

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 046

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07F 1/08 (2006.01)
C07D 215/20 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07D 213/61 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-598**
 (22) Přihlášeno: **02.09.2015**
 (40) Zveřejněno: **15.03.2017**
(Věstník č. 11/2017)
 (47) Uděleno: **01.11.2017**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **13.12.2017**
(Věstník č. 50/2017)

(56) Relevantní dokumenty:

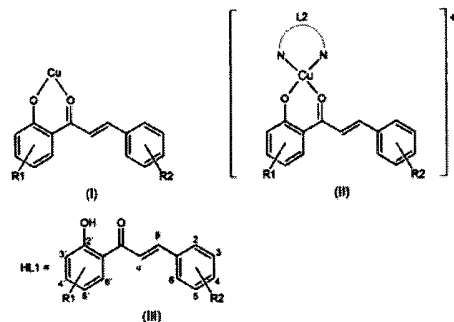
CZ 29415; CZ 303009 (Univerzita Palackého Olomouc), 2010-12-15; WO 96/19209 (INDENA S. P. A), 1996-06-27; WO 98/58913 (INDENA S. P. A), 1998-12-30; EP 411935 (JOHNSON MATTHEY PUBLIC LIM. COM.), 1991-02-06; EP 4344444 (UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO), 1991-06-26; DE MONATSHFTE FÜR CHEMIE, vol. 110, 1979; GB JOURNAL OF INORGANIC & NUCLEAR CHEMISTRY, vol. 42, 1980; CZ 304045 (Univerzita Palackého Olomouc), 2013-09-04; US ENVIROMENTAL HEALTH PERSPECTIVES, Vol. 64, 1985, pp 19-35.

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

(72) Původce:
prof. RNDr. Zdeněk Trávníček, Ph.D., Štěpánov, CZ
PharmDr. Ján Vančo, Ph.D., Heršpice, CZ
Mgr. Jakub Hutýra, Rožnov pod Radhoštěm, CZ
Mgr. Radka Křikavová, Ph.D., Olomouc, CZ
prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Ph.D., DrSc., Olomouc, CZ

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

čípku a/nebo karcinomu prostaty a/nebo adenokarcinomu prsu a/nebo adenokarcinomu prostaty a/nebo hepatocelulárního karcinomu a/nebo osteosarkomu a/nebo plicního adenokarcinomu.



(54) Název vynálezu:
Komplexy mědi s deriváty (E)-1-(2'-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-onu a jejich použití jako léčiv v protinádorové terapii

(57) Anotace:
Předmětem řešení jsou komplexy mědi v oxidačním stupni +II zahrnující strukturní motiv (I) obecného vzorce [Cu(L1)(L2)]X vyjádřeného strukturním vzorcem (II), kde symbol L1 znázorňuje aniont derivátu (E)-1-(2'-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-onu strukturního vzorce (III), kde substituenty R1 a R2 jsou nezávisle vybrány ze skupiny: atom vodíku, nitro skupina, hydroxy skupina, alkoxy skupina, amino skupina nebo kombinace těchto substituentů, přičemž amino skupina může být dále di-substituována alkylem, L2 symbolizuje bidentátně se koordinující N-donorový ligand 2,2'-bipyridin nebo 1,10-fenanthrolin nebo jejich alkyl nebo aryl deriváty, a symbol X je aniont kyseliny vybraný ze skupiny: F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻, BF₄⁻, BPh₄⁻, HCOO⁻, CH₃COO⁻, ClO₄⁻, HSO₄⁻. Komplexy jsou určeny pro léčbu nádorových onemocnění, zejména pak pro léčbu karcinomu děložního

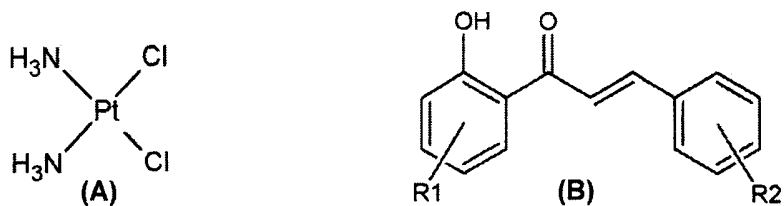
Komplexy mědi s deriváty (E)-1-(2'-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-onu a jejich použití jako léčiv v protinádorové terapii.

5 Oblast techniky

Předložený vynález, spadající do oblasti léčiv nádorových onemocnění na bázi koordinačních sloučenin mědi, se týká komplexů mědi s deriváty (E)-1-(2'-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-onu a bidentátně se koordinujícím N-donorovým ligandem a jejich použití v lékařské praxi jako léčiv v léčbě nádorových onemocnění, zejména pak karcinomu děložního čípku a/nebo karcinomu prostaty a/nebo adenokarcinomu prsu a/nebo adenokarcinomu prostaty a/nebo hepatocelulárního karcinomu a/nebo osteosarkomu a/nebo plicního adenokarcinomu.

15 Dosavadní stav techniky

Komplexy mědi jsou významnou skupinou látek v oblasti výzkumu sloučenin s protinádorovou aktivitou, protože jsou alternativou k již používaným komplexním sloučeninám platiny, k jejichž stále ještě celosvětově nejhojněji používaným zástupcům patří např. cis-diammin-dichlorido-platnatý komplex (cisplatina, CDDP) obecného vzorce (A).



Deriváty (E)-1-(2'-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-onu (chalkony) obecného vzorce (B) jsou skupinou látek velmi rozšířených v rostlinách, kde plní funkci pigmentů a také ochrannou vůči patogenům a hmyzu (Hanumappa M., et al., J. Exp. Botany, 2007, 58, 2471–2478; Dao T. T. H., et al., Phytochem Rev., 2011, 10, 397–412). Chalkony vykazují pestrou škálu různých biologických aktivit také na lidských buněčných modelech. Typ a míra biologické aktivity pak závisí na míře substituce a substituentech R1 a R2 na aromatických kruzích (Singh P., et al., Eur. J. Med. Chem., 2014, 85, 758–777; Bartovska D.I., Todorova I.T., Curr. Clin. Pharmacol., 2010, 5, 1–29; Go M. L. et al., Curr. Med. Chem., 2005, 12, 483–499; Stevens J. F. et al., Phytochemistry. 2004, 65, 1317–1330; patentový spis WO 013/022 951). Chalkony vykazují také aktivitu antioxidační (Rao G.V., et al., Eur. J. Med. Chem., 2009, 44, 2239–2245; Aoki N., et al., J. Nat. Prod., 2008, 71, 1308–1310), antibakteriální (Ávila H.P., et al., Bioorg. Med. Chem., 2008, 16, 9790–9794), a protinádorovou (Valdameri G., et al., J. Med. Chem., 2012, 55, 3193–3200; Vogel S., et al., Bioorg. Med. Chem., 2008, 16, 4286–4293; Miranda C.L., et al., Food Chem. Toxicol., 1999, 37, 271–285; patentové spisy US 2012/294897 a US2011/0201600) a protizánětlivou aktivitou (Bandgar B.P., et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010, 20, 730–733; Bano S., et al., Eur. J. Med. Chem., 2013, 65, 51–59).

Měďnaté komplexní sloučeniny obsahující deriváty (E)-1-(2'-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-onu (HL1) již byly v literatuře popsány, ale pouze obecného vzorce $[Cu(L1)_2]$, tedy jako bis{2-(2E)-(fenylprop-2-enoyl-KO)-fenoláto-KO}měďnaté komplexy, konkrétně s těmito substituenty R1 a R2 na aromatických jádrech: R1 = 3'-jodo, 3'-bromo, 4'-methyl, 5'-methyl, 5'-chloro; R2 = 3,4-methyendioxy (Karamunge K.G. et al., Int. J. Chem. Sci., 2012, 10, 490–500; Karamunge K.G. et al., Pol. J. Chem., 2008, 82, 559–564), R1= vodík, 3'-jodo, 5'-methyl; R2 = 2-hydroxy, 3,5-dibromo (Habib I. S. et al., Inorganic chemistry: An Indian Journal, 2012, 6, 43–46; Habib I. S. et al., J. Chem. Pharm. Res, 2011, 3 (1), 788–792; Habib I. S. et al., Chemica Sinica, 2011, 2, 27–32), R1 = 4'-hydroxy; R2= 3,4-dihydroxy (Guo P., et al., J. Mol. Struct., 2008, 849, 33–36), R1= benzo[e]; R2= vodík, 4-chloro, 3-methoxy, 4-methoxy (Mallikarjun K.G., E-Journal of Chemistry, 2005, 2, 58–61), R1 = 5'-chloro; R2 = [(2E)-1-(5-chloro-2-

- hydroxyfenyl)prop-2-en-1-on-3-yl] (Garnule W.B. et al., *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, 2001, 31, 1453–1477), R1 = 4'-methyl, 5'-methyl, 5'-chloro; R2 = 2-hydroxy (Mundhe P.G., Deogaonkar P.B., *Asian J. Chem.*, 2000, 12, 947–953), R1 = 5'-chloro (Mundhe P.G., et al., *J. Indián. Chem. Soc.*, 1998, 75, 349–351), R1 = benzo[c]; R2 = vodík, 2-methoxy, 4-methoxy, 3,4-methylenedioxy (Agharia E.R., Dodwad S.S., *Asian J. Chem.*, 1996, 8, 449–45), R1 = benzo[e]; R2 = vodík, 4-chloro, 4-methoxy, 3,4-methylenedioxy (Mallikarjun K.G., et al., *Thermochim. Acta*, 1992, 206, 273–278), R1 = benzo[e]; R2 = vodík, 4-chloro, 4-methyl (Natarajan C, et al., *Transition Met. Chem. (Dordrecht, Neth.)* 1992, 17, 39–45), R2 = vodík, 2-hydroxy, 4-chloro, 4-methoxy (Naidu R.S., et al., *Acta Chim. Hung.*, 1990, 127, 385–390; Naidu R.S., et al., *Thermochim. Acta*, 1988, 131, 299–301; Ramakrishnaiah C, et al., *J. Indián. Chem. Soc.*, 1986, 63, 573–574; Naidu R.S., Naidu R.R., *J. Inorg. Nud. Chem.*, 1979, 41, 1625–1627), R1 = benzo[c] (Natarajan C, Tharmaraj P., *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg., Bio-inorg., Phys., Theor. Anal. Chem.*, 1990, 29A, 666–669), R2 = benzo[c] (Natarajan C, Tharmaraj P., *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, 1990, 20, 151–166), R1 = 4',5'-dimethyl; R2 = 4-chloro (Mittal M., *Acta Cienc. Indica, Chem.*, 1988, 14, 261–264), R1 = 5'-methyl; R2 = [(2E)-1-(5-methyl-2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-on-3-yl] (Paliwal L.J., Kharat R.B., *J. Makromol. Sci.-Chem.*, 1989, A26, 843–859), R2 = benzofc], 3,4-dimethoxy (Rao T.S., et al., *Proc. -Indian Acad. Sci., Chem. Sci.*, 1988, 100, 363–373), R1 = benzo[c]; R2 = vodík, 4-chloro, 4-methyl, 4-methoxy (Natarajan C, Tharmaraj P., *Transition Met. Chem. (Dordrecht, Neth.)*, 1987, 12, 553–557), R1 = 4'-hydroxy, 5'-[(2E)-3-fenylprop-2-en-1-on-yl]; R2 = 4-methoxy (Venkataraman V.R., et al., *J. Indián. Chem. Soc.*, 1986, 63, 925–926), R1 = 4'-hydroxy (Dhar M.L., et al., *Journal of the Iraqi Chemical Society*, 1986, 11, 41–58), R1 = R2 = vodík (Natarajan C, Tharmaraj P., *Transition Met. Chem. (Dordrecht, Neth.)*, 1983, 8, 229–233; Naidu R.S., Naidu R.R., *Proceedings - Indian Academy of Sciences, Section A*, 1975, 82, 142–151), R2 = 4-chloro, 4-bromo, 4-methyl, 4-methoxy (Natarajan C, Tharmaraj P., *J. Indian. Chem. Soc.*, 1983, 60, 1–6), R1 = vodík; R2 = vodík, 5'-chloro, 5'-methyl (Palaniandavar M., Natarajan C, *Aust. J. Chem.*, 1980, 33, 737–745), R1 = 5'-chloro, 5'-methyl; R2 = 2-hydroxy, 5-chloro, 5-methyl, benzo[e] (Biradar N.S., et al. *Monatsh. Chem.*, 1976, 107, 251–257).
- U komplexních sloučenin mědi obecného vzorce $[Cu(L)_2]$ byla zjištěna a v literatuře popsána jejich antimikrobiální (E. Coli, S. typhi, S. aureus a B. subtilis) a fungicidní aktivita (P. chrysogenum, A. niger, F. moniliforme a C. albicans). Měďnaté komplexy byly účinnější než penicilin vůči S. aureus a B. subtilis a inhibovaly růst P. chrysogenum, F. moniliforme a C. albicans (Habib I. S. et al., *Chemica Sinica*, 2011, 2, 27–32). Komplexy uvedeného vzorce byly také aktivní vůči viru kroužkovitosti tabáku TRSV (Mallikarjun K.G., *E-Journal of Chemistry*, 2005, 2, 58–61).

Komplexní sloučeniny měďnaté obsahující ve své struktuře 1,10-fenanthrolin nebo 2,2'-bipyridin nebo jejich deriváty vykazují široké spektrum biologických aktivit. Asi nejznámější skupinou těchto látek jsou tzv. Casiopeinas[®], což jsou komplexní sloučeniny obecného složení $[Cu(N-N)(N-O)]^+$ nebo $[Cu(N-N)(O-O)]^+$, kde (N-N) je 1,10-fenanthrolin nebo 2,2'-bipyridin nebo jejich různě substituované deriváty, (N-O) znázorňuje bidentátně koordinovaný anion esenciální aminokyseliny a (O-O) představuje bidentátně se koordinující aniont acetylacetonátu. (Serment-Guerrero, J. et al., *Toxicology in Vitro*, 2011, 25 (7), 1379–1384; Bravo-Gomez M. E. et al., *J. Inorg. Biochem.*, 2009, 103, 299–309; Trejo-Solis C. et al., *BMC Cancer*, 2012, 12, 156–170; patentové spisy US5 107 005A a US5 576 326A). V literatuře byly také popsány i další komplexní sloučeniny odvozené od tzv. Casiopeinas[®] náhradou acetylacetonátového ligandu za jiný bidentátně se koordinující O,O-ligand, například β -diketony (Almeida J.C. et al., *Polyhedron*, 2015, 89, 1–8; Vyas K. M. et al., *Polyhedron*, 2014, 80, 20–33; Omeregíe H.O. et al., *Arch. Appl. Sci. Res.*, 2010, 2(4) 7–16; Aliaga-Alcalde N. et al., *Inorg. Chem.*, 2010, 49, 9655–9663), α -diketony (Molčanov K. et al., *Dalton Trans.*, 2014, 43, 7208–7218), α -hydroxy karboxylové kyseliny (Carnallo R. et al., *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2001, 627, 948–954; Li Sha-Sha et al., *Z. Kristallogr. NCS*, 2014, 229, 131–132; Mobin S. M. et al., *Inorg. Chem.*, 2015, 54, 1293–1299; Jayamani A. et al., *Polyhedron*, 2014, 81, 764–776), deriváty flavonu (Wang Q. et al., *Med Chem Res*, 2014, 23, 2659–2666), deriváty kumarinu (Dholariya H.R. et al., *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2013, 108, 319–328), deriváty chinolonu (Efthimiadu E.K. et al., *Inorg.*

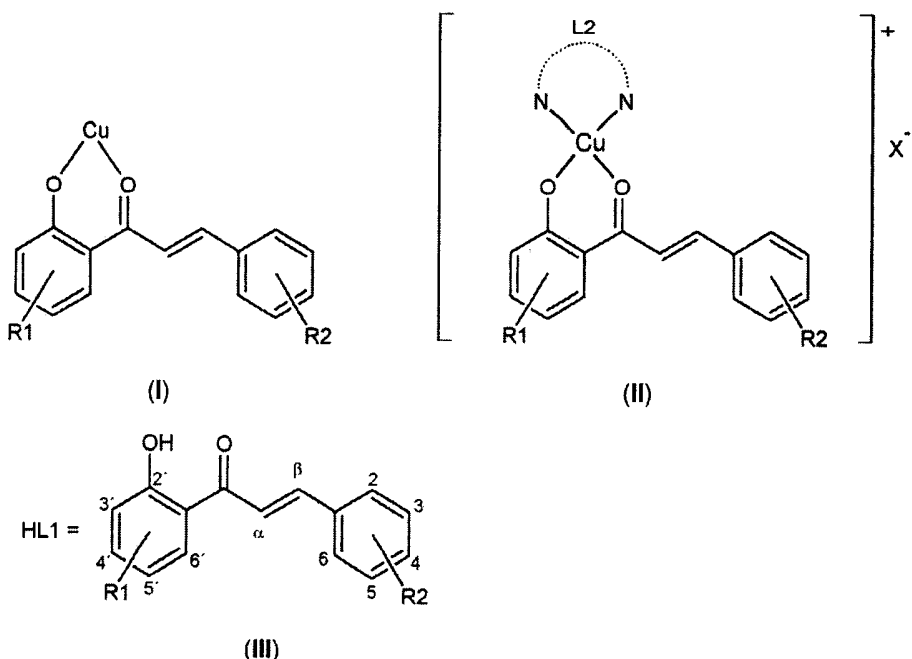
Chim. Acta., 2007, 360, 4093–4102; Efthimiadu E.K. et al., J. Inorg. Biochem., 2007, 101, 64–73; Buchtík R. et al., J. Inorg. Biochem., 2012, 116, 163–171; Buchtík R., et al., Dalton Trans., 2011, 40, 9404–9412; Trávníček Z. et al., Chem. Cent. J., 2012, 6, 160–171; patentové spisy CZ 304 045 B6, CZ 303 417 B6 a užitný vzor CZ 22 057 U1; Singh R. et al., Inorg. Chem. Commun., 2012, 23, 78–84; Psomas G. et al., J. Inorg. Biochem., 2006, 100, 1764–1773; Galani A. et al., Inorg. Chim. Acta., 2014, 423, 207–218) nebo maltolátu (Barvė A. et al., Inorg. Chem., 2009, 48, 9120–9132).

U výše zmíněných komplexních sloučenin typu $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{O}-\text{O})]^+$ byla protinádorová aktivita studována na různých nádorových liniích, přičemž ve srovnání s cisplatinou lze nalézt jak látky s nižší aktivitou než pro cisplatinu na dané nádorové linii (Almeida J.C. et al., Polyhedron, 2015, 89, 1–8; Barve A. et al., Inorg. Chem., 2009, 48, 9120–9132), tak látky s aktivitou srovnatelnou s cisplatinou (Aliaga-Alcalde N. et al., Inorg. Chem., 2010, 49, 9655–9663), tak látky s vyšší aktivitou než cisplatinu (Galani A. et al., Inorg. Chim. Acta., 2014, 423, 207–218; Wang Q. et al., Med Chem Res, 2014, 23, 2659–2666; Buchtík R. et al., J. Inorg. Biochem., 2012, 116, 163–171; Buchtík R., et al., Dalton Trans., 2011, 40, 9404–9412; Trávníček Z. et al., Chem. Cent. J., 2012, 6, 160–171; patentové spisy CZ 304 045 B6, CZ 303 417 B6 a užitný vzor CZ 22 057 U1).

Na základě literárního průzkumu lze konstatovat, že předložené komplexy mědi s deriváty (E)–1–(2'–hydroxyfenyl)–3–fenylprop–2–en–1–onu a bidentátně se koordinujícím N–donorovým ligandem typu 2,2'–bipyridinu nebo 1,10–fenanthrolinu představují zcela novou, v literatuře doposud nepopsanou skupinu biologicky aktivních komplexů mědi. Výsledky popsané v literatuře také jednoznačně prokazují, že záměna (O–O) ligandu v komplexních sloučeninách mědi obecného složení $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{O}-\text{O})]^+$ může vést k přípravě protinádorově aktivních sloučenin, ale tuto vlastnost nelze jednoznačně predikovat, neboť literární průzkum jasně ukázal, že sloučeniny uvedeného strukturního typu a složení mohou být také zcela protinádorově neaktivní.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou komplexy mědi v oxidačním stupni +II zahrnující strukturní motiv (I) obecného vzorce $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{L2})]\text{X}$ vyjádřeného strukturním vzorcem (II), kde symbol L1 znázorňuje aniont derivátu (E)–1–(2'–hydroxyfenyl)–3–fenylprop–2–en–1–onu strukturního vzorce (III), a symbol L2 symbolizuje bidentátně se koordinující N–donorový ligand typu 2,2'–bipyridinu nebo 1,10–fenanthrolinu nebo jejich alkyl nebo aryl derivátů,



kde:

- R1 a R2 představují substituenty nezávisle vybrané ze skupiny: atom vodíku, nitro skupina, hydroxy skupina, alkoxy skupina, amino skupina nebo libovolná kombinace těchto substituentů, přičemž amino skupina může být dále di-substituována alkylem,
- 5 – L2 představuje 2,2'-bipyridin nebo 1,10-fenanthrolin nebo jejich alkyl nebo aryl deriváty, především pak 5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridin, 4,4'-di(terc-butyl)-2,2'-bipyridin, 4,7-difenyl-1,10-fenanthrolin,
- X je aniont kyseliny nezávisle vybraný ze skupiny: F^- , Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , BF_4^- , BPh_4^- , $HCOO^-$, CH_3COO^- , ClO_4^- , HSO_4^- ,
- 10 a kde termín:
- alkyl představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec tvořený až 6 atomy uhlíku,
- aryl představuje fenyl.
- 15 Nedílnou podstatou vynálezu je farmakologický prostředek obsahující terapeuticky účinné množství měďnatých komplexů vzorce (II), nebo farmaceutickou kompozici měďnatých komplexů vzorce (II) s jedním či více přijatelnými nosiči a pomocnými látkami pro použití v lékařství pro léčbu nádorových onemocnění, zejména pak pro léčbu karcinomu děložního čípku a/nebo karcinomu prostaty a/nebo adenokarcinomu prsu a/nebo adenokarcinomu prostaty a/nebo hepatocelulárního karcinomu a/nebo osteosarkomu a/nebo plicního adenokarcinomu.
- 20

Objasnění výkresů

- 25 Konkrétní příklady provedení vynálezu jsou doloženy připojenými výkresy, kde
- Obr. 1 je infračervené spektrum komplexu 4 naměřené v oblasti 4000 až 400 cm^{-1} .
- Obr. 2 je hmotnostní spektrum komplexu 1
- Obr. 3 je hmotnostní spektrum komplexu 2
- Obr. 4 je hmotnostní spektrum komplexu 3
- 30 – Obr. 5 je hmotnostní spektrum komplexu 4
- Obr. 6 je hmotnostní spektrum komplexu 5
- Obr. 7 je hmotnostní spektrum komplexu 6

35 Příklady uskutečnění vynálezu

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

- 40 V níže uvedených příkladech byly připravené látky charakterizovány následujícími fyzikálně-chemickými metodami.
- elementární analýza se stanovením procentuálního zastoupení uhlíku, vodíku a dusíku (CHN(O)S analyzátor Flash 2000, Thermo Scientific),
- měření molární vodivosti roztoků komplexů v acetonitrilu (Cond340i/FET, WTW)
- 45 – infračervená spektroskopie (IR), kde bylo měření v oblasti 150 – 600 cm^{-1} (far-IR) a 400 až 4000 cm^{-1} (mid-IR) provedeno technikou ATR (Nexus 670 FT-IR, Thermo Nicolet)
- hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI+ technikou), (LCQ Fleet, Thermo Scientific)

Příklad 1: Obecná metoda přípravy a charakterizace měďnatých komplexů s deriváty 2-(2E)-(fenylprop-2-enoyl)-fenolátového aniontu a bidentátně se koordinujícím N-donorovým ligandem.

- 5 Jeden molární ekvivalent (0,5 mmol) derivátu (E)-1-(2'-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-onu byl rozpuštěn v dichloromethanu (15 ml) a k uvedenému roztoku byl za míchání při laboratorní teplotě (rozmezí 20 až 25 °C) přidán jeden molární ekvivalent (0,5 mmol) konkrétního bidentátního N-donorového ligandu rozpuštěný v methanolu (15 ml). Poté byl za stálého míchání
10 přidán po částech jeden molární ekvivalent triethylaminu (0,5 mmol) a jeden molární ekvivalent $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,5 mmol) rozpuštěný v methanolu (5 ml). Reakční směs byla následně 60 minut míchána a refluxována. Výsledná reakční směs byla poté zfiltrována a filtrát ponechán při laboratorní teplotě k volnému odpařování. Po několika dnech (2 až 5 dnů) se z reakční směsi vyloučila pevná fáze ve formě produktu obecného vzorce $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{L2})]\text{NO}_3$, který byl odfiltrován, ostře promyt ledovou vodou (10 ml), etanolem (5 ml) diethyletherem (5 ml), a poté vysušen
15 pod infralampou při 40 °C.

Komplex 1: Dusičnan {2-(2E)-(4-methoxyfenylprop-2-enoyl-KO)-4-methoxyfenoláto-KO}-(1,10-fenanthrolin- $\text{K}^2\text{N}^1:\text{N}^{10}$)měďnatý; $[\text{Cu}(\text{L1a})(\text{phen})]\text{NO}_3$. Výtěžek: 56 %. Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro
20 $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7\text{Cu}$: C, 59,13 (58,81); H, 3,93 (4,17); N, 7,13 (6,86)%. Λ_m (acetonitril, 25 °C, $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$): 139 (elektrolyt 1:1). Far-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 518, 494, 486, 463, 429, 401, 373, 309, 273, 265, 248. Mid-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3445, 3069, 2981, 2941, 2842, 1595, 1541, 1486, 1425, 1374, 1319, 1286, 1256, 1205, 1172, 1135, 1105, 1014, 969, 840, 801, 719, 603. ESI+MS: m/z 526 $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$.

25 Komplex 2: Dusičnan {2-(2E)-(5-nitro-2-hydroxyfenylprop-2-enoyl-KO)-4-methoxyfenoláto-KO}-(1,10-fenanthrolin- $\text{K}^2\text{N}^1:\text{N}^{10}$)měďnatý; $[\text{Cu}(\text{L1b})(\text{phen})]\text{NO}_3$. Výtěžek: 52 %. Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro
30 $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_9\text{Cu}$: C, 54,25 (53,97); H, 3,25 (3,13); N, 9,04 (8,72)%. Λ_m (acetonitril, 25 °C, $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$): 132 (elektrolyt 1:1). Far-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 577, 561, 497, 488, 460, 433, 417, 371, 344, 311, 277, 192. Mid-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3065, 2940, 2838, 2734, 1609, 1543, 1488, 1380, 1338, 1274, 1224, 1142, 1107, 1082, 1016, 973, 848, 825, 741, 719, 602. ESI + MS: m/z 557 $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$.

35 Komplex 3: Dusičnan {2-(2E)-(4-(N,N-dimethyl)-aminofenylprop-2-enoyl-KO)-fenoláto-KO}-(1,10-fenanthrolin- $\text{K}^2\text{N}^1:\text{N}^{10}$)měďnatý; $[\text{Cu}(\text{L1c})(\text{phen})]\text{NO}_3$. Výtěžek: 83 %. Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro
40 $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5\text{Cu}$: C, 60,89 (60,54); H, 4,23 (4,26); N, 9,79 (9,59)%. Λ_m (acetonitril, 25 °C, $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$): 128 (elektrolyt 1:1). Far-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 574, 516, 501, 477, 453, 433, 397, 301, 275, 245, 226, 202. Mid-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3061, 2901, 2821, 2644, 1590, 1526, 1486, 1433, 1364, 1333, 1307, 1178, 1150, 1030, 976, 842, 815, 774, 716, 654. ESI + MS: m/z 509 $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$.

45 Komplex 4: Dusičnan {2-(2E)-(4-(N,N-dimethyl)-aminofenylprop-2-enoyl-KO)-fenoláto-KO}-(5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridin- $\text{K}^2\text{N}^2:\text{N}^2$)měďnatý; $[\text{Cu}(\text{L1c})(\text{dmebpy})]\text{NO}_3$. Výtěžek: 84 %. Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro
50 $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5\text{Cu}$: C, 60,46 (60,35); H, 4,90 (5,08); N, 9,73 (9,46)%. Λ_m (acetonitril, 25 °C, $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$): 132 (elektrolyt 1:1). Far-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 572, 553, 505, 487, 477, 421, 405, 393, 375, 336, 316, 282, 227. Mid-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3036, 2900, 1596, 1530, 1483, 1438, 1409, 1364, 1334, 1308, 1253, 1229, 1203, 1183, 1153, 1065, 1035, 984, 942, 841, 814, 773, 752, 724, 655, 572, 506, 422. ESI + MS: m/z 513 $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$.

55 Komplex 5: Dusičnan {2-(2E)-(4-(N,N-dimethyl)-aminofenylprop-2-enoyl-KO)-fenoláto-KO}-(4,7-difeny-1,10-fenanthrolin- $\text{K}^2\text{N}^1:\text{N}^{10}$)měďnatý; $[\text{Cu}(\text{L1c})(\text{bphen})]\text{NO}_3$. Výtěžek: 47 %. Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro
 $\text{C}_{41}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5\text{Cu}$: C, 67,99 (67,84); H, 4,45 (4,66); N, 7,74 (7,46)%. Λ_m (acetonitril, 25 °C, S

$\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$): 133 (elektrolyt 1:1). Far-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 575, 548, 520, 501, 493, 476, 454, 407, 332, 296. Mid-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3346, 3051, 2902, 2860, 2807, 2179, 1592, 1563, 1523, 1484, 1442, 1405, 1362, 1305, 1229, 1202, 1183, 1169, 1154, 1030, 979, 944, 858, 822, 767, 705, 575. ESI + MS: m/z 611 $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$.

5

Komplex 6: Dusičnan $\{2-(2\text{E})-(4-(\text{N,N-dimethyl})\text{-aminofenylprop-2-enoyl-KO})\text{-fenolát-KO}\}-(4,4'\text{-di(terc-butyl)-2,2'-bipyridin-K}^2\text{N}^2:\text{N}^2)\text{měďnatý}$; $[\text{Cu}(\text{L1c}) (\text{dtbbpy})]\text{NO}_3$. Výtěžek: 72 %. Procentové zastoupení prvků C, H, N ve formě: vypočtená hodnota (v závorce nalezená hodnota) pro $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_5\text{Cu}$: C, 63,67 (63,39); H, 6,11 (6,34); N, 8,49 (8,25)%. Λ_m (acetonitril, 25 °C, S $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$): 141 (elektrolyt 1:1). Far-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 574, 553, 517, 500, 477, 421, 394, 317, 257. Mid-IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 3371, 3056, 2958, 2905, 2868, 1592, 1526, 1483, 1438, 1412, 1358, 1325, 1249, 1202, 1171, 1148, 1028, 969, 941, 896, 852, 815, 751, 716, 654, 602, 574, 500. ESI + MS: m/z 597 $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$.

15

Příklad 2: Stanovení cytotoxické aktivity in vitro na lidských nádorových liniích

Pro stanovení in vitro cytotoxické aktivity připravených komplexů byl použit MTT test. Metoda založená na schopnosti metabolicky aktivních buněk redukovat žlutou sůl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid (MTT) za vzniku modrého formazanového barviva. Jelikož k této přeměně dochází pouze v živých buňkách, lze tímto způsobem stanovit cytotoxicitu různých chemických látek. V rámci buňky jsou za redukci zodpovědné mitochondriální dehydrogenasy. Vznikající formazanové barvivo je nerozpustné a je následně kvantifikováno po rozpuštění v DMSO s amoniakem za použití klasického spektrofotometru (ELISA reader).

25

In vitro testy cytotoxické aktivity byly provedeny na sedmi lidských nádorových liniích: lidského epiteloidního karcinomu děložního čípku (HeLa), lidského karcinomu prostaty (22Rv1), lidského adenokarcinomu prsu (MCF-7), lidského adenokarcinomu prostaty (PC-3), lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2), lidského osteosarkomu (HOS) a lidského adenokarcinomu plic (A549). Buňky byly udržovány v plastických lahvích v DMEM médiu (5g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný).

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 látky byly nejprve rozpuštěny 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_2 . 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.

Koncentrace testovaných komplexů (μM) toxická pro 50 % vložených nádorových buněk (inhibiční konstanta IC_{50}) byly vypočteny z koncentračních křivek.

Tabulka 1. Výsledky in vitro cytotoxicity komplexů 1–6 a derivátů chalkonů HL1a–c vůči nádorovým liniím lidského epiteloidního karcinomu děložního čípku (HeLa), lidského karcinomu prostaty (22Rv1), lidského adenokarcinomu prsu (MCF-7), lidského adenokarcinomu prostaty (PC-3), lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2), lidského osteosarkomu (HOS) a lidského adenokarcinomu plic (A549).

Komplex	HeLa	22Rv1	MCF-7	PC-3	HepG2	HOS	A549
1	3,4±0,1	5,4±0,4	9,2±1,4	15,7±1,6	5,6±0,4	4,3±0,6	3,7±0,4
2	3,2±0,1	3,5±0,5	9,8±1,0	11,4±0,8	4,3±0,5	4,3±0,4	3,5±0,3
3	3,2±0,1	3,3±0,4	5,8±0,2	11,8±0,8	4,1±0,3	3,9±0,1	3,1±0,1
4	3,3±0,2	7,9±0,6	13,7±1,8	>50	17,5±1,3	5,0±1,0	10,2±5,0
5	2,0±0,1	1,0±0,1	1,6±0,1	2,3±0,2	2,3±0,5	2,1±0,1	2,1±0,2
6	3,2±0,2	3,9±0,4	17,7±0,9	16,8±2,6	6,9±1,3	4,6±0,9	3,3±0,1
HL1a*	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
HL1b*	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
HL1c*	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
CDDP	27,0±5,3	18,2±0,8	23,0±2,6	>50	>50	>50	>50

* HL1a = (E)-1-(2'-hydroxy-4'-methoxyfenyl)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on,

HL1b = (E)-1-(2'-hydroxy-4'-methoxyfenyl)-3-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)prop-2-en-1-on,

HL1c = (E)-1-(2'-hydroxyfenyl)-3-(4-(N,N-dimethyl)aminofenyl)prop-2-en-1-on,

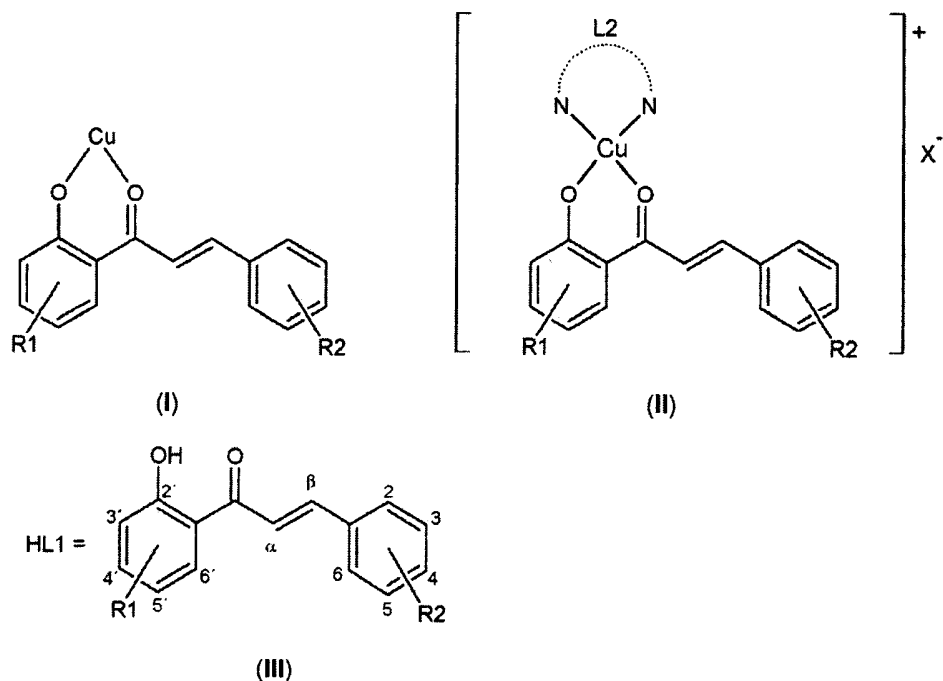
CDDP = cis-diammin-dichloridoplatnatý komplex (cisplatina).

5

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Komplexy mědi v oxidačním stupni +II zahrnující strukturní motiv (I) obecného vzorce [Cu(L1)(L2)]X vyjádřeného strukturním vzorcem (II), kde symbol L1 znázorňuje aniont derivátu (E)-1-(2'-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-onu strukturního vzorce (III), a symbol L2 symbolizuje bidentátně se koordinující N-donorový ligand typu 2,2'-bipyridinu nebo 1,10-fenanthrolinu nebo jejich alkyl nebo aryl derivátů,

10



15

kde

– R1 a R2 představují substituenty nezávisle vybrané ze skupiny: atom vodíku, nitro skupina, hydroxy skupina, alkoxy skupina, amino skupina nebo libovolná kombinace těchto substituentů, přičemž amino skupina může být dále di-substituována alkylem,

20

– L2 představuje 2,2'-bipyridin nebo 1,10-fenanthrolin nebo jejich alkyl nebo aryl deriváty, především pak 5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridin, 4,4'-di(terc-butyl)-2,2'-bipyridin, 4,7-difenyl-1,10-fenanthrolin,

– X je aniont kyseliny nezávisle vybraný ze skupiny: F^- , Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , BF_4^- , BPh_4^- , $HCOO^-$, CH_3COO^- , ClO_4^- , HSO_4^- ,

a kde termín:

– alkyl představuje rozvětvený nebo nerozvětvený uhlovodíkový řetězec tvořený až 6 atomy uhlíku,

– aryl představuje fenyl.

10

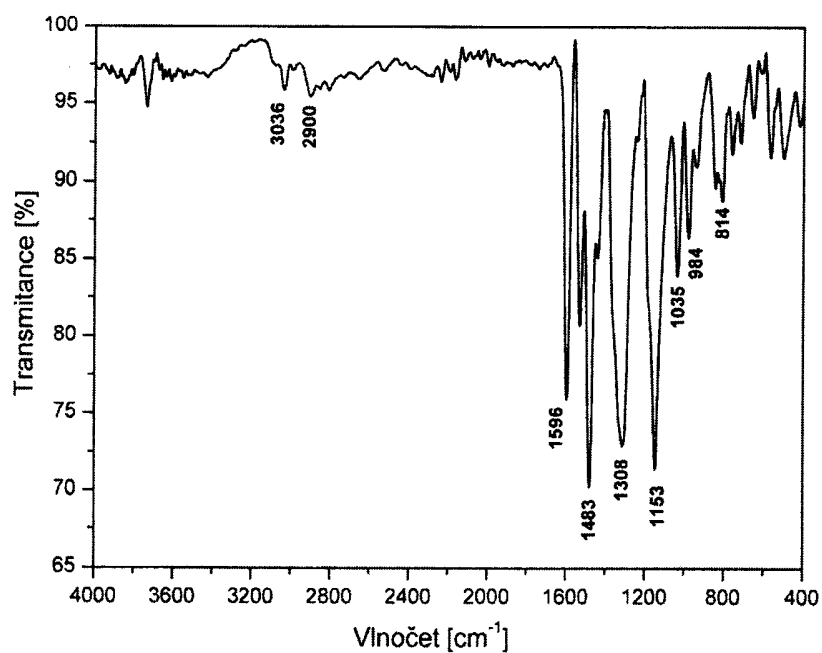
2. Farmakologický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje terapeuticky účinné množství komplexů mědi vzorce (II) podle nároku 1 s jedním či více přijatelnými nosiči a pomocnými látkami.

15

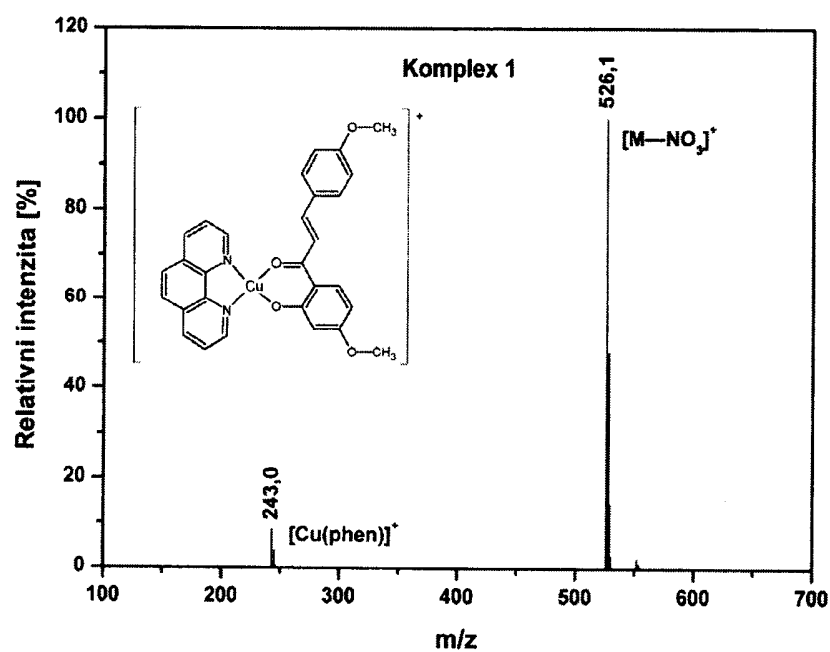
3. Farmakologický prostředek podle nároku 2 pro použití k výrobě léčiv pro léčbu nádorových onemocnění, zejména pak pro léčbu karcinomu děložního čípku a/nebo karcinomu prostaty a/nebo adenokarcinomu prsu a/nebo adenokarcinomu prostaty a/nebo hepatocelulárního karcinomu a/nebo osteosarkomu a/nebo plicního adenokarcinomu.

20

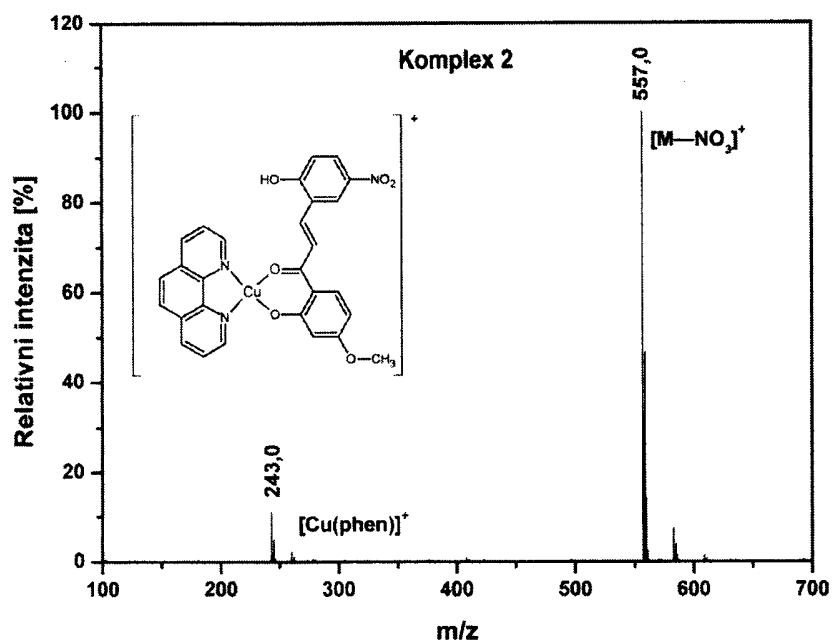
4 výkresy



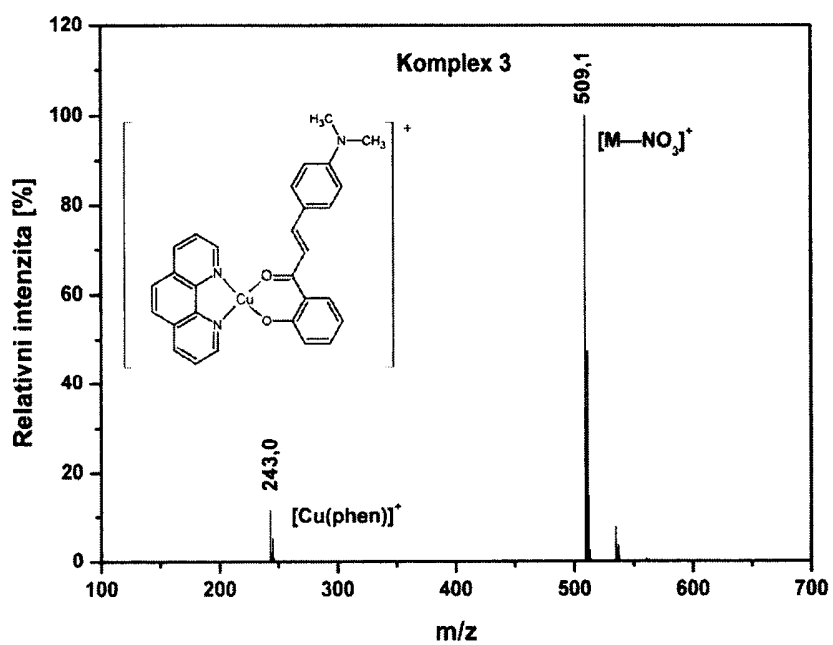
Obr. 1



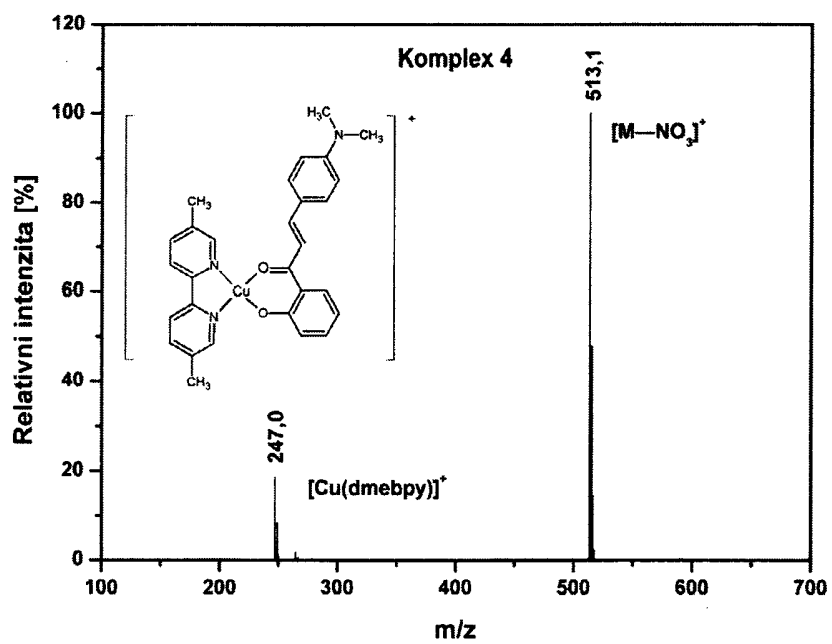
Obr. 2



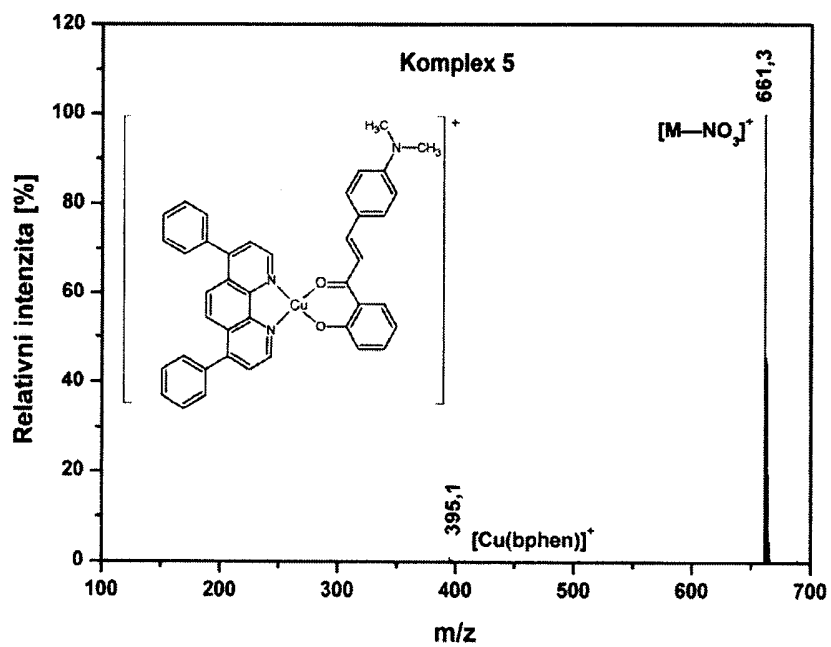
Obr. 3



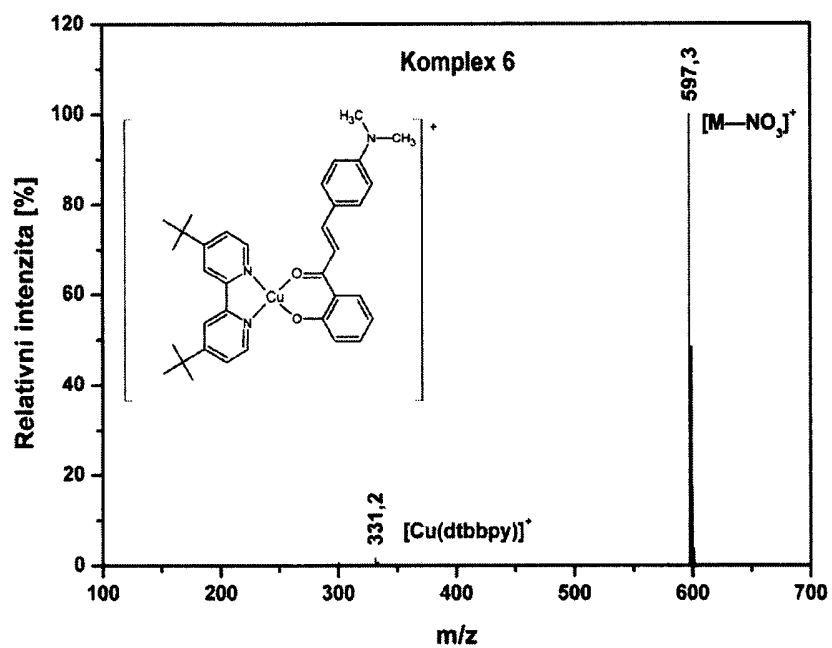
Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7

Konec dokumentu
