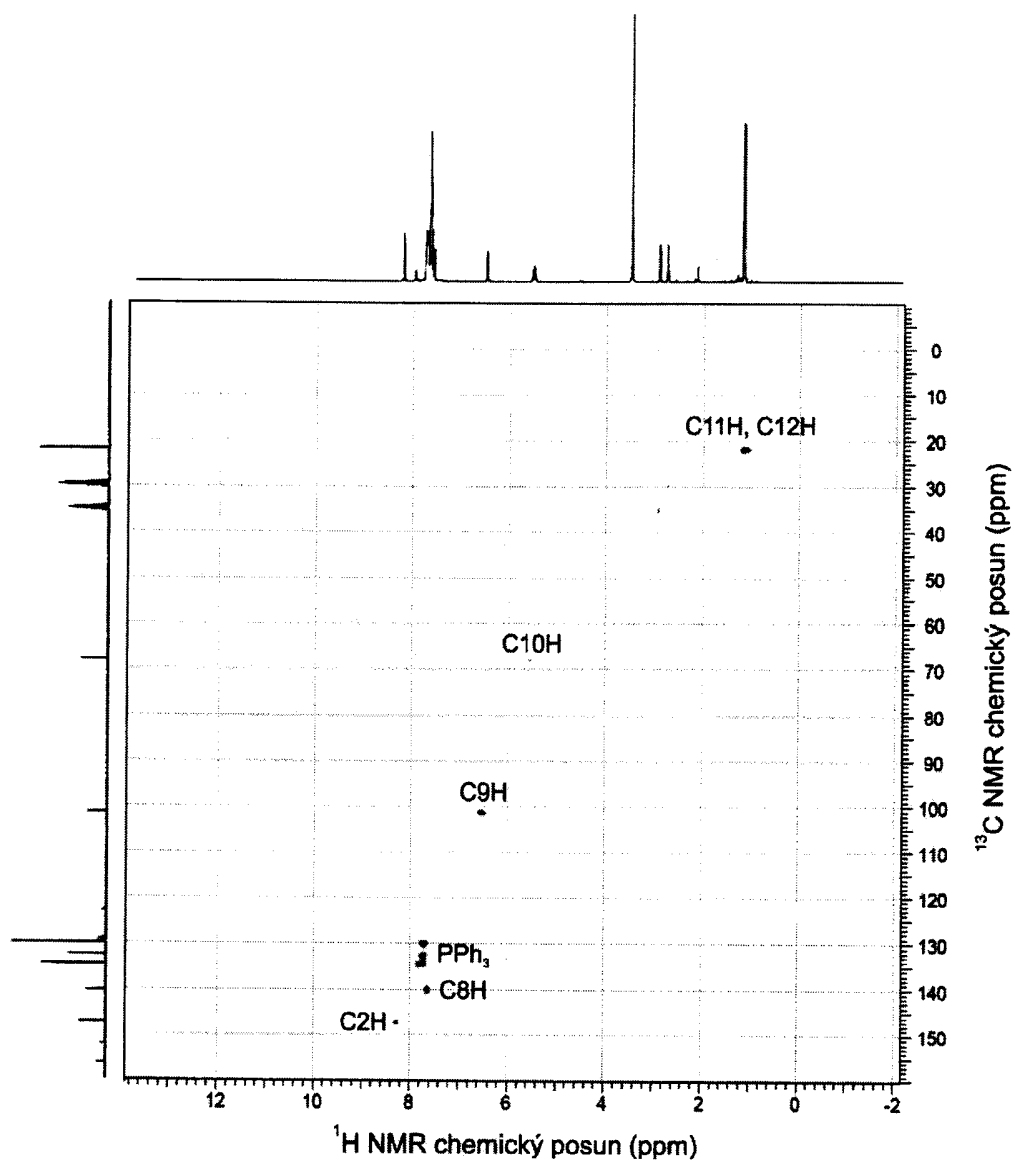
OBR. 3



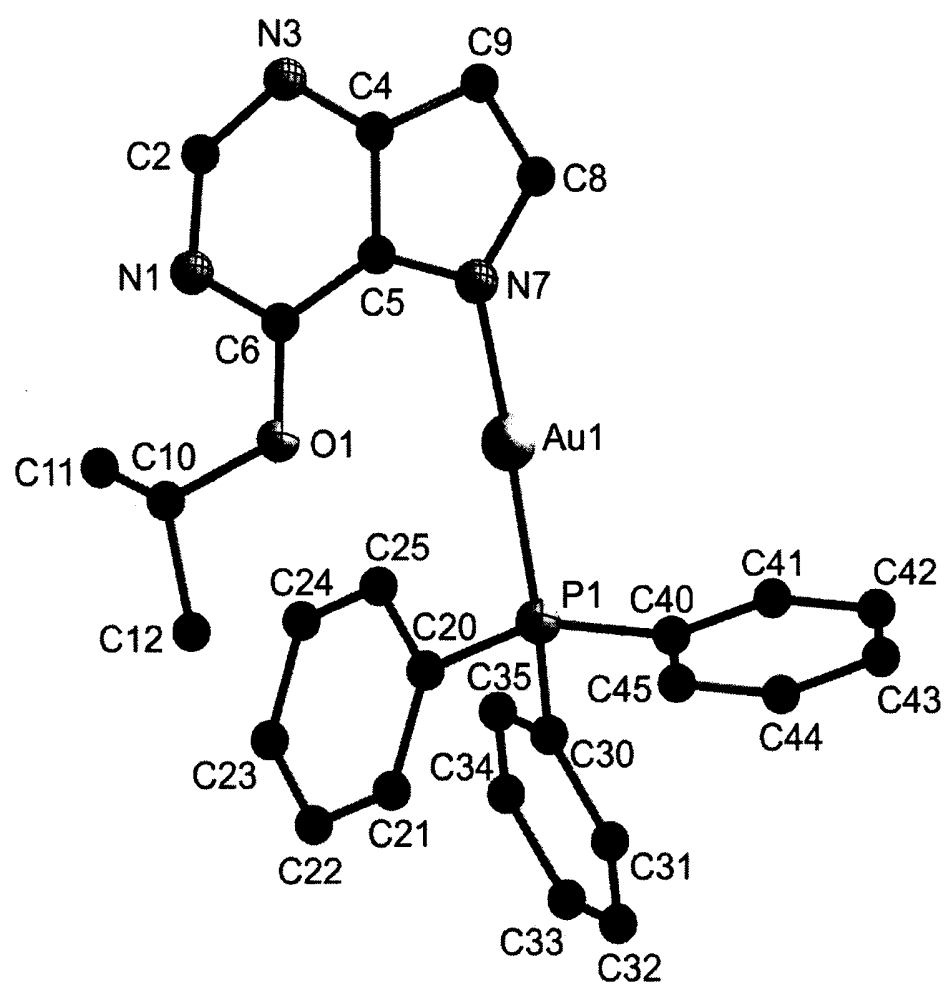
OBR. 4



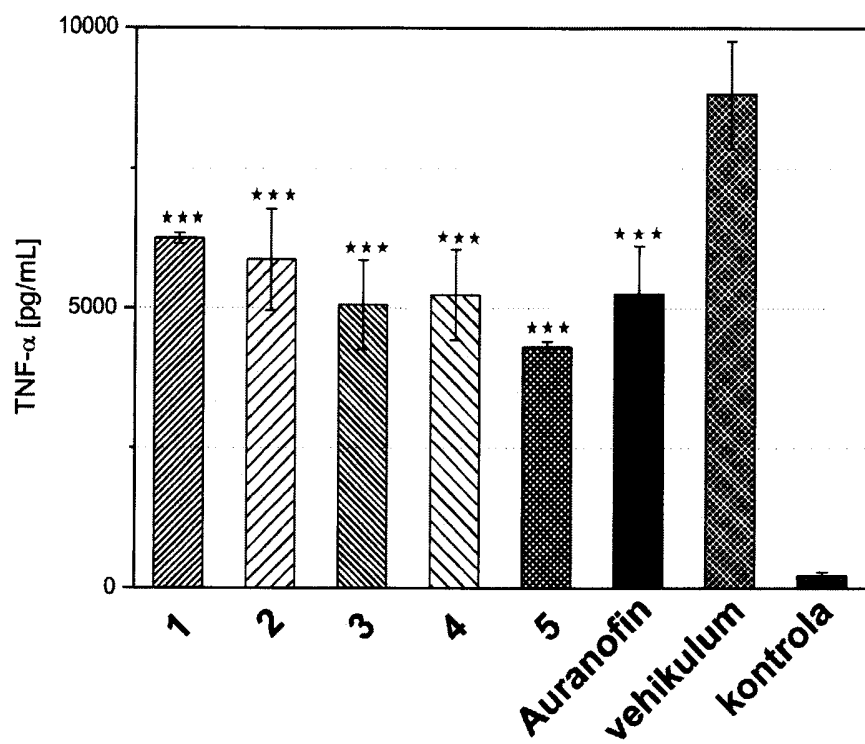
OBR. 5



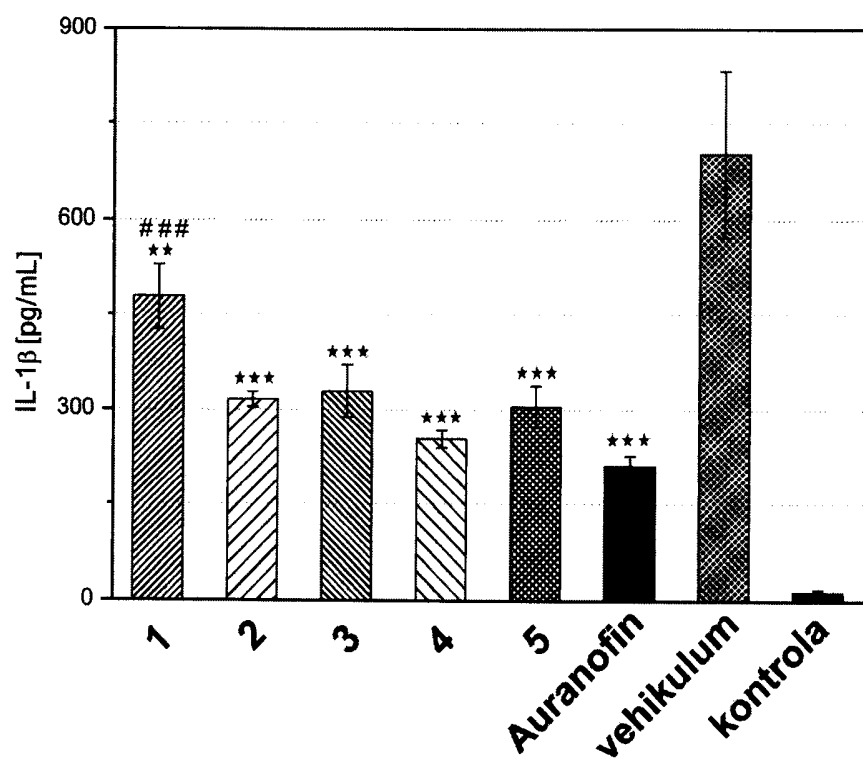
OBR. 6



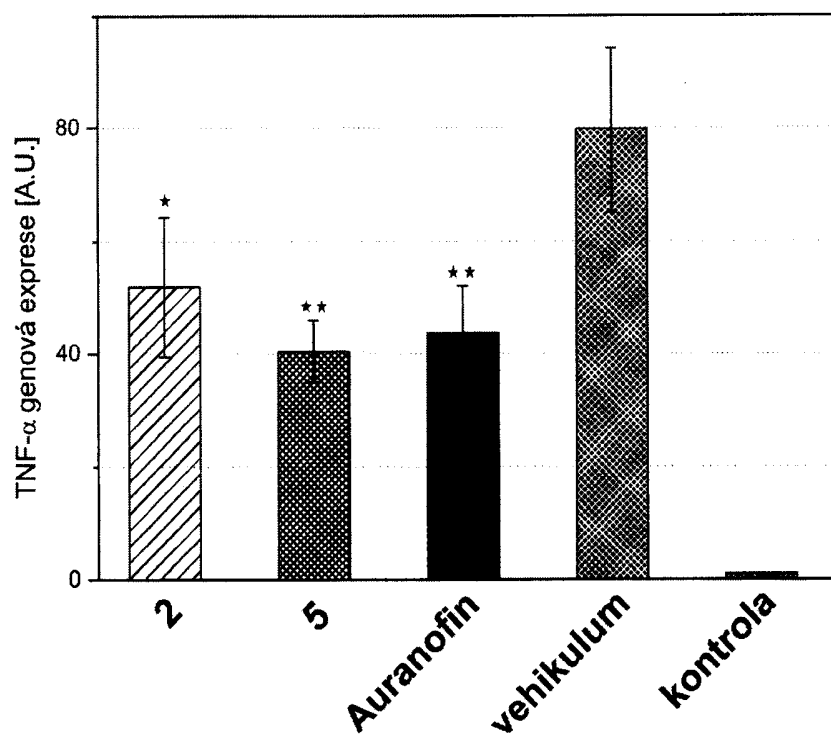
OBR. 7



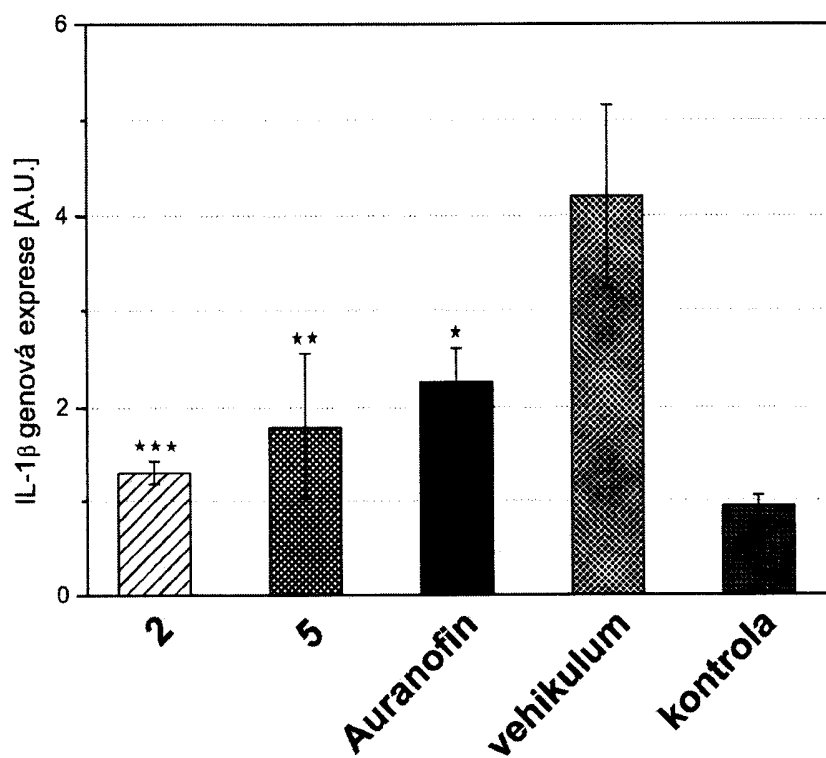
OBR. 8



OBR. 9



OBR. 10



OBR. 11

Konec dokumentu