

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Vybrané NAMPT inhibitory ako ligandy biologicky
perspektívnych koordinačných zlúčenín**

Autor: Bc. Klaudia Máliková

Študijný odbor: Bioanorganická chémia

Typ štúdia: Prezenčné

Vedúci práce: doc. Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

Termín odovzdania práce: 10. 6. 2020

Olomouc 2020

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu *Vybrané NAMPT inhibitory ako ligandy biologicky perspektívnych koordinačných zlúčenín* som napísala samostatne pod odborným vedením doc. Mgr. Pavla Štarhu, Ph.D. Všetky použité literárne a iné odborné zdroje sú uvedené na konci práce. Ako autor tiež prehlasujem, že som v súvislosti s jej vytvorením neporušila autorské práva tretích osôb. Súhlasím s tým, aby bola moja práca prístupná v knižnici Katedry anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dňa

.....

Bc. Klaudia Málíková

Rada by som poďakovala doc. Mgr. Pavlovi Štarhovi, Ph.D. za odborné vedenie, rady a trpezlivosť pri vypracovávaní mojej diplomovej práce. Tiež sa chcem poďakovať kolektívu výskumného oddelenia Biologicky aktívne komplexy a molekulárne magnety Regionálneho centra pokročilých technológií a materiálov (RCPTM), kde bola prevedená väčšina experimentálnej časti práce, a katedry anorganickej chémie Prírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za pomoc s prevedením príslušných meraní a ich vyhodnotením. Menovite chcem poďakovať doc. Mgr. Pavlovi Štarhovi, Ph.D. za prevedenie NMR spektrometrie a pomoc s interpretáciou nameraných dát, RNDr. Bohuslavovi Drahošovi, Ph.D. a Mgr. Petrovi Antalovi, Ph.D. za pomoc s prevedením hmotnostnej a FT-IR spektrometrie. V neposlednej rade chcem poďakovať vedúcemu Katedry anorganickej chémie, doc. Ing. Radovanovi Herchlovi, Ph.D., za možnosť venovať sa predloženej práci spoločne na RCPTM a katedre anorganickej chémie.

Práca vznikla za finančnej podpory projektu GAČR 17-08512Y.

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora: Bc. Klaudia Málíková

Názov práce: Vybrané NAMPT inhibítory ako ligandy biologicky perspektívnych koordinačných zlúčenín

Typ práce: Diplomová

Pracovisko: oddeleneie Biologicky aktivní komplexy a molekulární magnety, Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů (RCPTM), Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedúci práce: doc. Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Abstrakt: NAMPT inhibítory sú novou triedou látok, ktoré sú schopné inhibovať nikotínamidfosforibozyltransferázu, nadmerne exprimovaný enzým v niektorých typoch nádorových buniek. Zastavujú tak premenu nikotínamidu na nikotínamid mononukleotid, čím dochádza ku ukončeniu proliferácie týchto buniek. Cieľom tejto práce bolo pokúsiť sa nasyntetizovať NAMPT inhibítor APO866 ((*E*)-*N*-[4-(1-benzoylpiperidín-4-yl)butyl]-3-(pyridín-3-yl)akrylamid)) a použiť tento inhibítor ako biologicky aktívny ligand koordinovaný cez pyridín v štruktúre polosendvičových multi-cieľových komplexov vybraných prechodných kovov (napr. Ru). Aj napriek neúspešnej syntéze inhibítora APO866 sa podarilo pripraviť radu biologicky perspektívnych komplexov Ru, Rh, Os a Ir, ktoré boli charakterizované pomocou NMR, FT-IR a hmotnostnej spektrometrie, pričom niektoré z nich predstavujú vhodné prekurzory pre následnú prípravu multi-cieľových komplexov.

Kľúčové slová: ruténium, NAMPT inhibítory, multi-cieľové komplexy, syntéza, charakterizácia

Počet strán: 93

Jazyk: Slovenčina

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Klaudia Málíková

Title: Selected NAMPT inhibitors as ligands of biologically prospective coordination compounds

Type of thesis: Diploma

Department: Research division of Biologically-active complexes and molecular magnets, Regional Center of Advanced Technologies and Materials (RCPTM), Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic

Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic

Supervisor: doc. Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: NAMPT inhibitors are a new class of compounds that are able to inhibit nicotinamide phosphoribosyltransferase, an enzyme, which is overexpressed in some types of tumor cells. They stop the conversion of nicotinamide to nicotinamide mononucleotide, thus stopping the proliferation of these cells. The aim of this work was to try to synthesize the NAMPT inhibitor APO866 ((*E*)-*N*-[4-(1-benzoylpiperidine-4-yl)butyl]-3-pyridine-3-ylprop-2-enamide) and use this inhibitor as a biologically active ligand coordinated through pyridine within half-sandwich multi-targeted complexes of selected transition metals (e.g. Ru). Despite the unsuccessful synthesis of the APO866 inhibitor, a number of biologically promoting Ru, Rh, Os and Ir complexes have been prepared and characterized by NMR, FT-IR and mass spectrometry, some of which are suitable precursors for the subsequent preparation of multi-targeted complexes.

Keywords: ruthenium, NAMPT inhibitors, multi-targeted complexes, synthesis, characterization

Number of pages: 93

Language: Slovak

OBSAH

1	ÚVOD A CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE.....	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
	2.1 Protinádorovo aktívne komplexy platiny	9
	2.1.1 Multi-cieľové komplexy na báze platiny	12
	2.2 Protinádorovo aktívne komplexy ďalších platinových kovov	16
	2.2.1 Protinádorovo aktívne komplexy ruténia	16
	2.2.2 Protinádorovo aktívne komplexy ródia	23
	2.2.3 Protinádorovo aktívne komplexy osmia	26
	2.2.4 Protinádorovo aktívne komplexy irídia	29
	2.3 NAMPT inhibítory	30
	2.3.1 Biologický účinok NAMPT inhibítorov	33
	2.3.2 Štruktúrne typy NAMPT inhibítorov	38
	2.3.3 Multi-cieľové komplexy s NAMPT inhibítormi	43
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	46
	3.1 Použité je a chemikálie	46
	3.2 Syntéza	47
	3.2.1 Syntéza NAMPT inhibítora.....	47
	3.2.2 Syntéza komplexných zlúčenín	48
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	62
	4.1 Syntéza	63
	4.2 NMR spektrometria	64
	4.3 Hmotnostná spektrometria	68
	4.4 Infračervená spektrometria.....	70
5	ZÁVER	72
6	LITERATÚRA.....	73

1. ÚVOD A CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

Bioanorganická chémia ako samostatne existujúci odbor sa datuje približne od roku 1960, a to predovšetkým vďaka komplexom technécia a platiny. V tejto dobe bolo objavené využitie zlúčenín technécia ako kontrastných látok v zobrazovacej diagnostike, a to konkrétne v roku 1964, kedy bolo použité ^{99m}Tc ako rádioindikátor Chicagskou univerzitou.¹ Najznámejšou látkou na báze platiny s protinádorovými účinkami, takzvaným „penicilínom rakoviny“, sa bez pochyb stala zlúčenina *cis*-diammín-dichloroplatnatý komplex, *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], s triviálnym názvom cisplatina. Od schválenia FDA v roku 1978 je rozhodne dodnes jedným z najpoužívanějších kancerostatík.¹⁻⁴ V dnešnej dobe sú čím ďalej tým viac používané práve deriváty tejto zlúčeniny. Medzi najznámejšie liečivá v klinickej praxi patria oxaliplatina ((1*R*,2*R*)-cyklohexán-1,2-diammín-oxalátplatnatý komplex) a karboplatina (diammín-[1,1'-cyklobutándikarboxyláto(2-)]-O,O'-platnatý komplex).⁵

Okrem pozitívneho účinku však všetky tieto kancerostatiká majú na organizmus aj negatívny dopad. Každé z nich je účinné len na vybrané typy nádorov a vedľajšie účinky sú častokrát veľmi rozsiahle. Medzi najčastejšie patria hematologické poruchy (anémia, trombóza, neutropénia či trombocytopenia), gastrointestinálne poruchy (nauzea, zvracanie, tráviace ťažkosti, zmeny chuti jedla), neurologické poruchy, bolesti hlavy, depresie, úzkosti, poruchy spánku a ostatné nie menej podstatné poruchy ako alopecia či strata plodnosti pacientov.

Dlhodobou snahou bioanorganickej chémie je vývoj koordinačných zlúčenín rôznych prechodných kovov, ktoré by vykazovali výraznú biologickú aktivitu, avšak ich negatívne vedľajšie účinky by boli nižšie. Dôležitou vlastnosťou biologicky aktívnych komplexov je potom možnosť ich derivatizácie bioaktívnymi substituentmi, čím vznikajú tzv. multi-cieľové (z angl. *multi-targeted*) komplexy. Tento inovatívny prístup vývoja nových liečiv je využitý tiež v predloženej práci, ktorá má za cieľ modifikáciu biologicky aktívnych polosendvičových komplexov vybraných prechodných kovov (prednostne ruténia a irídia) vybraným vysoko protinádorovo aktívnym NAMPT inhibítorom APO866 (FK866; Daporinad; (*E*)-*N*-[4-(1-benzoylpiperidín-4-yl)butyl]-3-(pyridín-3-yl)akrylamid). Vo všeobecnosti možno povedať, že mechanizmus účinku NAMPT inhibítorov je založený na inhibícii nikotínamid fosforibozyltransferázy, enzýmu, ktorý je nadmerne exprimovaný v niektorých typoch rakovinových buniek, a je teda odlišný od samotných východných komplexov, ktoré sú známe ako modulátory redoxného štatútu cieľových nádorových buniek.

Cieľom teoretickej časti predloženej diplomovej práce bolo vypracovať literárnu rešerš na tému protinádorovo aktívnych komplexov prechodných kovov so zameraním na platinové kovy Pt, Ru, Rh, Os a Ir. Ďalej je teoretická časť zameraná na prehľad inhibítorov nikotínamid fosforibozyltransferázy (NAMPT) a jej doteraz pripravených komplexov vybraných prechodných kovov. S ohľadom na tému diplomovej práce je literárna rešerš zameraná aj na iné typy multi-cieľových komplexov, predovšetkým odvodených od zmienovaných prechodných prvkov.

V experimentálnej časti bolo cieľom pripraviť NAMPT inhibítor APO866 ((*E*)-*N*-[4-(1-benzoylpiperidín-4-yl)butyl]-3-(pyridín-3-yl)akrylamid) a jeho polosendvičové komplexy s vybranými prechodnými kovmi. Cieľom tiež bolo tieto zlúčeniny v spolupráci s vedúcim práce a zamestnancami RCPTM a katedry anorganické chemie PrF UP v Olomouci fyzikálne-chemicky charakterizovať vhodnými analytickými metódami.

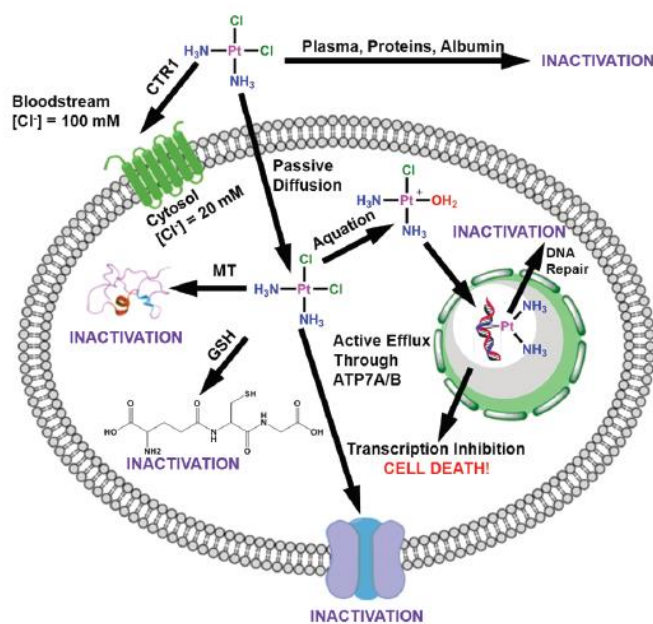
2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Protinádorovo aktívne komplexy platiny

Platina je vzácny kov s protónovým číslom 78, ktoré ho radí do triády ťažkých platinových kovov. Patrí do VIII. vedľajšej skupiny (10. podľa IUPAC) periodickej sústavy prvkov a nachádza sa v šiestej perióde. Stabilné oxidačné stavy, v ktorých sa vyskytuje vo svojich zlúčeninách sú II a IV.

Ako už bolo spomínané, prvou a najznámejšou platnatou protinádorovou zlúčeninou sa stala práve cisplatina. Jej antiproliferatívne účinky boli prvý krát popísané Barnettom Rosenbergom v roku 1965. Po vyše desiatich rokoch bola táto látka schválená FDA a začala sa používať na liečbu rakoviny semenníkov, u ktorej liečba zdvihla mieru prežitia z 10 % na 90 %. Okrem iného sa používa na liečbu rakoviny močového mechúra, vaječníkov, karcinómov hlavy a krku, nemalobunkového nemetastázového karcinómu pľúc, malígneho mezoteliómu či pokročilej rakoviny krčka maternice. Princíp mechanizmu účinku cisplatiny spočíva v tom, že sa viaže na bunkovú DNA

pomocou proximálnych nukleových báz, ktoré tvoria vnútrovláknové a medzivláknové cross-link väzby. Štruktúra cisplatina-DNA môže byť rozpoznaná nukleárnymi proteínmi skupiny HMG (high mobility group), ktoré ju chránia pred opravou nukleotidovým vyrezaním po väzbe, čo nakoniec vedie ku apoptóze.⁶⁻¹⁰

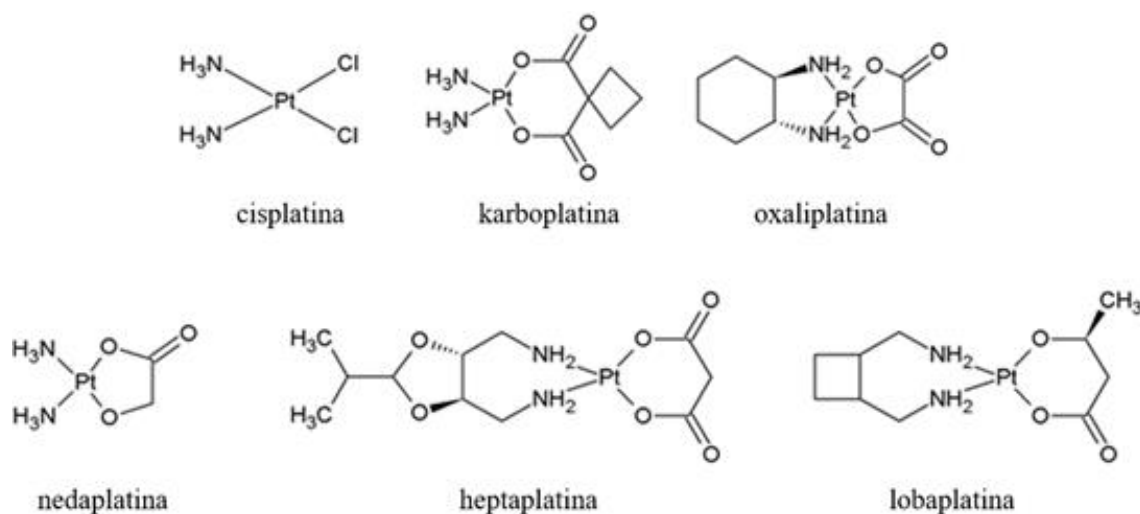


Obrázok 1: Reakcie cisplatiny pred a po vstupe do bunky.¹⁰

S používaním cisplatiny, rovnako ako ďalších Pt(II) komplexov, však súvisia aj mnohé nevýhody. Najvýraznejšou je vývoj rezistencie voči tejto liečbe, ktorá môže byť vrodená alebo aj získaná v priebehu liečby. Vrodená je výsledkom spontánnych mutácií vyskytujúcich sa pri delení buniek v dôsledku genetickej nestability. Získaná rezistencia vzniká ako dôsledok expozície chemoterapeutickému činidlu. Ďalšou, nie menej podstatnou nevýhodou, sú vedľajšie

účinky liečby týmto liečivom. Najčastejšími sú hematologické poruchy, gastrointestinálne poruchy, neurologické poruchy, bolesti hlavy, depresie, úzkosti, poruchy spánku a iné poruchy ako alopécia či strata plodnosti pacientov. Práve preto bola vyvinutá druhá a tretia generácia platnatých komplexov s kancerostatickým účinkom, pričom druhá generácia má zmenenú odstupujúcu skupinu a tretia generácia typ amínu.¹¹⁻¹³

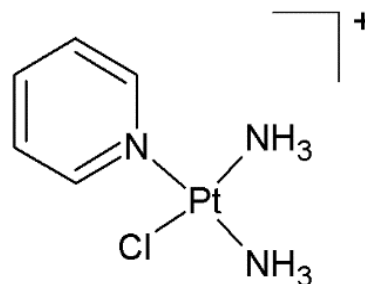
Medzi Pt(II) komplexy, ktoré sa dostali do klinickej praxe okrem cisplatiny patria karboplatina a oxaliplatina, ktoré boli už spomínané v prechádzajúcej kapitole, rovnako ako nedaplatina (diammín-glykolátoplatnatý komplex), heptaplatina ((4*R*,5*R*)-4,5-bis(aminometyl)-2-izopropyl-1,3-dioxolán-malónatoplatnatý komplex) a lobaplatina (1,2-bis(aminometyl)cyclobután-laktátoplatnatý komplex) (*obr. 2*). Posledné tri spomínané sa môžu používať len v Ázii. Karboplatina má rovnaké spektrum využitia ako cisplatina, avšak vykazuje menej nežiaducich účinkov. Oxaliplatina však naopak reaguje na odlišné typy nádorov v porovnaní s cisplatinou, napríklad najväčšie využitie nachádza v liečbe rakoviny hrubého čreva a konečníku. Nedaplatina sa používa pri liečbe rakoviny pľúc, pažeráku a nádorov hlavy a krku. V porovnaní s cisplatinou má výrazne nižšiu nefrotoxicitu.^{6,14-17}



Obrázok 2: Štruktúrne vzorce cisplatiny, karboplatiny, oxaliplatiny, nedaplatiny, heptaplatiny a lobaplatiny.

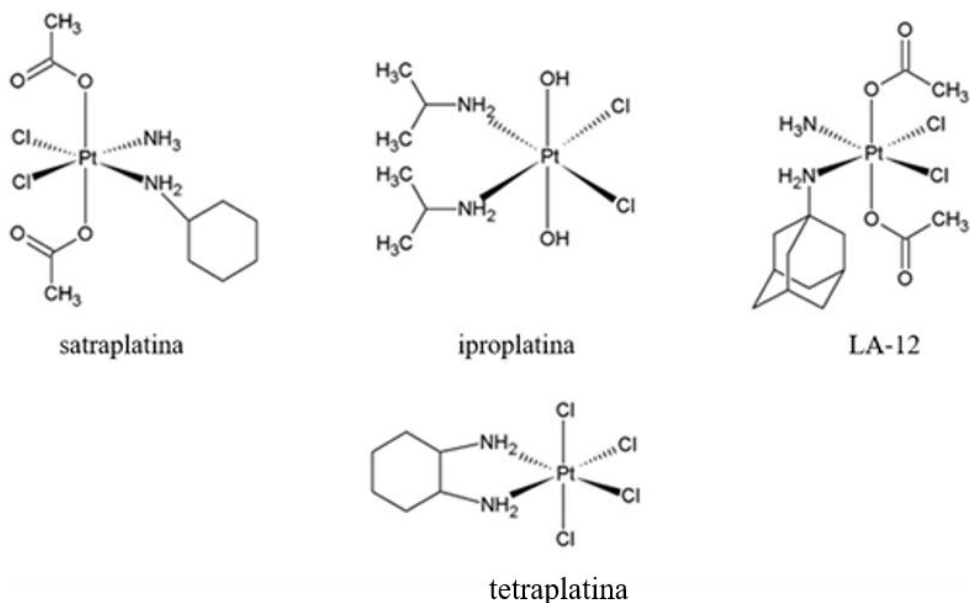
Bol pripravený aj nekonvenčný Pt(II) komplex. Konkrétne sa jedná o pyriplatinu (chlorid *cis*-diammín(pyridín)chloroplatnatý; *obr. 3*), ktorá sa radí medzi nekonvenčné, pretože je monofunkčným komplexom, čo znamená, že sa môže na DNA viazať len cez jedno

koordinačné miesto. Po absorpcii bunkou cez organické kationové transportéry, čím vytvorí monofunkčný adukt a zastaví tak RNA polymerázu II. Adukty môžu byť opravené mechanizmom nukleotidovej excisnej opravy podobne ako u cisplatiny, ale menej efektívne. Ďalším pripraveným monofunkčným komplexom bola fenantriplatina, ktorá vykazovala počas testovania lepšie výsledky IC₅₀ ako cisplatina či oxaliplatina.¹⁸⁻²¹



Obrázok 3: Štruktúrny vzorec pyriplatiny.

Vedľajšie účinky konvenčných liečiv začali vedci riešiť aj strategicky inou cestou ako vývojom ďalších Pt(II) liečiv. Skúsili cestu Pt(IV) proliečiv, ktoré sú derivátom účinného Pt(II) liečiva. Sú v tele metabolizované, respektíve aktivované, a uvoľňujú tak aktívne Pt(II) liečivo. Výhoda Pt(IV) komplexov spočíva v tom, že vstupujú do bunky v tomto oxidačnom stave, ktorý spôsobuje, že sú kineticky inertnejšie a tým sú menej náchylné podľahnúť reakciám na ceste k nádoru. Pred uskutočnením akejkoľvek substitučnej reakcie je nutná redukcia na Pt(II). Prítomnosť ďalších dvoch ligandov v porovnaní s Pt(II) liečivami umožňuje modifikáciu dôležitých chemických vlastností liečiva ako sú napríklad lipofilita, rozpustnosť či redukčný potenciál. Môže to tiež posilňovať účinky liečby, pretože ligandy umiestnené v axiálnych polohách môžu byť sami o sebe biologicky aktívne a po redukcii komplexu sa uvoľnia v bunke. Doteraz sa do fázy klinického testovania dostali štyri takéto komplexy, a to iproplatina (*cis,trans,cis*-dichloro-dihydroxo-bis(izopropylamín)platičitý komplex), tetraplatina (tetrachloro-(1,2-diaminocyklohexán)-platičitý komplex), LA-12 (*trans,cis,cis*-bis(acetáto)-1-adamatylamín-ammín-dichloroplatičitý komplex) a satraplatina (*trans,cis,cis*-bis(acetáto-ammín-dichlorocyklohexylamínplatičitý komplex) (*obr. 4*). Od prvých dvoch bolo upustené, pretože buď vykazovali nižšiu cytotoxicitu ako cisplatina alebo naopak, v prípade tetraplatiny, vykazovali vysokú toxicitu. Tieto typy liečiv sa musia chemicky aktivovať, čo môže byť napríklad fotoaktiváciou proliečiva v rámci fotodynamickej terapie.^{10,22-26}



Obrázok 4: Štruktúrne vzorce Pt(IV) komplexov: satraplatina, iproplatina, LA–12 a tetraplatina.

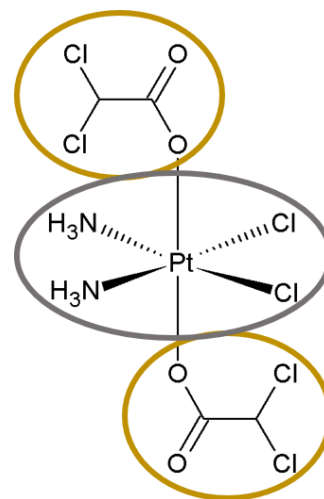
2.1.1. Multi-cieľové komplexy na báze platiny

V klinickej terapii boli dlho využívané liečivá zacielené na jedinú bunkovú štruktúru. U niektorých ochorení však tento prístup nestačí, najmä u vybraných typov rakoviny. Preto boli vyvinuté liečivá, ktoré sa súčasne zameriavajú na viacero štruktúr v bunke a zlepšujú tak účinnosť liečby. Schopnosť zamerať sa na viac cieľov môže znižovať aj pravdepodobnosť získanej rezistencie. Na účinnejšiu liečbu rakoviny sa používa „koktejlová“ terapia, ktorá spočíva v kombinácii liekov – viac liekov s viacerými činidlami a viaczložkových liekov – jedno liečivo s viacerými látkami. Takáto terapia preto vykazuje niekoľko výhod. Liečivá môžu pôsobiť na dva alebo viac cieľov, čím sa môžu prejavovať viacnásobne zosilnené terapeutické účinky. Tiež blokovaním dvoch alebo viacerých signálnych či metabolických ciest sa môže znížiť možnosť vrodenej alebo získanej rezistencie. Táto terapeutická stratégia by tak mohla viesť ku efektu 1+1>2, čo výrazne zlepšuje prognózu pacientov. Výhodu tejto liečby však znižuje zlá poddajnosť u pacientov, nepredvídateľne vysoké náklady, vedľajšie účinky a premenlivá miera metabolizovania liečiv u pacientov.²⁷

Alternatívne je možné cieľnú terapiu dosiahnuť použitím jednej chemickej entity, ktorá pôsobí na viac cieľov súčasne (*obr. 5*). V princípe je táto stratégia založená na aplikácii stabilného proliečiva, ktoré se po akumulácii do cieľovej bunky a následnej aktivácii vhodným vonkajším podnetom (napr. ožiarenie alebo enzymatické štiepenie) cielene rozkladá na aspoň

dve bioaktívne častice (napr. komplexná častica a uvoľnený ligand). Táto multi-cieľová (z angl. *multi-targeted*) stratégia má v porovnaní s „koktejlovou“ terapiou odlišný profil využitia a rizík. Má rozhodne zjednodušený metabolizmus a menej liekových interakcií, čo uľahčuje jeho podanie. Multi-cieľové liečivá sa tiež vyznačujú lepšou rozpustnosťou a ľahším prenosom cez membránu. V prípade využitia komplexov, ktoré sa kovalentne viažu na DNA môže byť v prípade použitia bioaktívneho ligandu ovplyvnený aj spôsob ich väzby na DNA.

Bola pripravená séria Pt(IV) multi-cieľových komplexov, ktoré okrem poškodenia DNA dosahujú súčasne rôzne synergické účinky. Dichlóracetátový ligand v komplexe *cis,trans,cis*-[Pt(NH₃)₂(O₂CHCl₂)₂Cl₂] (mitaplatina) pôsobí ako inhibítor pyruvátdehydrogenázy kinázy (obr. 5). Asplatina (*cis,cis,trans*-[PtCl₂(NH₃)₂(OH)(aspirín)]) obsahujúca aspirínový ligand vykazuje ďalšiu protizápalovú aktivitu. Platičitý komplex konjugovaný s analógom vitamínu E môže spôsobovať poškodenie mitochondrií. Chalcoplatina významne indukuje aktiváciu proteínu p53. Derivát oxaliplatiny konjugovaný s kyselinou valproovou je zameraný na enzým históndeacetylázu. Účinným spôsobom dizajnovania multi-cieľových kancerostatických komplexov je naviazanie jedného alebo viacerých organických ligandov so špecifickou biologickou aktivitou na kovové centrum. Multi-cieľové komplexy pôsobia na rast nádoru, metastázovanie, zvyšujú účinnosť liečby a znižujú rezistentnosť voči kovovému komplexu. Okrem toho môžu bioaktívne ligandy zosilňovať molekulárne ciele kovového komplexu ako takého. Spôsob aktivácie jednotlivých multi-cieľových komplexov sa však môže odlišovať. Bioaktívny ligand sa rovnako ako zvyšná cytotoxická časť obsahujúca kov uvoľní z multi-cieľového komplexu vo forme proliečiva, alebo naopak, sa môže bioaktívny ligand uvoľňovať z neaktívneho komplexu kovu.²⁸⁻³²



Obrázok 5: Štruktúrny vzorec mitaplatiny s farebných rozlíšením dvoch funkcionalít.

V prípade využitia biologicky aktívnych ligandov v axiálných polohách je diskutované o „duálnych liečivách“. Duálny mechanizmus liečiva je popisovaný v prípade, že liečivo obsahuje dva rôzne typy ligandov, jeden tzv. nevinný, ako napríklad hydroxid či acetát, a druhý

typ, ktorý je bioaktívny, ako napríklad ibuprofen. Okrem liečiv s cieľným dvojitým účinkom sú známe aj liečivá s trojitým účinkom, ktoré obsahujú dva rôzne bioaktívne ligandy. Medzi Pt(IV) zlúčeniny s dvojitým účinkom patria napríklad etakraplatina (*obr. 6*), ktorá má základ cisplatinu, no obe axiálne polohy tejto zlúčeniny sú obsadené kyselinou etakrynovou. Táto látka bola nadizajnovaná ako pokus racionálne prekonať rezistenciu na cisplatinu. Jedným z mechanizmov rezistencie voči nej je jej intracelulárna inaktivácia glutatiómom (GSH), ktorý je prítomný v bunkách v mM koncentráciách. Tento tripeptid sa kovalentne viaže na cisplatinu,

čím bráni jej väzbe na DNA

a uľahčuje jej vylúčenie z bunky.

Väzba GSH na cisplatinu je katalyzovaná glutatión-S-

transferázou (GST). Inhibícia GST

by preto bola vhodným riešením

problému rezistencie voči cisplatinu.

Etakrynová kyselina je inhibítorom

GST enzýmu a preto je etakraplatina,

ktorá uvoľňuje jej dva ekvivalenty

v bunke, sľubne navrhnutým

proliečivom s dvojitým účinkom.

Avšak aj napriek znižovaniu bunkovej aktivity a preukázanej lepšej účinnosti v porovnaní

s cisplatinou, vykazuje po 72 hodinách iba mierny cytotoxický účinok. Bolo pripravených aj

mnoho ďalších Pt(IV) derivátov cisplatinu a oxaliplatinu s ibuprofenom, indometacínom,

valproátom či fenylobutyrátom v axiálnych polohách.³³⁻³⁶

Metabolická dráha glukózy v nádorových bunkách je atraktívnym cieľom

chemoterapie, ktorej vhodným riešením je dichlóracetát (DCA), ktorý je účinným inhibítorom

glykolózy. DCA stimuluje oxidačnú fosforyláciu inhibíciou pyruvátdehydrogenázovej kinázy

(PDK), čo vedie k zvýšenému vychytávaniu pyruvátu v mitochondriách a uľahčuje oxidáciu

glukózy, ktorá môže zvrátiť potlačenú mitochondriálnu apoptózu pozorovanú u rakovinových

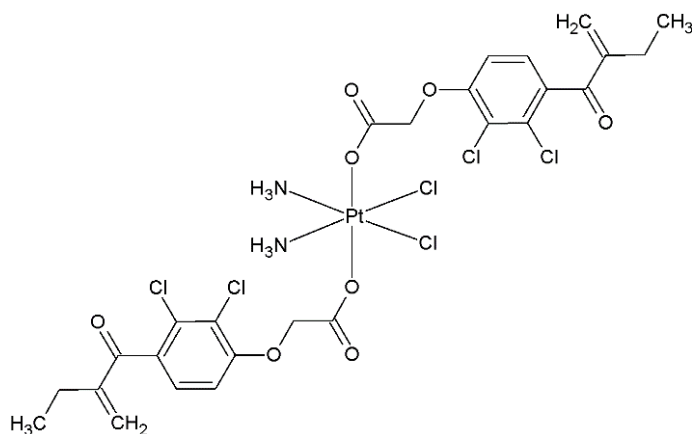
buniek, čím dochádza k inhibícii rastu nádoru. Z cisplatinu a DCA ako prekurzorov bol

pripravený komplex Pt(IV) *cis,cis,trans*-[Pt(NH₃)₂Cl₂(dca)₂] s názvom mitaplatina (*obr. 7*),

ktorý usmrcuje rakovinové bunky zacielením na DNA a mitochondrie zároveň. Keď prejde

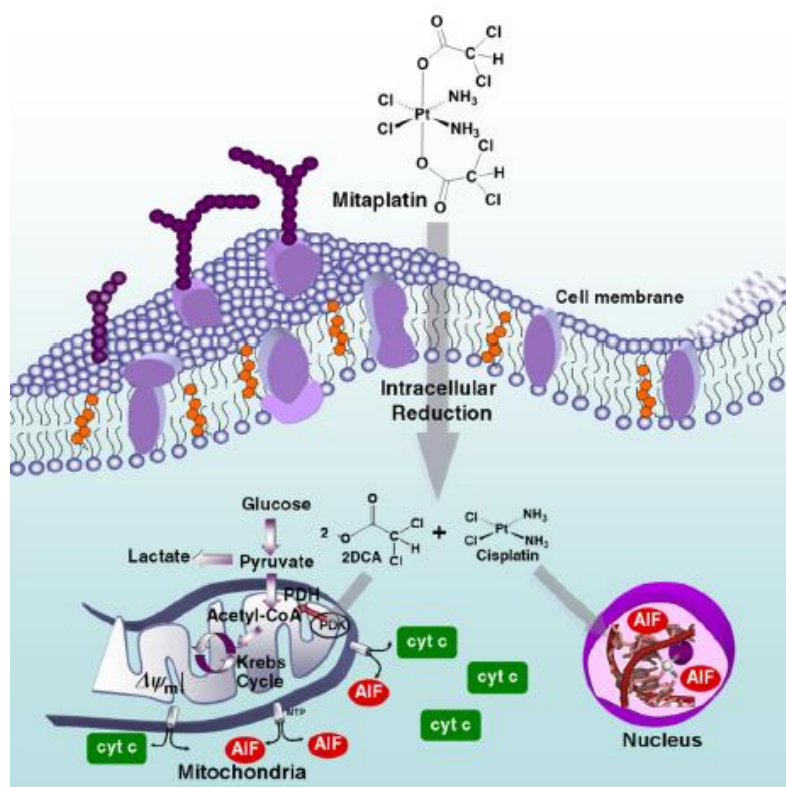
komplex plazmatickou membránou dochádza ku redukcii a uvoľneniu aktívnych liečiv cisplatinu

a DCA. Dichlóracetát inhibuje mitochondriálnu PDK, čo vedie k aktivácii



Obrázok 6: Štruktúrny vzorec etakraplatiny.

pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDH) a zvýšení oxidácie glukózy. Zníži tiež potenciál mitochondriálnej membrány, čo vedie ku otvoreniu jej pórov. Cisplatina, ktorá vznikla po redukcii interaguje s jej kľúčovým cieľom, jadrovou DNA. Takýto mechanizmus spôsobuje vysokú cytotoxicitu mitaplatiny, ktorá je porovnateľná s cisplatinou.³⁷⁻⁴⁰



Obrázok 7: Štruktúrny vzorec a mechanizmus pôsobenia mitaplatiny.³⁹

O zlúčeninách s trojitým účinkom existuje zatiaľ veľmi málo informácií. Bola však popísaná syntéza a cytotoxické vlastnosti aspoň pre pár zlúčenín tohto typu. Sú to zlúčeniny Pt(IV) derivátov cisplatiny s dvoma rôznymi bioaktívnymi axiálnymi ligandmi. Tie sú v týchto prípadoch inhibítormi cyklooxygenázy (COXi), históndeacetylázy (HDACi) alebo pyruvátdehydrogenázykinázy (PDKi), pretože ich Pt(IV) proliečivá dvojitého účinku pôsobia synergicky s cisplatinou. Tieto zlúčeniny *cis,trans,cis*-[Pt(NH₃)₂(COXi)(PDKi)Cl₂], *cis,trans,cis*-[Pt(NH₃)₂(COXi)(HDACi)Cl₂] a *cis,trans,cis*-[Pt(NH₃)₂(HDACi)(PDKi)Cl₂], kde COXi je aspirín alebo ibuprofén, PDKi je dichlóracetát a HDACi je valproát alebo fenylbutyrát, boli výrazne účinnejšie ako cisplatina proti rade ľudských rakovinových buniek. Priemerné hodnoty IC₅₀ týchto zlúčenín sa pre šesť rôznych rakovinových bunkových línií pohybovali od 0,37 do 1,46 μM v porovnaní s 12,5 μM pre cisplatinu. Boli veľmi účinné najmä proti bunkám rakoviny pankreasu a štítnej žľazy.^{35,41}

2.2. Protinádorovo aktívne komplexy ďalších platinových kovov

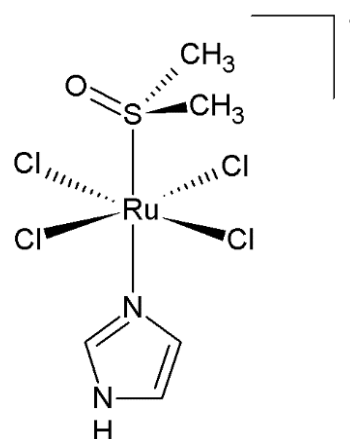
2.2.1. Protinádorovo aktívne komplexy ruténia

Rezistencia voči klinicky využívaným zlúčeninám platiny je obrovským problémom, pretože tieto zlúčeniny tvoria približne polovicu chemoterapeutických liečiv. Preto je už od objavu antineoplastických účinkov cisplatiny a jej Pt(II) analógov značný záujem o vývoj nových liečiv s použitím iných kovov, ktoré by si však zachovali cytotoxicitu, bunkovú selektivitu a zároveň vykazovali jedinečné mechanizmy účinku. Kvôli chemickej podobnosti s platinovými liečivami je záujem najmä o platinové kovy (Pd, Rh, Ir, Ru a Os).^{42,43}

Pri dizajnovaní nových liečiv sa ako výborná alternatíva ukázali zlúčeniny ruténia, pretože majú porovnateľnú kinetiku výmeny ligandov a viac prístupných koordinačných geometrií. Chémia komplexov Ru(II) a Ru(III) je veľmi rozšírená v materiálovej oblasti aj v medicínskej chémii, preto bolo ich skúmanie ako potenciálnych protinádorových liečiv veľmi intenzívne. Nakoľko majú nádorové bunky veľmi redukčné prostredie, v prípade Ru(III) komplexov sa uvažuje o mechanizme aktivácie redukciami, kedy dochádza k redukcii na aktívnejšiu formu, ktorou je Ru(II) zlúčenina, pomocou bunkových redukčných činidiel akým je napríklad askorbát.⁴⁴⁻⁴⁶

Komplexy ruténia sa svojím mechanizmom účinku v bunke líšia od platinových liečiv a majú širokú škálu intracelulárnych cieľov. Po *in vitro* a *in vivo* testoch sa do fázy klinického testovania dostali tri komplexy ruténia, konkrétne NAMI-A (obr. 8), NKP1339 (IT-139) (obr. 8) a TLD1433. Prvé dva komplexy sú testované ako chemoterapeutické látky, TLD1433, ktorý je oktaédrickým komplexom Ru(II), vykazuje potenciál ako fotosenzibilizátor pre fotodynamickú terapiu (PDT).⁴⁷⁻⁵¹

NAMI-A (imidazolium-dimetylsulfoxid-tetrachlororutenitý komplex) je komplex Ru(III) v oktaédrickom usporiadaní, ktorého ligandová sféra je tvorená štyrmi chloro ligandmi, imidazolom a dimetylsulfoxidom. Je výborným príkladom použitia Ru(III) komplexov ako prekursorov liečiv, pretože sú menej reaktívne ako po redukcii vznikajúce Ru(II) aktívne formy. Týmto spôsobom je možné presné zacielenie nádoru, ktorý má hypoxické prostredie, čím



Obrázok 8: Štruktúrny vzorec NAMI-A.

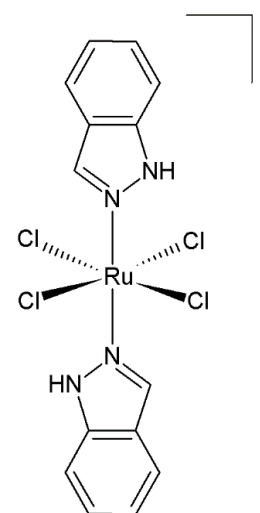
podporuje redukciu kovového centra a vytvára tak antiproliferatívnu selektivitu pre nádorové bunky v porovnaní so zdravými.

Zmena oxidačného stavu tiež vedie ku kinetickej labilitě, čím dochádza rýchlejšie ku hydrolyze chloridových ligandov. Dochádza tak ku ľahšej interakcii komplexu s DNA. Počas klinického testovania bolo toto liečivo testované na nemalobunkovom karcinóme pľúc v kombinácii s gemcitabínom, ktorý sa používa aj s cisplatinou. Liečba však vykazovala vedľajšie účinky ako gastrointestinálne poruchy, neutropéniu či zvýšené pečenné enzýmy. Tento problém je ale riešiteľným.⁵²⁻⁵⁵ Má však výbornú schopnosť zabrániť nie len bunkovej invázii, ale aj neoangiogenéze, čo z NAMI-A robí komplex selektívny skôr pre metastázy ako plne formované nádory. Na rozdiel od platiny je väčšina jeho cieľov skôr extracelulárna ako založená na interakcii DNA. Najpredpokladanejším spôsobom, akým NAMI-A uplatňuje svoje angiogénne účinky je zachytávanie oxidu dusnatého. Dráha syntázy oxidu dusnatého stimuluje angiogénu a migráciu endoteliálnych buniek. Zahŕňa tiež enzýmy aktivované takzvaným VEGF (vaskulárny endoteliálny rastový faktor), ktoré katalyzujú tvorbu NO ako signálnej molekuly zapojenej do týchto procesov. Kovové centrum NAMI-A, rovnako ako jeho albumínové adukty, sa viažu na NO veľmi silne prostredníctvom vytesnenia DMSO ligandu. Reakcia je *in vivo* nezvratná, nakoľko uvoľnenie NO je nepriaznivé aj v prítomnosti redukčných činidiel akým je napríklad glutatión.^{52,56-61} NAMI-A tiež inhibuje endotelovú bunkovú proliferáciu, nakoľko je NO signálnou molekulou v MAPK (mitogénom aktivovanej proteínkinázovej dráhe). MAPK obsahuje kaskádu kináz koordinujúcich biologické procesy ako bunková proliferácia, migrácia či prežitie. Po aplikovaní NAMI-A bola bunková proliferácia inhibovaná najmenej na 48 hodín, zrejme vďaka roli oxidu dusnatého v MAPK. Angiogenéza spôsobuje progresiu nádoru nakoľko na udržanie malígneho rastu sa spotrebúva kyslík a živiny. Inhibíciou angiogenézy sa preto potláča metastatický vývoj ochorenia. NAMI-A taktiež znižuje migráciu nádorových buniek závislú na VEGF, ktorého inhibícia môže zabrániť neoangiogenéze a tvorbe metastáz. Liečivo tiež pôsobí na bunky prostredníctvom selektívnej inhibície draslíkového iónového kanálu aktivovaného Ca^{2+} kationmi $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$. Tento kanál je kódovaný špecifickým génom KCNN4 , ktorý je v mnohých nádorových bunkách exprimovaný nadmerne. Biologicky riadené procesy týmto kanálom sa líšia v závislosti na type bunky. Prvým typom je proliferácia v leukemických a lymfómových bunkách. Druhým typom je migrácia v epitelových a gliových rakovinových bunkách. Táto závislosť iónového kanálu na type buniek možno vysvetľuje, prečo je aktivita NAMI-A špecificky obmedzená v primárnych nádoroch. Jeho účinnosť proti leukémii a metastázam je zachovaná aj napriek tomu. U leukémie je inhibíciou $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ kanálu pomocou NAMI-A indukované zastavenie G2/M

fázy bunkového cyklu, čo vedie k apoptóze.^{58,62-68} Antimetastatické vlastnosti NAMI-A vyplývajú aj zo schopnosti ovplyvňovať adhéziu a migráciu buniek. Inhibovať môže tieto

procesy okrem vyššie vysvetleného aj prostredníctvom proteínovej interferencie, napríklad prostredníctvom integrínu $\alpha 5\beta 1$. Je to transmembránovo viazaný proteín viažuci sa na ďalšie bunkové komponenty, ktorý slúži na uľahčenie adhézie a migrácie buniek. Podľa výskumu blokuje NAMI-A nielen $\alpha 5\beta 1$, ale významne znižuje počet integrínových receptorov moduláciou expzie génov kódujúcich integrínové podjednotky. Po aplikácii NAMI-A na rakovinové bunky hrubého čreva bolo preukázané významné zníženie adhézie týchto buniek k fibronektínu a kolagénu I. Adhézia buniek nepriamo korelovala s koncentráciou NAMI-A, čo podporilo hypotézu, že nižšie dávky liečiva majú vyššiu účinnosť.⁶⁹

NKP1339 (*trans*-bis(1*H*-indazol)tetrachlororutenitan sodný; obr. 9) je ďalším úspechom vo vývoji Ru(III) zlúčenín, ktorý dosiahol klinické testovanie. Jeho pôvodná forma KP1019 s protonizovaným indazolom namiesto sodného kationu bola modifikovaná na sodnú soľ aby sa zvýšila jej rozpustnosť vo vode. Tento komplex má určitú štruktúrnú podobnosť s NAMI-A kvôli svojej oktaédrickej geometrii a chloridovým ligandom. Bol pripravený v 90. rokoch vo Viedni B. K. Kepplerom a jeho kolektívom.⁷⁰ Je to prekursor liečiva a v porovnaní s NAMI-A relatívne inertný, pretože ku výmene či strate ligandu nedochádza tak ľahko.^{52,54,57} Oba tieto komplexy sa viažu nekovalentne s proteínmi v krvi pravdepodobne vďaka hydrofóbnym interakciám. NKP1339 sa rýchlo viaže na albumín, čo treba brať do úvahy v prípade intravenózneho podania. Komplex kov-proteín preukázal len málo vedľajších účinkov počas I. fázy klinického testovania. Je to spôsobené tým, že komplex je stále vo svojej proliečivovej forme, až kým nedôjde ku jeho aktivácii redukciami a uvoľneniu z albumínu. NKP1339 indukuje zastavenie bunkového cyklu na princípe mechanizmov, ktoré odpovedajú jeho redoxnej aktivite v nádorových bunkách. V neoplastických bunkách je koncentrácia intracelulárnych ROS (reaktívnych druhov kyslíku), ako sú napríklad superoxid či hydroxylový radikál, v porovnaní so zdravými bunkami zvýšená. Bolo zistené, že NKP1339 zvyšuje intracelulárnu koncentráciu ROS a zvyšuje reguláciu proapoptotickej p38 MAPK. Táto kaskáda, ktorá je zapojená do progresie bunkového cyklu, sa

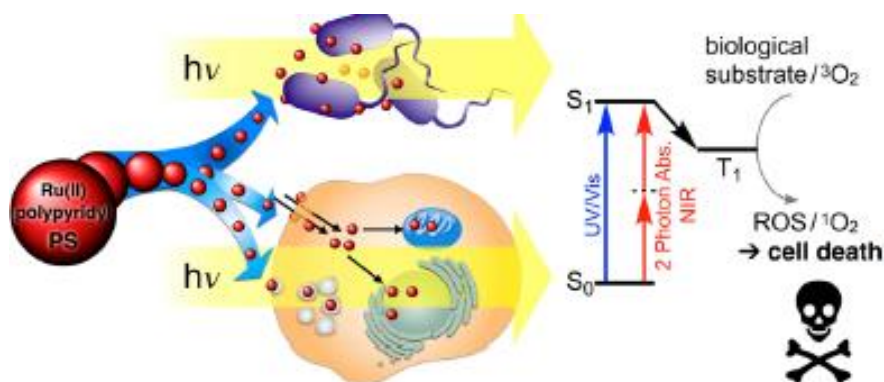


NKP1339

Obrázok 9: Štruktúrny vzorec NKP1339.

normálne aktivuje ako reakcia na bunkový stres, napríklad poškodeniami DNA, ROS či cytokínmi. Aktiváciou tejto dráhy dochádza ku regulácii génovej expresie, vrátane tých, ktoré kódujú cytokíny, transkripčné faktory a bunkové receptory. Reguluje tiež kontrolné body G1/S a G2/M fáz v rámci bunkového cyklu. Generovaním ROS a zmenou bunkovej redoxnej rovnováhy NKP1339 inhibuje syntézu DNA a indukuje zastavenie G2/M fázy bunkového cyklu. Vnútrná aj vonkajšia apoptóza je tak indukovaná zvyčajne 20 až 30 hodín od podania liečiva. Toto liečivo neinteraguje s oxidom dusnatým v takej silnej miere ako NAMI-A, čo podporuje teóriu, že je účinnejší skôr voči pevným nádorom ako metastázam. I. fáza klinického testovania bola z hľadiska farmakodynamického aj farmakokinetického považovaná za úspešnú. NKP1339 sa ukázal ako obzvlášť účinný proti neuroendokrinným nádorom a zároveň vykazoval len mierne nežiaduce účinky u účastníkov štúdie.^{52,57,71-78}

TLD1433 sa zaradil medzi jeden z troch úspešných klinicky testovaných Ru komplexov. Podľa svojej štruktúry sa radí do skupiny polypyridylových komplexov, ktoré majú obrovský význam vo fotodynamickej terapii (PDT). PDT je relatívne nová technika slúžiaca na liečbu niektorých typov rakoviny, bakteriálnych, plesňových a vírusových infekcií či kožných chorôb.



Obrázok 10: Mechanizmus pôsobenia Ru(II) polypyridylových komplexov v PDT.⁷⁹

Komplex $[\text{Ru}(4,4'\text{-dmb})_2(\text{IP-3T})]\text{Cl}_2$, kde 4,4'-dmb = 4,4'-dimetyl-2,2'-bipyridín; IP-3T = 2-(2',2'':5'',2'''-tertiofén)-imidazo[4,5-f][1,10]fenanthrolín)) je zároveň prvým fotosenzibilizátorom ruténia v klinickom testovaní. Je skúmaný na fotodynamickú liečbu invazívneho karcinómu močového mechúra. Vyznačuje sa jedinečným fotosenzibilizačným mechanizmom, pretože využíva Ru(II) kovové centrum na podporu rýchleho a efektívneho tzv. „inter-system crossingu“, ktorým vzniká reaktívny tripletový stav, čo spôsobuje prenos energie alebo elektrónov, čím dochádza ku vzniku ďalších ROS. Okrem kovového centra posilňuje

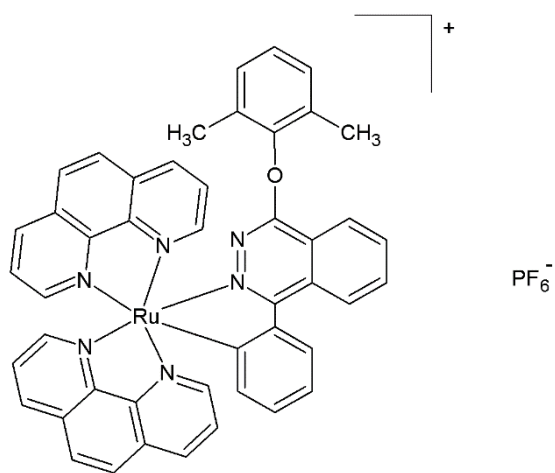
tento efekt aj tienylový ligand, ktorý spôsobuje ILCT (intraľigand charge transfer), čím sa predlžuje excitovaný stav zlúčeniny. TLD1433 sa selektívne hromadí v rakovinových bunkách a jeho rovnomerné rozmiestnenie je vždy monitorované *in situ* v reálnom čase pred ožiarení svetlom s kratšou vlnovou dĺžkou (520 nm).⁷⁹⁻⁸²

Cyklometalované komplexy ponúkajú širokú škálu využitia vďaka silnej σ -donorovej schopnosti cyklometalačných ligandov. Nachádzajú využitie v solárnych článkoch, ako katalyzátory pri niektorých organických reakciách, najmä redukcii ketónov a imínov, či vo fotochémií. Z biomedicínskeho hľadiska sú vhodnými látkami na fotodynamickú terapiu a najmä fotochemoterapiu (PCT). Boli pripravené komplexy ruténia v oxidačnom stave II o zložení $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{C}^{\wedge}\text{N})]$ (obr. 11), kde $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ = cyklometalovaný bidentátny ligand, nesúci

analógy 2,2'-bipyridínu - (N, C) bidentátne ligandy, ako je 2-fenylpyridín (Phpy) a jeho deriváty, 4-(2-pyridyl)benzaldehyd (Hpba) alebo 2-fenylchinolín (PhQn). Zaujímavosťou je, že cytotoxicita týchto zlúčenín nezodpovedá ich lipofilite. Vo všeobecnosti platí pravidlo, že cytotoxicita sa znižuje s lipofilitou. V tomto prípade je to v kontraste so všeobecne známou predstavou, že zvýšená hydrofóbnosť vedie ku zvýšenému vychytávaniu buniek, čo prirodzene zvyšuje cytotoxicitu.

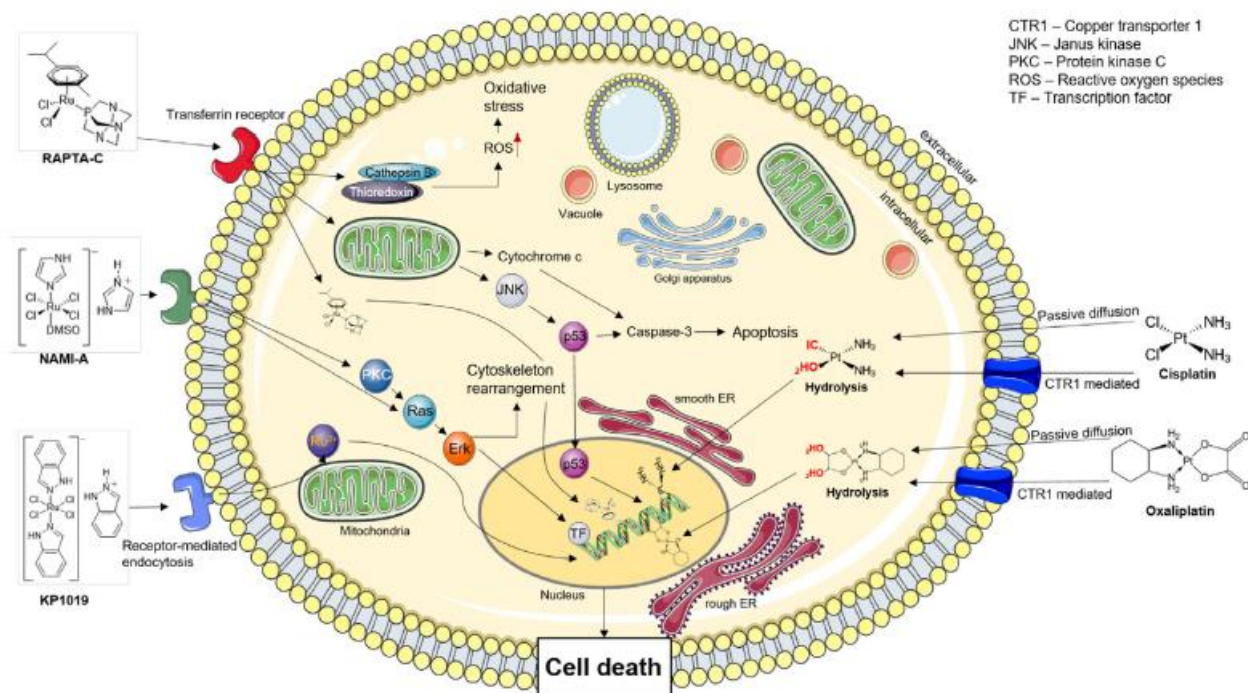
Pozorovaný efekt zníženej cytotoxicity pri zvýšenej lipofilite súvisí s rozsiahlymi π -systémami, ktoré môžu agregovať na extracelulárnom povrchu a znižovať tak absorpciu buniek alebo so schopnosťou absorpcie jadra pri fotoaktívnom príjme.^{81,83-86}

Významnou skupinou komplexov ruténia sú práve arénové komplexy, ktorých traja predstavitelia sa preukazujú svojimi výraznými kancerostatickými účinkami. Pojednáva sa o RAPTA skupine komplexov, ktoré sa radia medzi takzvané „piano stool“ komplexy so všeobecným vzorcom $[\text{Ru}(\text{arén})\text{Cl}_2\text{PTA}]$, kde PTA je 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantán. Tieto komplexy sa v mnohých ohľadoch líšia od vyššie zmienených NAMI-A či NKP1339. Okrem rozdielneho oxidačného stavu, ktorý je v týchto zlúčeninách II, sa líšia aj mechanizmom svojho účinku. Prvým skúmaným derivátom je RAPTA-C obsahujúci p-cymén, ktorý inhubuje



Obrázok 11: Štruktúrny vzorec cyklometalovaného Ru(II) komplexu.

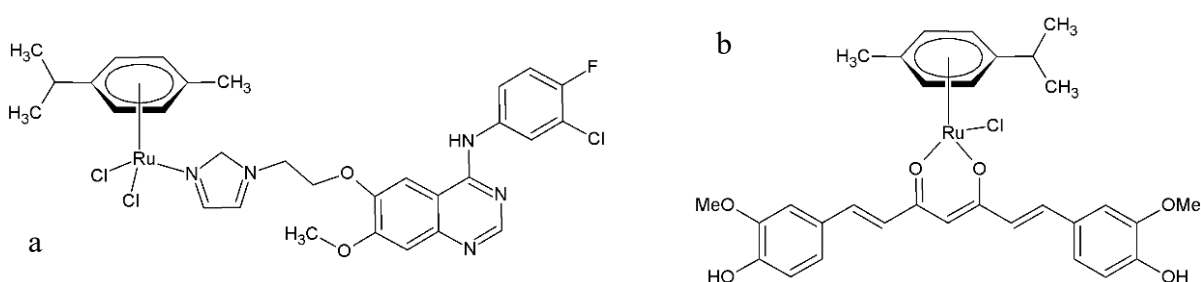
cytozolickú tioredoxín reduktázu a katepsín B *ex vivo*, čo sú dva enzýmy podieľajúce sa na progresii rakoviny tým, že ovplyvňujú oxidatívne stresové reakcie a proteolýzu. Zvyšuje reguláciu ROS v nádorových bunkách blokadou mitochondriálnych a p53-Janus kinázových dráh (JNK). RAPTA-C sa viaže na elektronegatívne nabitú oblasť na povrchu histónových proteínov v nukleozómoch tvoriacich chromatín, čo je v kontraste so zlúčeninami na báze platiny. Bunková absorpcia tohto komplexu je riadená špecifickou väzbou na ľudský sérový albumín a transferín na rozdiel od cisplatiny, ktorá je absorbovaná pasívnou difúziou, vid' obr. 12.



Obrázok 12: Porovnanie vstupu do bunky a mechanizmu účinku významných Pt- a Ru-potenciálnych kancerostatík.⁹³

Závislosť absorpcie RAPTA-C na receptoroch zvyšuje distribúciu a rozširuje akumuláciu v nádorových bunkách s upregulovanou receptorovou expresiou, vďaka čomu sú zdravé bunky menej ovplyvnené. Na *in vivo* modeloch nepreukázal tento komplex cytotoxicitu voči zdravým bunkám a taktiež neboli pozorované vedľajšie účinky liečby. Väčšina metalofarmák má širší rozsah biomolekulárnych cieľov, RAPTA zlúčeniny sú kvôli svojej 3D štruktúre viac vyprofilované a niektoré z ich cieľov dominujú. RAPTA-T komplex obsahujúci

toluénový kruh vykazuje skôr antimetastatické účinky, pretože ovplyvňuje rozširovanie rakovinových buniek moduláciou ich adhezívnych vlastností. Indukuje tiež alosterické viazanie ďalších liečiv do aktívneho centra, čím sprostredkúva synergiu liečivo-liečivo. Iným typom RAPTA zlúčeniny je RAPTA-EA, ktorá obsahuje 1,2-etyléndiamín a kyselinu etakrynovú, ktorá je inhibítorom glutatión S-transferázy (GST) zodpovedajúcej za rezistenciu na liečivo. Na rozdiel od predchádzajúcich dvoch predstaviteľov tejto skupiny komplexov sa prednostne RAPTA-EA viaže na DNA, čím je príbuzná liečivám na báze platiny.^{79,87-92} V prípade inkorporácie bioaktívnych ligandov do komplexov Ru(III) či Ru(II) poskytujú tieto zlúčeniny multi-cieľovú terapiu. V multi-cieľových komplexoch ruténia sa najčastejšie používajú biokatívne ligandy, ktoré sú inhibítormi EGFR-TK, tirozínkinázy epidermálneho rastového faktoru, ktorá je často nadmerne exprimovaná v rôznych rakovinových bunkách a zodpovedá za bunkovú signalizáciu fosforylácie tyrozínu, ktorá sa zúčastňuje na delení a raste buniek. Tieto inhibítory sa tiež nazývajú tyrfostíny a zaraďuje sa medzi ne napríklad farmakofor 4-anilínchinazolín, ktorého koordináciou na komplex Ru(III) s DMSO bola pripravená multi-cieľová protinádorová zlúčenina. Cieľom jej prípravy bolo okrem inhibičnej aktivity voči EGFR aj zvýšenie selektivity a účinnosti. Boli tiež pripravené arénové Ru(II) komplexy s tyrfostínovými farmakoformi (*obr. 13a*), ktoré boli na komplexy pripojené prostredníctvom flexibilných linkerov. Aj tento typ komplexov vykazoval vysokú antiproliferatívnu a EGFR inhibičnú aktivitu, najmä vyššiu v porovnaní s voľnými tyrfostínmi. Bolo však pri nich pozorované, ako veľmi je kvôli sterickému bráneniu potrebná správna veľkosť arénu a dĺžka linkeru medzi dvoma farmakoformi. U niektorých komplexov z tejto skupiny boli dokázané antiproliferatívne účinky najmä v dôsledku interferencie so signalizáciu mTOR (mammalian target of rapamycin), regulačným proteínom, ktorý reguluje rast a proliferáciu buniek, namiesto so signalizáciou EGFR. Bol pripravený komplex Ru(II) s p-cyménom a demetoxykurkumínom (*obr. 13b*), ktorý vykazoval vysokú *in vitro* protinádorovú aktivitu proti nádorovým bunkovým líniam rakoviny hrubého čreva, prsníka a vaječníkov. Kurkumín je prírodná látka, ktorá má sama o sebe veľa priaznivých účinkov na ľudský organizmus. Je antioxidantom, pôsobí protizápalovo, ale najmä má angiogénne a antiproliferatívne účinky. V neposlednom rade bol konjugovaný komplex letrozolu, ktorý je inhibítorom aromatázy a používa sa pri adjuvantnej chemoterapii rakoviny prsníka, s arénovým monokoordinovaným ruténatým komplexom. Aromatázy patria do skupiny cytochrómov P450 a prevádzajú testosterón na estradiol, ktorý zodpovedá za proliferáciu buniek rakoviny prsníka. Pre pripravený komplex bol preukázaný potenciál súčasnej indukcie smrti nádorových buniek a zároveň inhibície rastu prežívajúcich nádorových buniek.⁹⁴⁻⁹⁹



Obrázok 13: Štruktúrne vzorce arénových Ru(II) komplexov a a) 4-anilínochinazolínom, b) demetoxykurkumínom.

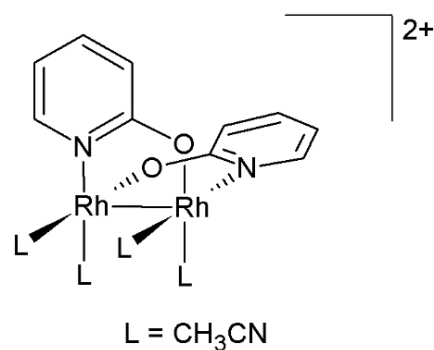
Na Univerzite Palackého bol pripravený polosendvičový Ru(II) komplex s biokatívnyim ligandom DCA, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{dca})]\text{PF}_6$, ktorý vykazoval lepšie cytotoxické účinky voči bunkám rakoviny vaječníkov ako cisplatina. Táto látka bola zároveň prvým polosendvičovým komplexom ruténia s dichlóracetátom sodným, ktorý okrem svojho využitia na liečbu laktátovej acidózy vykazuje cytoxickú aktivitu.¹⁰⁰

2.2.2. Protinádorovo aktívne komplexy ródia

Biologicky aktívne komplexy ródia sú v porovnaní s komplexmi ostatných uvádzaných prvkov (Ru, Os, Ir) značne menej preskúmanou skupinou. Napriek tomu však majú vhodné predpoklady na biologické využitie. Komplexy tohto kovu sa bežne vyskytujú v oxidačných stavoch 0, +I, +II a +III a sú veľmi stabilné vo vodnom prostredí. Z bioaplikácií sú pojednávané zlúčeniny ródia v oxidačnom stave II, pri ktorých chémia výmeny ligandov hrá kľúčovú rolu v ich biologickej funkcii, a III, v ktorom hrá centrálny atóm štruktúrnú úlohu.^{101,102}

Rh(II) komplexy sú dimetalické komplexy s veľmi ľahkou kinetikou výmeny ligandov a vďaka štruktúre ligandov je možné vyladenie energie ich viazania. Tieto zlúčeniny majú typickú štruktúru takzvaného lopatkového kola („paddlewheel structure“; obr. 14) a obvykle obsahujú v axiálnych polohách slabé aqua či iné ligandy. Ich protinádorová aktivita je v zásade závislá od dostupnosti axiálnych väzobných miest a procesov výmeny ligandov, ktoré sú týmito miestami umožnené. Komplexy s blokovanými axiálnymi polohami sú neúčinné. Dlhoročné štúdie preukázali, že sa tieto zlúčeniny viažu priamo na Lewisove bázy na DNA prostredníctvom počiatkovej axiálnej koordinácie a prípadného vytesnenia ekvatoriálnych

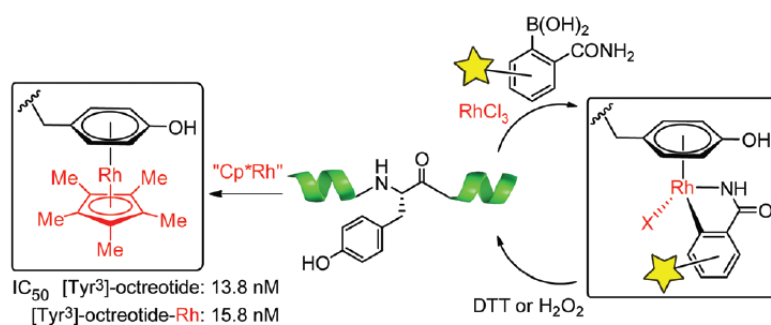
ligandov, ako napríklad acetátu, za vzniku mostíkujúcich komplexov DNA. Ligandy s predĺženou π -konjugáciou, ako napríklad deriváty 1,10-fenantrolínu, vykazujú všeobecne zvýšenú afinitu k DNA a proapoptotickú aktivitu. Na protinádorovú aktivitu značne vplýva fotoradiácia. V niektorých prípadoch zodpovedá za fotoaktivovanú apoptózu produkcia singletového kyslíku $^1\text{O}_2$ ródium. Fotoradiácia tiež však uľahčuje procesy výmeny ligandov, ktoré vedú k väzbe na DNA. Komplexy premostené napríklad oxypyridínom majú krátke časy excitovaného stavu (<1 ns), čo zabraňuje tvorbe singletového kyslíku a prekazuje cielené zabíjanie buniek nezávislých na kyslíku, pravdepodobne prostredníctvom fotoindukovanej výmeny ligandov, čo je dôležitým faktorom pri zacielení hypoxických nádorov.¹⁰³⁻¹⁰⁷



Obrázok 14: Štruktúrny vzorec Rh(II) dimetalického komplexu.

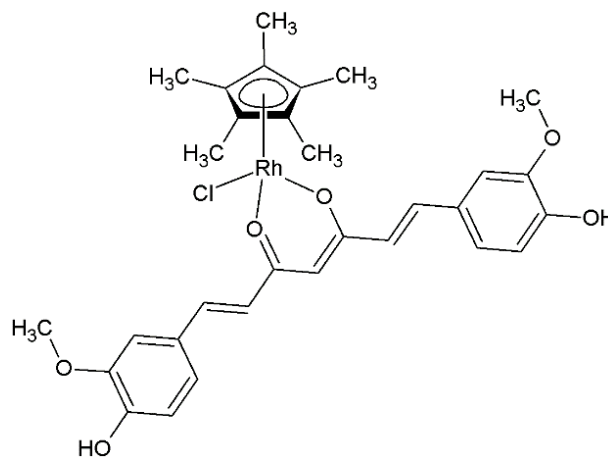
Druhú skupinu tvoria stabilné Rh(III) arénové komplexy podieľajúce sa na prenose elektrónov. Ich aplikácia v ľudskom organizme sa zameriava na jednoduchú nekovalentnú väzbu na proteíny. Oktaédrická štruktúra týchto komplexov im poskytuje prístup ku zväčša neprístupným malým molekulám. Rh(III) komplexy obsahujúce deriváty 1,10-fenantrolínu podobné staurosporínu po naviazaní inhibujú Src tyrozínkinázu vďaka tomu, že ich štruktúra zapadá do Src modelu takzvaného „binding pocket“. Na rozdiel od Rh(II) komplexov diskutovaných vyššie, komplexy Ru(III) podobné staurosporínu nie sú s určitosťou stabilné v prítomnosti biologicky relevantných koncentrácií tiolu. Podobný štruktúrny prístup bol úspešne použitý aj na vývoj inhibítorov NEDD8 aktivujúceho enzýmu. Bola preukázaná *in vivo* aktivita proti zápalu na modeli myši. Termodynamická a kinetická stabilita týchto oktaedrických zlúčenín je tiež veľkou výhodou pri tvorbách metalovaných proteínov a peptidov. *In situ* sú vytvárané stabilné Rh(III) komplexy s priamym prepojením medzi kovovým centrom a individuálnym aromatickým bočným reťazcom. Príkladom takejto zlúčeniny je komplex $[\text{Cp}^*\text{Rh}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_3](\text{OTf})_2$, kde $\text{Cp}^* = \eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5$, ktorý sa *in situ* pretvára na η^6 -arénový komplex s fenolovým bočným reťazcom tyrozinových reziduí (obr. 15). Tento typ chémie bol demonštrovaný aj s pomerne veľkými komplexnými peptidmi. Možno povedať, že stabilita tohoto organokovového sendvičového komplexu je v biologickom prostredí pozoruhodná. Kompetitívne väzbové experimenty peptidu na somatostatínový receptor

v bunkách AR42J potvrdili zachovanie si väzbovej schopnosti po koordinácii na jadro ródia. Stabilita tohto typu komplexov vo vodnom prostredí je vysoká a systém trojzložkového kopulačného prístupu s jednoduchou RhCl_3 ródiovou soľou umožnila, aby sa touto reakciou prichytávalo široké spektrum funkčných skupín. Napríklad metalácia tyrozínu sa použila na začlenenie fluorescenčných značiek na polypeptid. Pri tomto biokonjugačnom prístupe sú však ródium-tyrozínové spojenia rovnako ako veľké proteíny náchylné na štiepenie redoxnými mediátormi, akým je napríklad ditiotreitól (DTT) či peroxid vodíka. Táto skutočnosť dáva týmto komplexom potenciál na časovo-priestorové uvoľnenie naviazanej funkčnej skupiny.¹⁰⁸⁻¹¹³



Obrázok 15: Koordinácia Cp*Rh na peptid obsahujúci tyrozín (vľavo) a biokonjugovaný trojzložkový Rh(III)-arénový komplex (vpravo).¹¹⁴

Boli skúmané aj ródiové komplexy s bioaktívnymi ligandmi, pričom bolo zistené, že sľubné cytotoxické účinky preukazuje komplex Rh(I) s N-heterocyklickým karbénom a kofeínom. Táto zlúčenina je inhibítorom tioredoxínreduktázy u cicavcov a okrem cytotoxických účinkov má antimetastatické a antiangiogénne vlastnosti. Bol tiež pripravený komplex Rh(III) s pentametylcyklopentadienylom a kurkumínom (obr. 16), ktorý je bioaktívnym ligandom s cytotoxickými účinkami vedúcimi ku apoptóze nádorových buniek. Tento komplex má



Obrázok 16: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Cl}(\text{cur})]$.

antiproliferatívne účinky voči bunkám ľudského karcinómu pľúc.^{32,115,116}

2.2.3. Protinádorovo aktívne komplexy osmia

Komplexy osmia v oxidačnom stave II vykazujú výrazne pomalšie kinetické vlastnosti a substitučnú inertnosť v porovnaní s komplexmi ruténia. Majú schopnosť komplexnejšej interakcie s DNA. Boli pripravené viaceré typy biologicky aktívnych Os komplexov.^{87,117}

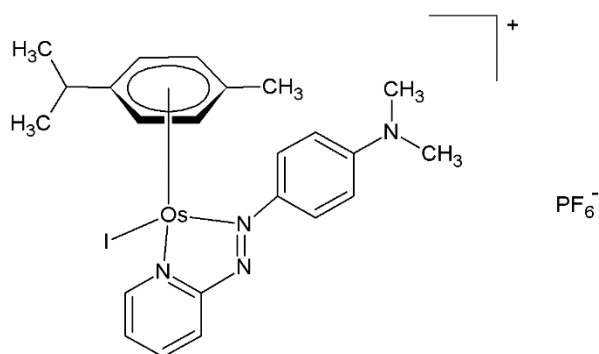
Prvým typom sú polypyridylové komplexy osmia v oxidačnom stave II, ktoré boli pripravené už v roku 1952. Ďalším skúmaním týchto látok boli zistené ich protinádorové účinky. Nedostatok ľahko odstupujúcich ligandov v týchto zlúčeninách naznačuje, že sa viažu s intracelulárnymi cieľmi prostredníctvom nekovalentných interakcií. Aj keď sa tieto komplexy môžu potenciálne viazať na DNA pomocou interkalácie, ich aplikácia spočíva v ich schopnosti interagovať s proteínmi potenciálnych cieľov.^{118,119}

Tamoxifén je organické nesteroidné antiestrogénne liečivo používané na liečbu rakoviny prsníka a vaječníkov. Druhou generáciou analógu tohto liečiva je organokovové liečivo ferrocifén, v ktorom je jedna z fenylových skupín tamoxifénu nahradená vysoko stabilným jadrom biscyklopentadienyly na Fe(II) kovovom centrálnom atóme. Ferrocifén vykazuje oproti tamoxifénu niekoľko výhod ako napríklad udržiavanie antiestrogénových vlastností a tiež tvorbu ROS redoxným cyklovaním Fe(II) kovového centra. Kvôli týmto výsledkom boli pripravené zodpovedajúce analógy ruténia a osmia. Najúčinnjší komplex z triedy osmocifénov vykazoval signifikantnú *in vitro* cytotoxickú aktivitu proti bunkám rakoviny prsníka závislých aj nezávislých od hormónov. Rakovina prsníka závislá na hormónoch je závislá v pokračovaní svojej proliferácie od prítomnosti estrogénov a progesterónov. Naproti tomu rakovina prsníka nezávislá na hormónoch rastie a metastázuje aj bez prítomnosti hormónov. Tamoxifén, komerčne používaný v liečbe rakoviny prsníka je antiestrogénnym liekom používaným výlučne proti hormonálne závislej rakovine prsníka. Schopnosť komplexov osmocifénu indukovať bunkovú smrť v hormonálne nezávislých nádorových bunkách prsníka naznačuje, že kovové centrum Os mení mechanizmus pôsobenia tamoxifénu a rozširuje tak jeho terapeutické využitie na tento typ agresívnej rakoviny.¹²⁰⁻¹²⁵

Medzi najvýznamnejšie komplexy osmia sa radia arénové komplexy s centrálnym atómom v oxidačnom stave II. Najdôležitejšími z tejto skupiny sú „piano stool“ komplexy so všeobecným vzorcom [(arén)Os(N^N)X]⁺, kde N^N je bidentátny N-donorový ligand a X je

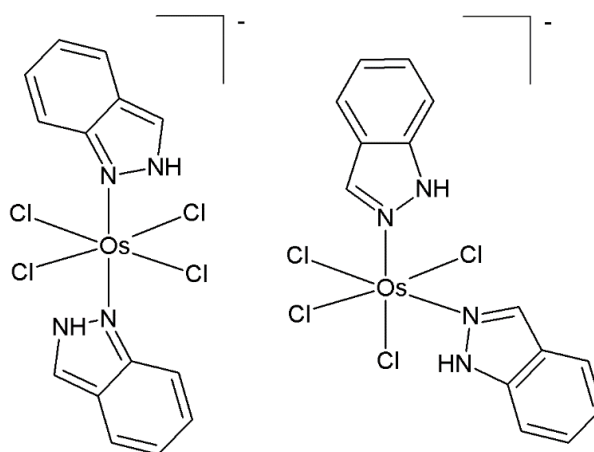
halogén alebo pseudohalogén. Zlúčeniny boli pôvodne navrhnuté na obraz ruténiových analógov, ktoré vykazovali silnú protinádorovú aktivitu. Oboje sa kovalentne viažu na polymérnu DNA, kde niektoré sa koordinujú na guanín a iné podliehajú kvantitatívnej reakcii s DNA. Reaktivita týchto komplexov sa vo vodnom prostredí nemení, pretože komplexy osmia vykazujú značnú inertnosť voči hydrolyze.^{26,87,126,127}

Azopyridínové komplexy tohoto typu sú relatívne nereaktívne. Profesor Sadler a kolektív však pripravili FY026 komplex s azopyridínovým a para-cyménovým ligandom, $[\text{Os}(\mu^6\text{-p-cym})(\text{azpy-NMe}_2)\text{I}]\text{PF}_6$ (obr. 17), ktorý mieri do klinickej fázy testovania. Vykazuje protinádorovú aktivitu *in vivo* voči rakovine vaječníkov a hrubého čreva a *in vitro* voči rakovine vaječníkov, prsníka, pľúc, hrubého čreva a leukémii. Mechanizmus jeho účinku veľmi úzko súvisí s jeho schopnosťou vytvárať ROS v bunkách a s účinkom L-butionín-sulfoximínu (L-BSO), ktorý je špecifickým inhibítorom g-flutamyl-cysteínsyntetázy, ktorá znižuje hladinu intracelulárneho tiolu.^{128,129}



Obrázok 17: Štruktúrny vzorec FY026.

Ďalšou zaujímavou skupinou komplexov osmia sú jeho indazolové komplexy. Jej najvýznamnejším predstaviteľom je analóg komplexu ruténia KP1019, ktorý sa dostal do klinických testov. Na základe jeho odlišnej redoxnej schopnosti a pomalšej kinetiky substitúcie ligandov sa očakávalo, že bude vykazovať odlišné a prípadne aj doplnkové protinádorové účinky ako KP1019. Tento komplex je mimoriadne zaujímavý vďaka tomu, že vytvára rôzne izoméry, ktoré sa líšia na základe tautoméneho stavu koordinovaného indazolového ligandu. *trans*-Izomér obsahuje 2H-indazol, zatiaľ čo *cis*-izomér 1H-indazol (obr. 18). Schopnosť 1H-indazolu tautomerizovať

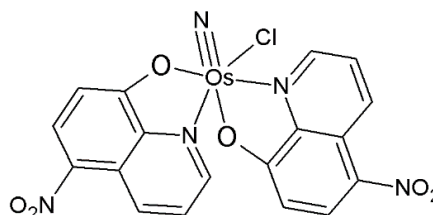


Obrázok 18: Štruktúrne vzorce *cis*- a *trans*-indazolových Os komplexov.

na 2H-indazol môže byť dôležitou vlastnosťou vzhľadom na fyziológiu a biologické účinky týchto komplexov. V porovnaní s KP1019 boli tieto komplexy inertné voči substitučným reakciám ligandov s aminokyselinami a nukleovými bázami. Protinádorová aktivita u nich bola dokázaná, ale v porovnaní s Ru analógom bola výrazne nižšia.¹³⁰⁻¹³³

Skupinou komplexov, ktoré stoja za zmienku, sú Os(VI) nitrido komplexy, ktoré sú veľmi dobrým príkladom stability komplexov osmia vo vyšších oxidačných stavoch. Nitrido komplexy nesúce pyrazolové alebo chinolinolátové (*obr. 19*) ligandy mali dokázané cytotoxické účinky voči viacerým bunkovým líniam. Pôsobia mechanizmom indukovania apoptózy a zastavujú bunkový cyklus v S fáze.¹³⁴⁻

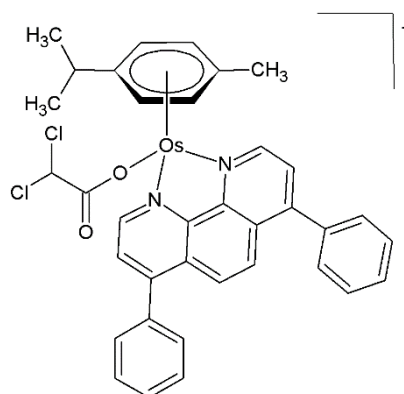
136



Obrázok 19: Štruktúrny vzorec Os(IV) nitrido komplexu.

Do skupiny multi-cieľových komplexov Os(II) sa zaradilo pár veľmi sľubných komplexov. Komplex $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{dpa})(\text{vp})]\text{PF}_6$ obsahuje O-donorový valproátový ligand (vp), ktorý patrí medzi inhibítory históndeacetyláz (HDAC). Počas génovej expresie sa DNA navíja a rozvíja okolo histónov. Histónové acetylázy acetyľujú lyzínové zvyšky v jadrách histónov a histónové deacetylázy odstraňujú acetylové skupiny z lyzínových zvyškov. Inhibítory históndeacetylázy bránia deacetylácii, čím ovplyvňujú génovú expresiu a majú za následok apoptózu nádorových buniek. Inhibítory HDAC sa používajú napríklad na liečbu kožného T-bunkového lymfómu. Bolo dokázané, že komplex čiastočne uvoľňuje bioaktívny ligand, ktorý je stabilným pre ďalšie *in vitro* cytotoxické štúdie. Na Univerzite Palackého bol pripravený analóg komplexu

$[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{dca})]\text{PF}_6$,
 $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{dca})]\text{PF}_6$
(obr. 20). Tento Os(II) komplex vykazuje približne 100-násobne vyššiu cytotoxicitu ($\text{IC}_{50} = 0,50 \mu\text{M}$) v trojnásobne negatívnych bunkách rakoviny prsníku v porovnaní s cisplatinou ($\text{IC}_{50} = 56,0 \mu\text{M}$). Jeho vyššia účinnosť je zrejme zapríčinená jeho vyššou hydrolytickou stabilitou,



Obrázok 20: Štruktúrny vzorec kationu komplexu $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{dca})]\text{PF}_6$.

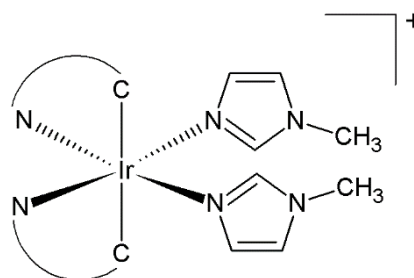
pretože vďaka tomu je úspešne zachytávaný dichlóracetát do ošetrovaných buniek. Os(II) komplex v porovnaní so svojim Ru(II) analógom tiež odzrkadľuje výraznejšie vlastnosti v oblasti jeho účinku, nakoľko ovplyvňuje rôzne mechanické procesy ako napríklad reverziu Warburgovho efektu (v rakovinových bunkách prebieha aeróbna fermentácia namiesto oxidatívnej fosforylácie, takže posledný produkt glykolýzy, pyruvát, je premieňaný na laktát) či inhibície migrácie buniek.^{32,100,137}

2.2.4. Protinádorovo aktívne komplexy irídia

Komplexy irídia, rovnako ako komplexy ostatných platinových kovov, vykazujú potenciál na biomedicínske použitie. Okrem protinádorových účinkov sa javia sľubne aj ako zobrazovacie diagnostiká a biosenzibilizátory vďaka svojim luminiscenčným vlastnostiam. Bolo pripravených viacero typov komplexov irídia.^{138,139}

Jedným z typov sú cyklometalované komplexy, ktoré majú oktaédrický charakter. Niektoré z nich sa preukázali ako užitočné v zobrazovacej diagnostike či svojimi protinádorovými vlastnosťami. Fungujú rôznymi mechanizmami ako napríklad zacielením DNA alebo inhibíciou špecifických proteínov. Príkladom cyklometalovaného irídiového komplexu je látka uvedená na *obrázku 21*.

Jedná sa o Ir(III) komplex s 1,1'-dimetyl-2,2'-bisimidazolovým pomocným ligandom a buď dvoma 2-fenylpyridínovými ligandmi alebo dvoma 2-tienylpyridínmi ako bidentátnymi ligandmi s protinádorovou aktivitou. Tieto komplexy boli navrhnuté so zreteľom na bunkové procesy počas mitofágie, čo je typ autofágie, ktorý selektívne degraduje mitochondrie. Komplexy boli akumulované v mitochondriách nádorových buniek pľúc z línie A549, v ktorých indukovali mitofágiu. Ovplyvňujú tiež expresiu proteínu, ktorý je regulátorom migrácie nádorových buniek.¹⁴⁰⁻¹⁴⁵

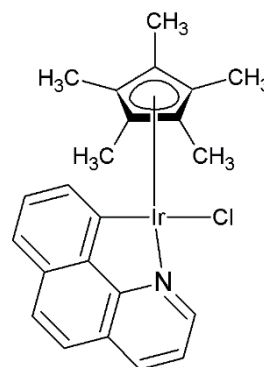


Obrázok 21: Štruktúrny vzorec cyklometalovaného Ir(III) komplexu.

Ďalším typom irídiových komplexov sú N-heterocyklické karbénové komplexy, ktoré vykazujú lepšie protinádorové účinky voči A549 bunkovej línii ako samotná cisplatina. Tieto zlúčeniny vyvolali zvýšenie intracelulárnych hladín ROS a depolarizáciu potenciálu mitochondriálnej membrány, čo v konečnom dôsledku viedlo ku apoptóze. Iný typ zlúčeniny

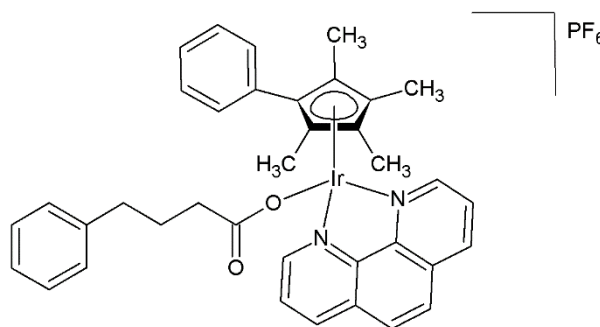
z tejto podskupiny, ktorý je štruktúrne odlišný, pretože sa jedná o Ir(I) komplex, vykazuje vysokú protinádorovú aktivitu proti bunkám rakoviny hrubého čreva a prsníka.^{146,147}

Typom iridiových komplexov, ktoré rozhodne stoja za zmienku, sú organoirídiové polosendvičové komplexy. Zlúčeniny, ktoré obsahovali N, N-chelatačné ligandy nevykazovali dostatočnú aktivitu na rozdiel od zlúčenín s C, N-chelatačnými ligandmi (*obr. 22*). Spomenutá zmena bidentátneho ligandu viedla k zvýšenej hydrofóbnosti, takže dochádzalo ľahšie ku akumulácii a lepšiemu naviazaniu na DNA v bunkách. V akumulácii týchto komplexov zohrávajú najväčšiu úlohu pasívna difúzia a energeticky závislý transport. Tieto zlúčeniny sú účinné v liečbe karcinómu vaječníkov, ale aj karcinómu prsníka. Oba typy karcinómov nepreukazovali citlivosť na liečbu cisplatinou.^{148–150}



Obrázok 22: Štruktúrny vzorec polosendvičového organoirídiového komplexu.

Bol pripravený polosendvičový Ir(III) komplex $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^{\text{ph}})(\text{pb})(\text{phen})]\text{PF}_6$ (*obr. 23*), ktorý sa vďaka nakoordinovanému fenylobutyrate radí k multi-cieľovým zlúčeninám. 4-fenylobutyrát sa radí medzi skúmané kancerostatiká a jeho mechanizmus účinku je inhibícia histónových deacetyláz (HDAC). Tento Ir(III) komplex vykazoval kancerostatické účinky proti bunkám rakoviny vaječníkov a jeho použitie na tieto bunky malo za následok produkciu ROS a významnú depolarizáciu membrán mitochondrií.¹⁵¹⁻¹⁵³

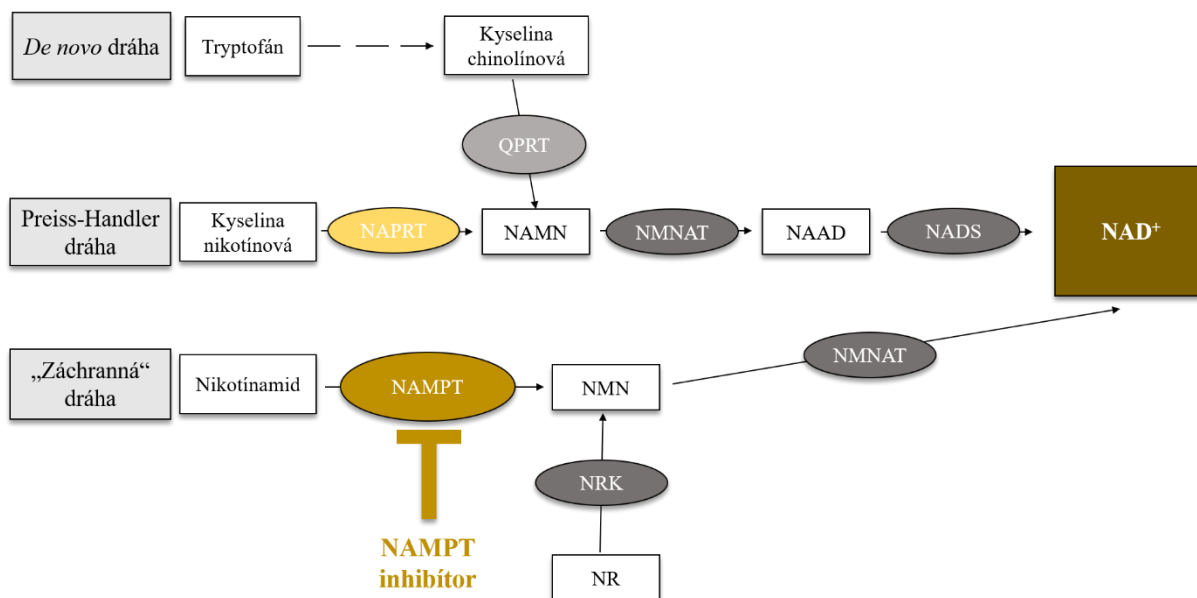


Obrázok 23: Štruktúrny vzorec $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^{\text{ph}})(\text{pb})(\text{phen})]\text{PF}_6$ komplexu.

2.3. NAMPT inhibítory

Rakovinové bunky majú v porovnaní s normálnymi rozdielne metabolické potreby, vrátane zrýchleného cyklovania nikotínamidadenín dinukleotidu (NAD^+). Mnohé z rakovinových buniek, v ktorých dochádza ku metabolickým zmenám, vykazujú závislosť

týchto zmien od určitých enzýmov produkujúcich NAD⁺. Existuje niekoľko dráh produkcie NAD⁺ (obr. 24).¹⁵⁴⁻¹⁵⁶



Obrázok 24: Schéma produkcie NAD⁺ rôznymi dráhami s ich kľúčovými enzýmami a zobrazením miesta účinku NAMPT inhibítora.

V *de novo* dráhe je tryptofán najskôr prevedený na kyselinu chinolínovú (QA) viacerými krokmi. Tá je následne premieňaná na mononukleotid kyseliny nikotínovej (NAMN) prostredníctvom chinolát-fosforibozyltransferázy (QPRT) a potom sa konvertuje na NAD⁺ pomocou nikotínamidnukleotidovej adenyltransferázy (NMNAT) a NAD syntetázy (NADS). V zdravých bunkách je expresia QPRT špecifická podľa typu tkaniva a podľa najnovších výskumov bolo zistené, že je zmenená aj v niektorých rakovinových bunkách. Preiss-Handlerova dráha premieňa kyselinu nikotínovú (NA) na NAMN prostredníctvom nikotínfosforibozyltransferázy (NAPRT), enzýmu, ktorý je veľmi exprimovaný v normálnych tkanivách, ale v rakovinových bunkách len variabilne. NAMN je následne prevádzaný na NAD⁺ pomocou enzýmov NMNAT a NADS, rovnako ako v *de novo* dráhe. „Záchranná“ dráha prevádza nikotínamid (NAM) na nikotínamid mononukleotid (NMN) pomocou enzýmu nikotínamidfosforibozyltransferázy (NAMPT), ktorý obmedzuje rýchlosť tejto premeny. NMN je následne konvertovaný na NAD⁺ vďaka enzýmu NMNAT. Táto dráha je rovnako dôležitá pre rakovinové bunky, ktoré recyklujú NAM, produkt NAD⁺-spotrebovávajúcich enzýmov,

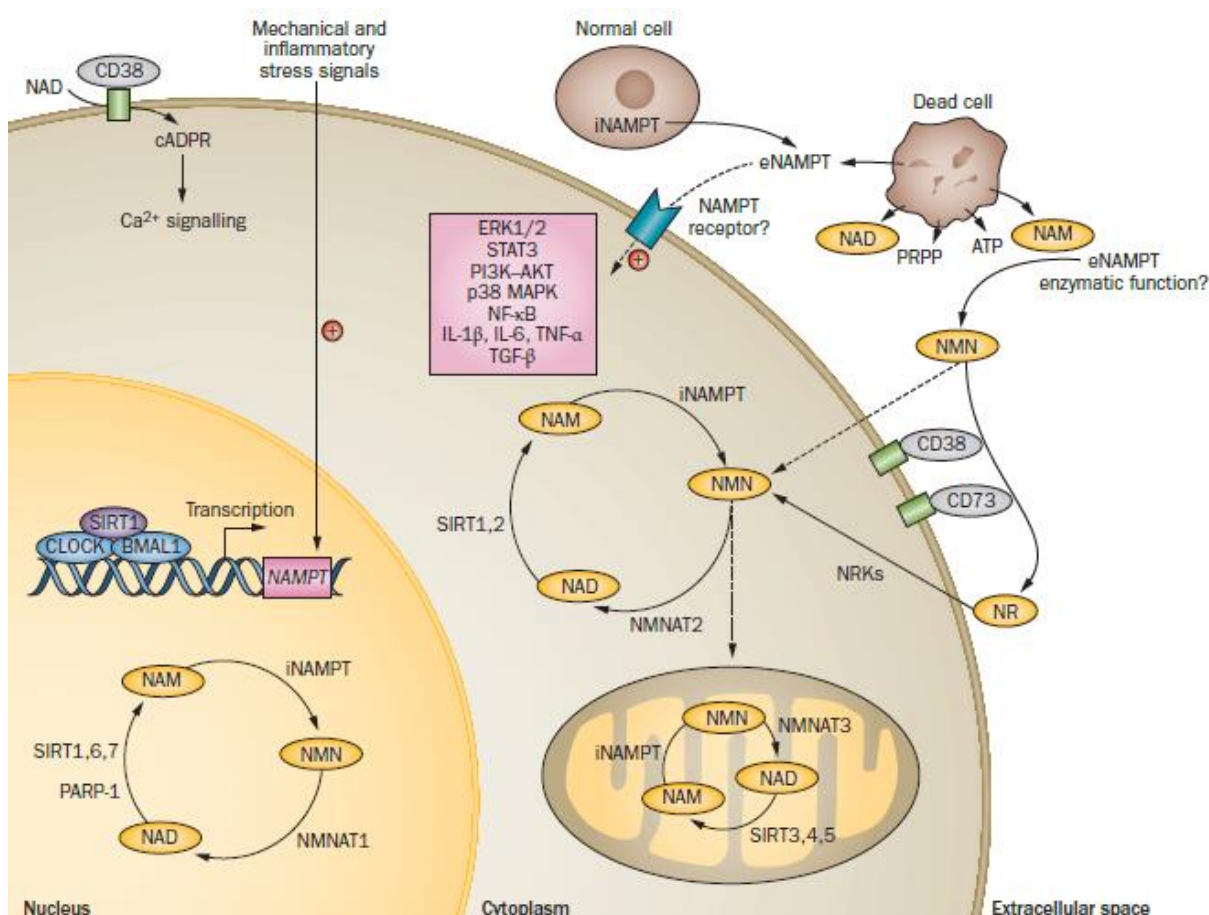
späť na NAD⁺. Bolo dokázané, že mnoho typov rakovinových buniek vysoko exprimuje NAMPT, čo odráža potenciálne zvýšenú závislosť na tejto dráhe v dôsledku veľkého využitia NAD⁺ a v niektorých prípadoch aj straty expresie ďalších kľúčových biosyntetických enzýmov NAD⁺. NMN môže však byť tiež produkovaný z nikotínamid ribozidu (NR) pomocou enzýmu nikotínamidribozid kinázy (NRK).¹⁵⁷⁻¹⁶³

Medzi typy rakoviny, ktoré majú vysokú expresiu NAMPT, patria kolorektálny karcinóm, rakovina prsníka, osteosarkóm, chondrosarkóm, pankreatický duktálny adenokarcinóm, orálny skvamocelulárny karcinóm, rakovina prostaty, rabdomyosarkóm, leiomyosarkóm, karcinóm gastroezofageálnej junkcie, karcinóm žalúdka, lymfóm, rakovina vaječníkov a niektoré typy rakoviny obličiek. V mnohých z týchto typov korelovala vyššia expresia NAMPT s horšími výsledkami liečby. Z týchto dráh je však klinickým cieľom NAMPT ako jediný z enzýmov produkujúcich NAD⁺, ktorý má obrovský význam v energetickom metabolizme rakovinových buniek ako kofaktor mnohých metabolických enzýmov. NAMPT inhibítory teda narúšajú energetický metabolizmus práve narúšaním špecifických metabolických dráh zníženou produkciou ATP a zvýšeným energetickým stresom. V rakovinových bunkách ovplyvňujú glykolýzu, oxidačnú fosforyláciu, biosyntézu serínu, pentózafosfátovú dráhu, metabolizmus aminokyselín, purínov a pyrimidínov, syntézu mastných kyselín a lipidov. Typy rakoviny nesúce mutácie v metabolických dráhach, v ktorých je zapojený enzým izocitrátdehydrogenáza (IDH), sú veľmi citlivé na stratu aktivity NAMPT.¹⁶⁴⁻¹⁷²

Okrem role v energetickom metabolizme hrá NAD⁺ životne dôležitú úlohu aj v mnohých ďalších bunkových funkciách, na ktoré sa môžu tiež zameriavať NAMPT inhibítory. Chápanie nemetabolických dôsledkov inhibície NAMPT môže odhalovať ďalšie cieľové miesta, čo by umožňovalo cieleňú liečbu rakoviny.

2.3.1. Biologický účinok NAMPT inhibítorov

Sirtuíny (SIRT, silent information regulators) sú enzýmy zo skupiny deacetyláz, závislých na NAD⁺, a ADP-ribozyltransferáz, ktoré sú zodpovedné za významnú spotrebu NAD⁺ v bunkách (obr. 25).



Obrázok 25: Fyziologické dráhy intracelulárnych iNAMPT a extracelulárnych eNAMPT.¹⁶¹

Čím ďalej tým viac je zdôrazňovaná ich dôležitosť pri rakovine a zacielení ich funkcie pri niektorých druhoch rakoviny. Dôležitý je preto fakt, že NAMPT sa zúčastňuje expresie sirtuínov. V modeloch kolorektálneho karcinómu (CRC) bolo zistené, že regulácia aktivity sirtuínu SIRT1 je sprostredkovaná práve pomocou NAMPT. Tá je priamym transkripčným cieľom *c-Myc*, ktorý je regulačným génom a proto-onkogénom kódujúcim transkripčné faktory. Dochádza tak ku vzniku spätoväzobnej slučky medzi *c-Myc*, NAMPT a SIRT1, ktorá vedie ku proliferácii a progresii nádoru. Použitie NAMPT inhibítorov by preto malo za následok stratu expresie SIRT1, derepresiu TP53 (gén kódujúci proteín p53) a zníženú proliferáciu nádorových

buniek v modeloch CRC. Podobný účinok bol pozorovaný v modeloch rakoviny prostaty a žalúdka.¹⁷³⁻¹⁷⁶ Regulácia sirtuínov pomocou NAMPT bola pozorovaná aj u iných typov rakoviny. V melanómových bunkách bolo dokázané, že regulácia E2F2 (jeden z aktivačných génov kódujúcich transkripčné faktory eukaryot, ktoré sú dôležité v regulácii bunkového cyklu a syntézy DNA u cicavcov) pomocou NAMPT ovplyvňuje transkripciu a transláciu SIRT1 a strata aktivity NAMPT vedie k aktivácii TP53 a teda následnej apoptóze bunky. U tých typov rakoviny, u ktorých nebolo ešte objasnené priame regulačné spojenie medzi NAMPT a sirtuínmi, bolo dokázané, že experimentálna indukcia NAMPT účinne vplyva na aktivitu SIRT, spôsobuje zníženie aktivity SIRT1, SIRT2 a SIRT3. Zaujímavosťou je, že funkčný význam NAMPT na sirtuíny je pravdepodobne špecifický pre rakovinové bunky, pretože zmeny v expresii SIRT1 inhibovaním NAMPT neboli pozorované vo všetkých bunkách citlivých na NAMPT inhibítory. Tieto rozdiely môžu byť dôležitými pre klinické využitie, nakoľko môžu určovať, ktoré typy onkologických ochorení sú citlivejšie na NAMPT inhibítory.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹

Poly-(ADP-ribózové)polymerázy (PARP) predstavujú ďalšiu skupinu proteínov závislých na NAD⁺, pretože spotrebúvajú veľkú časť bunkového NAD⁺. PARP zohrávajú kľúčovú úlohu pri detekcii a oprave poškodenia DNA. Očakávaným dôsledkom vyčerpania NAD⁺ je teda oslabenie opravy poškodenia DNA. Znížená aktivita PARP po použití NAMPT inhibítorov bola spozorovaná pri Ewingovom sarkóme a trojnásobne negatívnej rakovine prsníka, čo sa stalo základom preklinických testov inhibítorov NAMPT aj inhibítorov PARP. V oboch prípadoch rakoviny bola dokázaná synergia medzi jednotlivými inhibítormi. Pri štúdiách rakoviny prsníka bol zaznamenaný najväčší účinok v modeloch s deficitom BRCA (BReast Cancer supresorové gény, ktorých produkty sa zúčastňujú kontroly bunkového cyklu a opráv poškodenej DNA), čo naznačuje, že defekty v homológnej rekombinácii môžu zvyšovať účinnosť inhibície NAMPT. Tieto zistenia naznačujú, že inhibícia NAMPT zhoršuje nehomologické spájanie koncov a zvyšuje bunkovú závislosť na homológnej rekombinácii. Ewingov sarkóm je tiež charakterizovaný homológnou rekombináciou aj napriek neprítomnosti BRCA, čo ďalej podporuje myšlienku, že rakovinové bunky s chybnými mechanizmami opravy DNA majú zvýšenú náchylnosť na inhibíciu NAMPT. Iné typy rakoviny s defektmi opravy DNA boli charakterizované ako selektívne citlivé na NAMPT inhibítory.¹⁸⁰⁻¹⁸³ U rakoviny vaječníkov korelovala expresia NAMPT, kľúčového enzýmu v Preiss-Handlerovej dráhe, s expresiou BRCA a bunky nesúce tieto vlastnosti boli výrazne citlivejšie voči NAMPT inhibítorom. Štúdie následkov inhibície NAMPT na opravu poškodenia DNA popisujú rôzne

účinky vrátane zníženej PARylácie (posttranslačná modifikácia proteínov pomocou PARP), zníženej expresie RAD51 (eukaryotický gén kódujúci enzým zúčastňujúci sa na oprave dvojvláknových zlomov DNA) a narušenia opravy dvojvláknových zlomov homológou rekombináciou. Na základe týchto poznatkov sa niekoľko ďalších štúdií snažilo určiť účinnosť inhibítorov v kombinácii s látkami poškodzujúcimi DNA. Zvýšená protinádorová aktivita bola zaznamenaná pri viacerých malignitách ak boli NAMPT inhibítory kombinované s ožarovaním, DNA alkylačnými činidlami, inhibítormi topoizomerázy či inými chemoterapeutikami, o ktorých je známe, že zosilňujú účinky narušenia opravy DNA. U niektorých druhov rakoviny bolo zvýšenie účinnosti obmedzené len na kombinácie s určitými chemoterapeutikami. Pre model rakoviny pankreasu bolo dokázané, že antiproliferatívny účinok NAMPT inhibítorov zvyšuje práve kombinácia s gemcitabínom, nie však 5-fluóruracilom či oxaliplatinou. V iných štúdiách boli kombinatorické účinky NAMPT inhibítorov s liekmi z iných chemoterapeutických tried podobné. Mechanizmy však nie sú zatiaľ známe. Štúdia charakterizujúca účinky rezistencie na inhibítory NAMPT v bunkových líniiach CRC dokázala zmeny v expresii génov zapojených do opravy DNA a zvýšenú citlivosť na činidlá poškodzujúce DNA, čo opäť naznačuje úzke spojenie medzi NAMPT a opravou poškodenia DNA. Tieto poznatky majú preto veľký klinický význam, nakoľko naznačujú, že nádory s určitými defektmi v opravných mechanizmoch DNA môžu byť selektívne citlivé na inhibítory NAMPT a že kombinácie s chemoterapeutikami môžu zvýšiť účinnosť tejto triedy látok, najmä pre niektoré typy rakoviny.¹⁸⁴⁻¹⁸⁹

Udržiavanie intracelulárnej redoxnej homeostázy je náročným bunkovým procesom, ktorý si vyžaduje rovnováhu medzi tvorbou a elimináciou reaktívnych foriem kyslíku (ROS), nakoľko nadmerné hladiny ROS môžu spôsobovať bunkovú smrť. NAD⁺ je dôležitým regulátorom bunkových hladín ROS, ktoré sa po jeho vyčerpaní môžu akumulovať. Platí to najmä pre rakovinové bunky, ktoré majú všeobecne zvýšenú produkciu ROS a vyžadujú si prísnu kontrolu ich rovnováhy. Ďalším dôsledkom inhibície NAMPT je tak narušenie homeostázy ROS. V bunkovej línii CRC spôsobovali NAMPT zvýšenie zásob NADH (redukovanej formy NAD⁺), čím boli bunky chránené pred oxidačným stresom. V bunkových líniiach rakoviny prsníka zvýšili NAMPT hladinu NAD⁺, ktorý sa mohol pentózafosfátovou dráhou premieňať na NADPH a udržiavať tak glutatión v redukovanom stave. To bolo obzvlášť dôležité v bunkách s glukózovou depriváciou, u ktorých vysoké hladiny NAMPT znižovali hladiny mitochondriálnych ROS. Okrem toho v niekoľkých štúdiách inhibícia NAMPT zvýšila citlivosť rakovinových buniek na oxidačný stres znížením ich antioxidačnej kapacity

prostredníctvom redukcie antioxidantných proteínov.¹⁹⁰⁻¹⁹² Bolo dokázané, že inhibícia NAMPT ovplyvňuje ROS v bunkách nemalobunkového karcinómu pľúc, leukémie, rakoviny prostaty, prsníka, glioblastómu, kolorektálneho karcinómu a ďalších. Vo všetkých prípadoch to malo za následok stratu životaschopnosti týchto buniek. Okrem toho bol tiež zaznamenaný rozdielny účinok medzi indukciou ROS v rakovinových bunkách v porovnaní s normálnymi zdravými bunkami ošetrovanými NAMPT inhibítormi, čo naznačuje existenciu terapeutického okna v indukcii týmito látkami. Zaujímavé je, že všetky rakovinové bunky vykazujú zvýšenie ROS po inhibícii NAMPT, u niektorých typov, ako napríklad u Ewingovho sarkómu či nemalobunkovom karcinóme pľúc boli tieto bunky schopné udržať ROS v rovnováhe napriek prítomnosti NAMPT inhibítorov. Účinok inhibítorov je teda závislý od typu buniek, čo môže byť pri určitých typoch dôsledkom dráh produkujúcich NAD⁺, ako je napríklad Preiss-Handlerova dráha.^{180,193,194}

U niektorých typov rakoviny bolo pozorované prepojenie medzi NAMPT a onkogénnymi signálnymi dráhami. Z klinického hľadiska je výbornou stratégiou spoločné zacielenie NAMPT s týmito dráhami. V niektorých prípadoch regulujú onkogénne faktory expresiu a aktivitu NAMPT, ako napríklad v Ewingovom sarkóme, kde bolo dokázané, že onkogénny transkripčný faktor EWS-FL11 reguluje expresiu NAMPT, a pri rakovine prsníka tumorový supresor FOXO1 negatívne reguluje expresiu NAMPT, zatiaľ čo ATK (proteínkináza B, serín/treonín-špecifická proteínkináza, ktorá hrá kľúčovú úlohu v metabolizme glukózy, apoptóze, bunkovej proliferácii, transkripcii a bunkovej migrácii) ju reguluje pozitívne. V iných prípadoch NAMPT reguluje aktivitu onkogénnych signálnych dráh. Nadmerná expresia NAMPT v bunkách rakoviny prsníka a uvoľňovanie eNAMPT melanómovou bunkou boli spojené s fosforyláciou AKT. Bolo tiež zistené, že exogénnou eNAMPT indukciou fosforylácie AKT a ERK1 a ERK2 (extracelulárne signálom-redukované kinázy patriace do skupiny MAP kináz, regulujú bunkový cyklus a ich dráha sa aktivuje rastovými faktormi, cytokínmi, vírusovými infekciami či karcinogénmi) zvyšuje proliferáciu buniek rakoviny prsníka a použitie inhibítorov AKT a ERK1 a 2 tieto účinky môže vyrušiť. Vo viacerých nádorových modeloch bol inhibovaním NAMPT pozorovaný pokles fosfo-ERK1 a 2 a kombináciou inhibítorov NAMPT s blokovaním ERK1 a 2 sa zvýšila bunková smrť.¹⁹⁵⁻²⁰⁰ mTOR v niektorých malignitách tiež interaguje s NAMPT, s ktorej inhibíciou je preto spojená strata aktivácie mTOR. V tomto prípade bolo tiež pozorované zvýšenie aktivácie AMPK (AMP-aktivované proteínkinázy). Pri rakovine pankreasu bol antiproliferatívny účinok inhibície NAMPT zosilnený súčasným podávaním inhibítorov mTOR podobne ako u modelov

viacnásobného myelómu. Naopak zmeny v AMPK a mTOR neboli pozorovateľné u normálnych buniek ošetrovaných NAMPT inhibítormi. Počas skúmania zmien v expresii NAMPT, ku ktorým dochádza počas vývoja rezistencie na lieky v cielej terapii, boli zistené vyššie hladiny intracelulárnych aj extracelulárnych NAMPT v bunkách melanómu rezistentným voči inhibítoru BRAF (gén kódujúci B-Raf proteín, ktorý je známym proto-onkogénom). Rezistencia na inhibítory BRAF by tak mohla byť prekonaná práve použitím NAMPT inhibítorov. Navyše indukovaná expresia NAMPT zvyšovala rezistentnosť buniek na BRAF inhibítory, zatiaľ čo inhibícia BRAF v týchto bunkách viedla ku zníženiu transkripcie NAMPT.²⁰¹⁻²⁰⁶

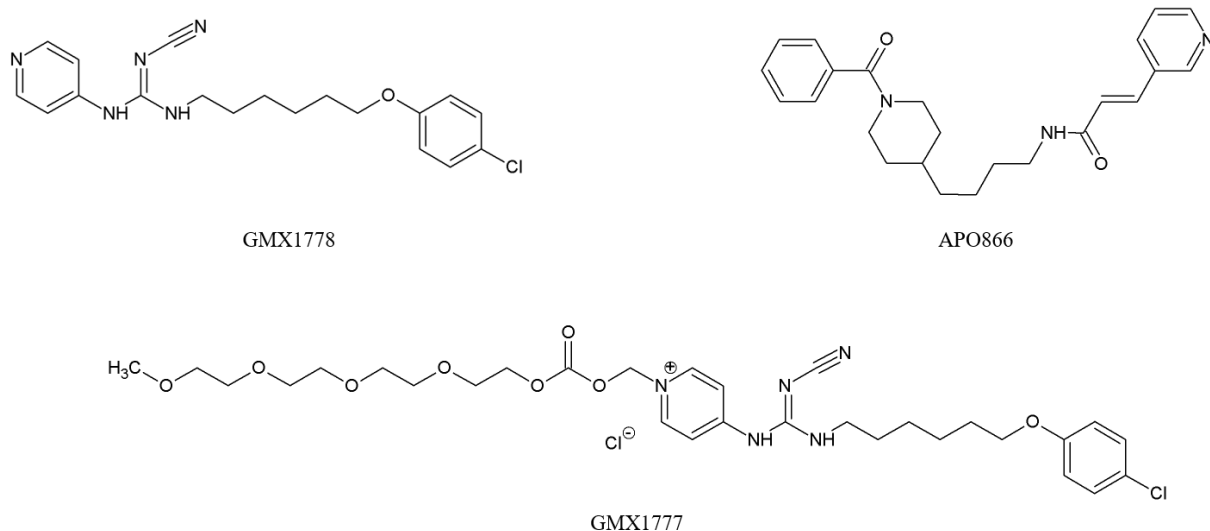
NAMPT je popísaná ako mediátor kmeňových rakovinových buniek. Klinické štúdie kolorektálneho karcinómu odhalili, že vysoká expresia NAMPT bola spojená s prítomnosťou vysokého podielu buniek iniciujúcich rakovinu. Bolo to spôsobené vplyvom NAMPT na transkripčnú reguláciu signálnych dráh kmeňových buniek sprostredkovanú pomocou SIRT1 a PARP. V glioblastómových bunkách bola rovnako ako u kmeňových buniek pozorovaná vysoká expresia NAMPT. Inhibícia NAMPT znižovala schopnosť kmeňových buniek glioblastómu samoobnovovať sa a tvoriť nádory *in vivo*. Inhibícia NAMPT tiež zvracia schopnosť diferenciacie nádorových buniek. Ovplyvňuje aj epitelovo-mezenchymálny prechod (EMT) v rakovinových bunkách, ktorý predstavuje proces premeny epitelovej bunky na bunku s mezenchymálnym fenotypom.²⁰⁷⁻²¹⁰ U hepatocelulárnych rakovinových buniek viedla inhibícia NAMPT ku zmenám markerových proteínov EMT, čo vedie ku jeho zvráteniu a následnému zníženiu bunkovej kapacity na inváziu a tvorbu metastáz prostredníctvom zníženia SIRT1. Podobné výsledky boli pozorované v bunkových líniiach rakoviny prsníka a osteosarkómu. U rakoviny pľúc však naopak inhibícia NAMPT aktivovala EMT a zvýšila tak bunkovú invazivitu prostredníctvom zníženia SIRT1 a v modeloch rakoviny prsníka zvýšila metastázovanie nádoru. Účinok inhibície NAMPT na EMT je preto zjavne špecifický pre určité bunkové typy. Zaujímavé je, že expresia NAMPT, ktorá sa líši medzi líniami rakovinových buniek, koreluje so stavom EMT a môže súvisieť s rozdielnymi účinkmi inhibície NAMPT na EMT.²¹¹⁻²¹⁵

Okrem účinku inhibície NAMPT na primárne nádorové bunky bola popísaná aj jej imunosupresívna schopnosť v prostredí nádoru. V modeloch rakoviny u myši bolo preukázané, že faktor stimulujúci kolonizovanie makrofágov zvyšuje expresiu NAMPT v myeloidných bunkách, čo negatívne reguluje expresiu CXCR4 (gén kódujúci chemokínový receptor) v krvotvorných bunkách kostnej drene. Následná nízka úroveň CXCR4 vedie ku mobilizácii

nezrelých supresorových buniek odvođených od myeloidov (MDSC), ktoré prispievajú ku imunosupresii nádoru. Je dôležitým poznatkom, že farmakologická inhibícia NAMPT viedla k zníženiu mobilizácie MDSC, k imunosupresii a resenzibilizácii nádorových buniek na imunoterapeutiká v predklinických testoch. Bolo tiež dokázané, že NAMPT je upregulovaná v neutrofiloch asociovaných s nádormi (TAN) u pacientov s melanómom či rakovinou hlavy a krku. Inhibícia NAMPT v *ex vivo* TAN znížila nádorovú angiogénu a proliferáciu prostredníctvom supresie SIRT1 a výslednej transkripčnej blokady proangiogénnych génov. Tieto výsledky naznačujú, že by mohli mať inhibítory NAMPT vplyv na zlepšenie klinickej imunoterapie.²¹⁶⁻²¹⁹

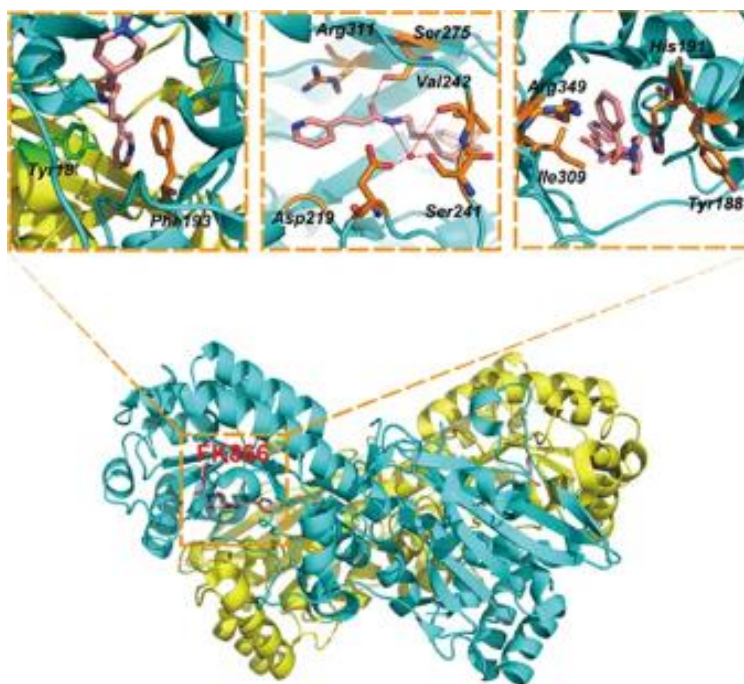
2.3.2. Štruktúrne typy NAMPT inhibítorov

Do klinického testovania sa dostali tri NAMPT inhibítory, a to GMX1778, tiež známy ako CHS-828, jeho vo vodnom prostredí rozpustnejšie proliečivo GMX1777 a APO666, tiež známe ako FK866 či WK175 (*obr. 26*). GMX1778 aj APO866 boli pôvodne identifikované ako silne antiproliferatívne látky vykazujúce silnú protinádorovú aktivitu *in vitro* aj *in vivo* v rôznych nádorových líniah.²²⁰⁻²²²



Obrázok 26: Štruktúrne vzorce NAMPT inhibítorov v klinickej fáze testovania.

NAMPT funguje ako symetrický homodimér s dvoma aktívnymi miestami vytvorenými na opačných koncoch dimérového rozhrania. NAMPT zvyšky kritické pre väzbu inhibítorov sa označujú primárnym a neprimárnym zápisom, napríklad Tyr18' a Phe193, aby bol rozlíšený monomérny reťazec, v ktorom sa daný zvyšok nachádza (*obr. 27*).



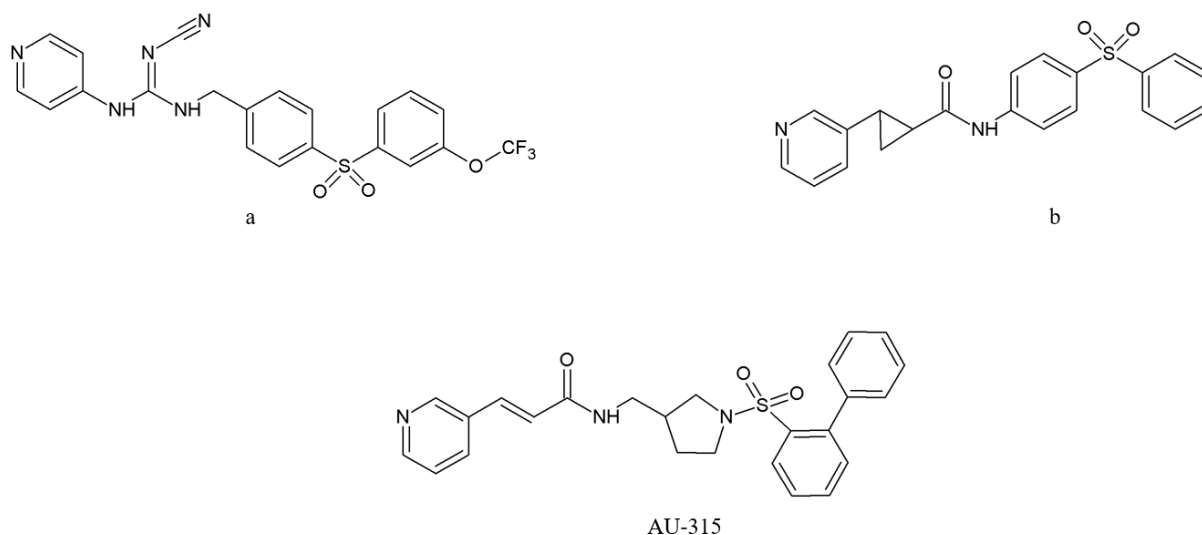
Obrázok 27: Kryštálová štruktúra NAMPT s FK866. Sú vyznačené FK866 (atómy uvedené oranžovou) a dva zvyšky proteínu. Viazaná poloha FK866 je znázornená zelenou a oranžovou. V hornej časti obrázku z ľava sú uvedené: π -vrstviace interakcie s NAMPT a hlavnou skupinou FK866, vodíková väzba medzi NAMPT a strednou skupinou FK866 a hydrofóbna väzba medzi NAMPT a chvostovou skupinou FK866.²²⁷

Pyridínové kruhy prítomné ako v GMX1778, tak v APO866, sa podieľajú na vyváženom π -vrstviacom usporiadaní s bočnými reťazcami zvyškov NAMPT Tyr18' a Phe193. Pyridínový kruh nikotínamidu (NAM) zaujíma toto väzobné miesto v NAMPT, čo naznačuje, že inhibítory GMX1778 a APO866 pravdepodobne fungujú ako mimetiká substrátu. Inhibítory tvoria vodíkové väzby s postranným reťazcom Asp219, pričom GMX1778 ich vytvára priamo, zatiaľ čo APO866 používa na premostenie interakcie strednú molekulu vody. Obe látky tiež tvoria priame vodíkové väzby k bočnému Ser275 reťazcu NAMPT. S týmto

zvyškom interaguje podobne veľa iných NAMPT inhibítorov, ale v niektorých prípadoch to zahŕňa aj premostujúcu molekulu vody. Centrálné komponenty inhibítorov vyčnievajúce z oblasti väzobného miesta NAMPT sa skladajú predovšetkým z hydrofóbných zvyškov. Kvôli svojej dĺžke a úzkemu tvaru sa táto väzobná časť NAMPT označuje ako tzv. „tunelová oblasť“. Zostávajúce časti inhibítorov siahajú do vysoko solventu exponovanej oblasti NAMPT väzobného miesta, kde prijímajú viaceré odlišné konformácie aby optimalizovali svoje interakcie s proteínom. Táto časť väzobného miesta NAMPT je veľmi tolerantná voči štruktúrnym modifikáciám či diverzite. Silné inhibítory NAMPT sa typicky viažu na proteín s heterocyklickými časťami ich štruktúr, ktoré obsadzujú väzbové miesto enzýmu NAM. Tieto pozorovania naznačujú, že inhibítory môžu fungovať ako mimetiká NAM a podliehajú fosforibozylácii prostredníctvom kondenzácie katalyzovanej NAMPT s prirodzene sa vyskytujúcim ko-substrátom, enzýmom fosforibozylpyrofosfátom (PRPP). Inhibítory NAMPT, ktoré vykazujú najúčinnnejšie bunkové antiproliferatívne účinky, tvoria adukty PRPP, ktoré sa pevne viažu na enzým.²²³⁻²²⁶

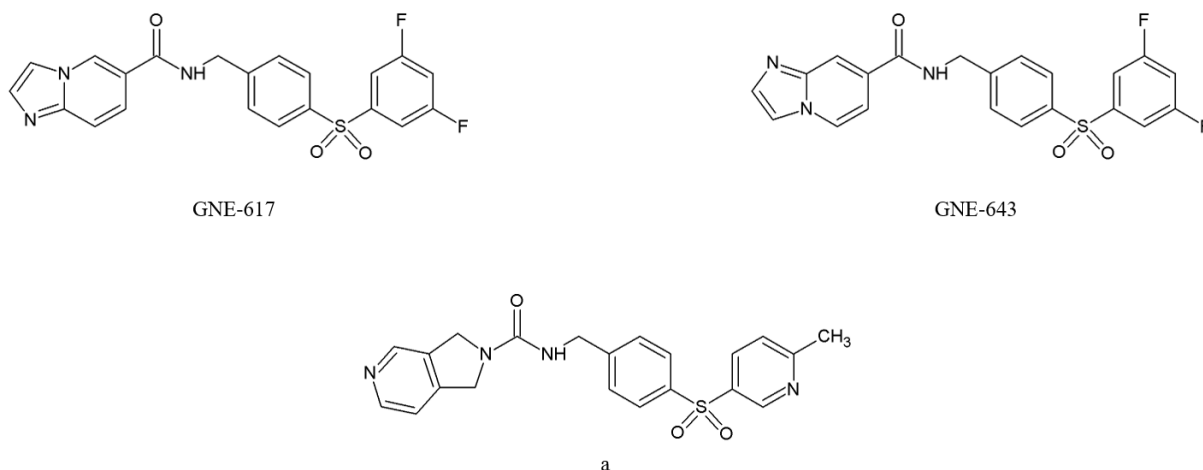
Pozorované interakcie medzi APO866 a NAMPT definujú farmakofor inhibítora NAMPT, ktorý pozostáva zo štyroch komponentov. Prvým je mimetikum NAM, typický heterocyklus obsahujúci slabo bázičný atóm dusíku, druhým je skupina, ktorá vytvára priestor, schopná tvoriť priame alebo vodou sprostredkované vodíkové väzby s postrannými reťazcami NAMPT zvyškov Asp19 a Ser275. Ďalšie dva komponenty sú relatívne úzka a hydrofóbná skupina schopná prechádzať cez „tunelovú oblasť“ NAMPT a uzatváracia skupina, ktorá vyčnieva do solventu exponovanej oblasti aktívneho miesta NAMPT.²²⁸

Od APO866 a GMX1778 boli odvodené im štruktúrne príbuzné inhibítory NAMPT. Silné antiproliferatívne účinky proti kultivovaným nádorovým bunkám vykazovali zlúčeniny obsahujúce kyanoguanidín. Zlúčenina obsahujúca okrem kyanoguanínu diarylsulfónovú skupinu (*obr. 28a*), ktorá reprezentuje skupinu schopnú prechádzať cez „tunelovú oblasť“, bola farmakologicky aktívna v nádoroch *in vitro* aj *in vivo*. Bola pripravená aj zlúčenina obsahujúca pyridín a inkorporovaný cyklopropylizoster (*obr. 28b*) namiesto *trans*-olefinu prítomného v APO866. Štruktúrne príbuzné molekuly vykazujú dobrú protinádorovú aktivitu v bunkovej línii fibrosarkómu. Boli zverejnené série pyridínov s *trans*-olefínmi, z ktorých pár látok vykazovalo silnú inhibičnú aktivitu NAMPT. Jedným z príkladov tohto typu zlúčenín je AU-315 (*obr. 28*), či jeho optimalizovaný analóg AU-771.²²⁹⁻²³¹



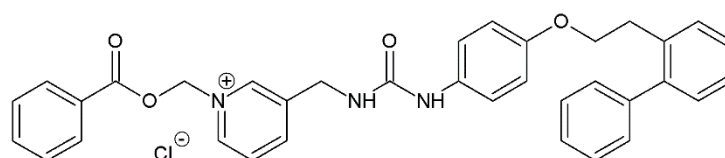
Obrázok 28: Štruktúrne vzorce NAMPT inhibítorov s a) diarylsulfónovou skupinou, b) cyklopropylizosterom a AU-315.

Boli pripravené NAMPT inhibítory obsahujúce vo svojich tunelových väzobných oblastiach sulfónové skupiny. Príkladom takýchto zlúčenín sú GNE-617 a jeho štruktúrny izomér GNE-643 (*obr. 29*). GNE-617 vykazoval vysokú účinnosť v bunkovej línii rakoviny vaječníkov. Jeho štruktúrny izomér bol však v porovnaní s GNE-617 omnoho menej účinný, až 180-krát slabší. Ich rozdielna účinnosť však nevyplýva z bunkovej priepustnosti, pretože tú majú takmer rovnakú. Na základe kryštalických štruktúr oboch izomérov v komplexoch s NAMPT bolo zistené, že GNE-643 vstupuje hlbšie do väzbovej oblasti NAM v porovnaní s GNE-617. Elektrostatický potenciál vo vnútri aktívneho miesta NAMPT by tiež mohol ovplyvňovať rozdiely v účinnosti inhibície, pretože má vplyv na orientáciu bicyklického kruhu, nakoľko GNE-643 a GNE-617 majú v tejto časti opačnú polaritu. Okrem zlúčenín obsahujúcich sulfónovú skupinu boli pripravené aj inhibítory, ktoré okrem nej obsahujú aj azaindazolovú skupinu. Zlúčenina GNE-618 je účinná v modeloch bunkových línii rakoviny vaječníkov. Účinnosť však bola vyššia v bunkových líniiach odvodených od ľudských a opičích než u myši. Tento typ inhibítorov je pozoruhodný, pretože vo svojej chemickej štruktúre typickej pre NAM mimetiká neobsahuje slabo bázičný atóm dusíku. Iný typ inhibítorov obsahujúcich sulfónovú skupinu tiež obsahuje močovinovú skupinu odvodenú od 2,3-dihydro-1H-pyrolo-[3,4-c]pyridínu (*obr. 29a*). Tieto zlúčeniny demonštrujú, že čiastočne nasýtené mimetikum NAM môže byť tolerované vo väzobnom mieste NAMPT.^{224,226,232,233}



Obrázok 29: Štruktúrne vzorce NAMPT inhibítorov GNE-617, GNE-643 a s a) močovinovou skupinou odvodenou od 2,3-dihydro-1H-pyrido [3,4-c]pyridínu.

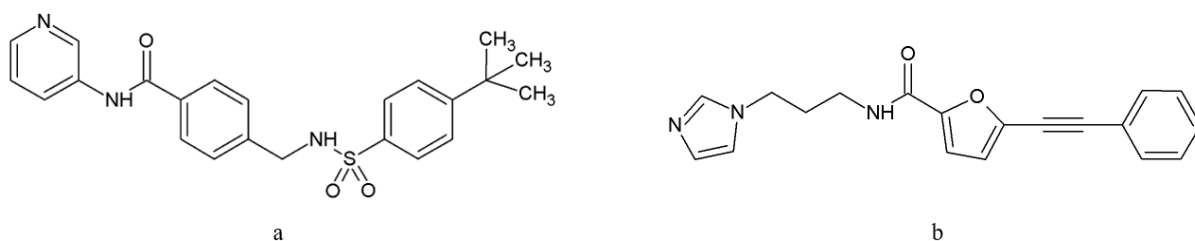
Publikovaných bolo niekoľko NAMPT inhibítorov obsahujúcich močovinovú skupinu odvodených od anilínu, u ktorých bola preukázaná silná NAMPT inhibičná schopnosť. Niektoré z tejto podskupiny obsahujú pyridínové proliečivo (*obr. 30*) a svoje antiproliferatívne vlastnosti preukázali najmä na modeli bunkovej línie fibrosarkómu. Kryštalické štruktúry týchto látok dokazujú, že majú väzobné pomery podobné zlúčenine APO866, pretože zahŕňajú vodou sprostredkovanú vodíkovú väzbu s Asp19.²³⁴⁻²³⁶



Obrázok 30: Štruktúrny vzorec NAMPT inhibítora s močovinovou skupinou a pyridínovým proliečivom.

Je známych aj mnoho ďalších odlišných podtried novšie identifikovaných NAMPT inhibítorov. Napríklad pyrido-tiadiazínová zlúčenina preukazovala inhibičnú aktivitu voči NAMPT, ale nepreukázala zmyslupný potenciál v bunkovom prostredí, pravdepodobne kvôli svojej polarite. Kryštalická štruktúra zlúčeniny v komplexe s NAMPT odhalila priame a vodou sprostredkované interakcie medzi tiadiazínovým zvyškom a dvoma dôležitými proteínovými zvyškami, Asp219 a Ser275. Tejto zlúčenine podobná, ale obsahujúca pyridínamid (*obr. 31a*),

vykazovala podobné NAMPT inhibičné vlastnosti, avšak so zlepšenou účinnosťou v bunkách. Táto zlúčenina, tiež známa ako STF-31, bola predtým opísaná ako inhibítor glukózového transportéru GLUT1. Najnovšie informácie o intracelulárnom mechanizme účinku tejto zlúčeniny naznačujú, že antiproliferatívne účinky pozorované pri tejto molekule sú pravdepodobne spôsobené inhibíciou NAMPT. Bolo pripravených aj niekoľko ďalších inhibítorov obsahujúcich vo svojej štruktúre amid. Jednou z nich je zlúčenina AS1604495 obsahujúca imidazol (*obr. 31b*) ako mimetikum NAM a bolo preukázané, že je aktívnym inhibítorom NAMPT aj v bunkovom prostredí. Tieto zlúčeniny sú ilustračnými príkladmi niekoľkých chemických entít, ktoré môžu úspešne prechádzať „tunelovou oblasťou“ NAMPT a držať skupiny naviazané vo väzbovej solventu exponovanej oblasti.^{225,231,237-240}

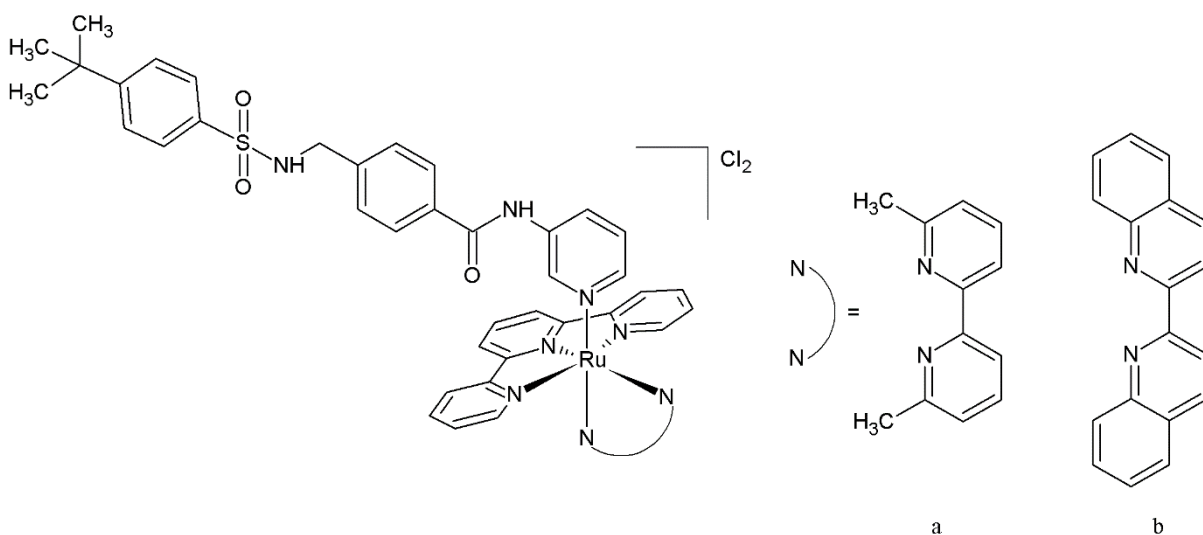


Obrázok 31: Štruktúrne vzorce NAMPT inhibítorov a) STF-31 a b) AS1604495.

2.3.3. Multi-cieľové komplexy s NAMPT inhibítormi

Najnovšie výskumy ukazujú, že jedným zo strategických riešení problému selektivity pri liečbe nádorových ochorení by mohla byť tzv. fotoaktivovaná chemoterapia PACT (PhotoActivated ChemoTherapy). Princíp tohto typu liečby spočíva v ukrytí toxicity lieku do tzv. klieťkového činidla, ktoré sa po ožiarení svetlom uvoľní, rovnako ako voľné liečivo. Veľmi vhodnými a sľubnými skupinami na „fotoklieťkovanie“ sú polypyridylové komplexy ruténia, pretože sa dajú odstrániť pomocou viditeľného svetla, zatiaľ čo väčšina organických „klieťkových“ skupín vyžaduje na aktiváciu UV svetlo. Na rozdiel od klinicky schválenej fotodynamickej terapie PDT, ktorá sa opiera o fotokatalytickú aktiváciu $^3\text{O}_2$ na $^1\text{O}_2$ fotosenzibilizátorom, je PACT nezávislý od kyslíku, čo z neho robí sľubnú terapeutickú stratégiu na liečbu hypoxických nádorov. Červené svetlo je ako aktivátor PACT zlúčenín lepšie než modré či zelené svetlo kvôli jeho hlbšej penetrácii v tkanivách (0,5-1,0 cm) a môže sa použiť aj vo vyšších dávkach bez významnej cytotoxicity indukovanej svetlom.²⁴¹⁻²⁴⁴ Boli pripravené komplexy ruténia, kde boli ako stericky bránené ruténiové klieťky zvolené

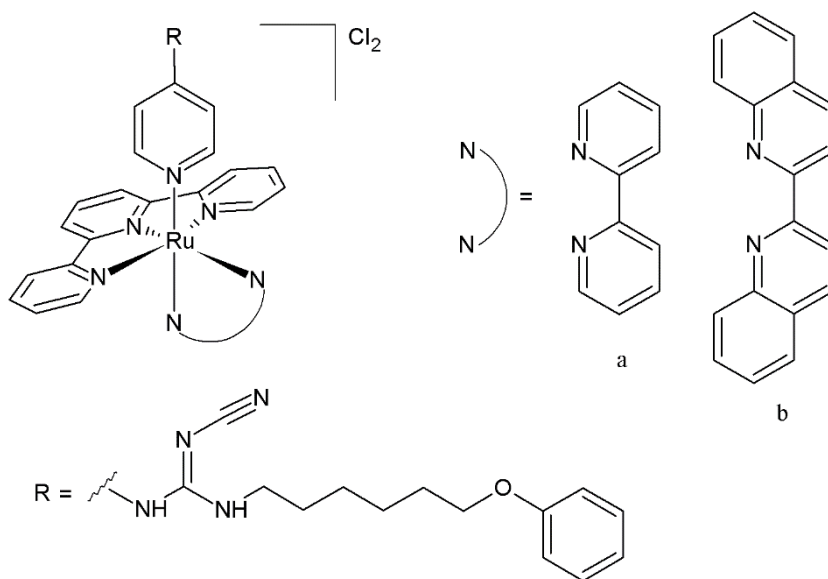
$[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dmbpy})(\text{L})]^{2+}$, kde tpy = 2,2', 6'-2''-terpyridín) a dmbpy = 6,6'-dimetyl-2,2'-bipyridín) a $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{biq})(\text{L})]^{2+}$, kde biq = 2,2'-bichinolín. Oba typy komplexov majú absorpčný pás, ktorý sa rozširuje v červenej oblasti spektra a fotodisociuje ich ligand, keď je monodentátom tioéterová alebo pyridínová skupina. Tieto skafoldy boli konjugované s 4-[[[4-(2-metyl-2-propanyl)fenyl]sulfonyl]amino)metyl]-N-(3-pyridinyl)benzamidom, inak známym ako STF-31 (*obr. 32*), ktorý je cytotoxickou organickou zlúčeninou obsahujúcou pyridínovú skupinu, ktorá sa môže koordinovať na ruténium. STF-31 inhibuje aktivitu NAMPT enzýmu a taktiež GLUT1. Bolo dokázané, že tieto komplexy uvoľňujú STF-31 po použití červeného svetla, čo vedie k účinnej PACT pri normoxii (21% O_2) a hypoxii (1% O_2). Pripravené komplexy vykazovali cytotoxické účinky voči bunkovým líniam ľudského adenokarcinómu pľúc, rakoviny prsníku a epidermoidného karcinómu.²⁴⁴⁻²⁴⁸



Obrázok 32: Štruktúrne vzorce Ru komplexov a) $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dmbpy})(\text{L})]^{2+}$ a b) $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{biq})(\text{L})]^{2+}$ s NAMPT inhibítorom STF-31.

Okrem komplexov ruténia s STF-31 NAMPT inhibítorom boli pripravené aj komplexy s (*N*-(6-(4-chlórfenoxy)hexyl)-*N'*-kyano-*N''*-4-pyridyl)guanidínom, známejším ako GMX1778 či CHS-828 NAMPT inhibítor, ktorý sa dostal do klinického testovania. Počas toho sa však zistilo, že liečivo vyvoláva okrem veľkých zmien vo farmakokinetike aj množstvo vedľajších účinkov, ktoré obmedzujú dávku, ako je napríklad trombóza či gastrointestinálna toxicita. Začlenenie tohto inhibítora do fotolabilných komplexov je preto možnou cestou, ako zlepšiť tieto obmedzenia. Pri syntéze komplexov (*obr. 33*) sa vychádzalo z prekursorov $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{L})]^{2+}$, kde bpy = 2,2'-bipyridín a $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{biq})(\text{L})]^{2+}$. Samotný GMX1778 je

nerozpustný vo vode a polárnych organických rozpúšťadlách, čo spôsobovalo jeho nízku *in vivo* biologickú dostupnosť. Pripravené komplexy sú dobre rozpustné vo vode aj organických rozpúšťadlách a v roztokoch vykazujú vysokú stabilitu. Naproti tomu ožarovanie vodných roztokov oboch komplexov modrým svetlom (465 nm) viedlo k zreteľnému zníženiu pôvodných absorpčných pásiem, súbežne s vytvorením nových o nižšej energii. Uvoľňovanie GMX1778 z komplexu $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{biq})(\text{GMX-1778})]^{2+}$ sa môže dosiahnuť tiež pri vyšších vlnových dĺžkach ožiarenia, a to 520 a 590 nm. Uvoľňovanie ligandu fotoindukovaním je síce za týchto podmienok pomalšie, ale umožňuje zvýšenie rozsahu liečby týmto komplexom hlbšie v tkanivách. U oboch komplexov sa však uvoľňuje významná koncentrácia GSX-1778 už pri relatívne nízkych dávkach svetla aj napriek pomalej rýchlosti fotoindukovanej výmeny ligandov. Bolo dokázané, že bipyridínový komplex menej uvoľňuje ligand v porovnaní s jeho bichinolínovým analógom. Oba komplexy však vykazovali dobré kancerostatické účinky voči bunkovým líniam ľudského adenokarcinómu a rakoviny prsníku.^{161,245,249-252}



Obrázok 33: Štruktúrne vzorce Ru komplexov a) $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{L})]^{2+}$ a b) $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{biq})(\text{L})]^{2+}$ s NAMPT inhibítorom GMX-1778 (L).

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1. Použité chemikálie a prístroje

Chemikálie a rozpúšťadlá (uvedené v *Tabuľke 1*) použité pri syntéze a meraniach boli komerčne dostupné a upravované len v prípade THF (použité molekulové sito na vysušenie).

Tabuľka 1: Zoznam použitých chemikálií a definície skratiek ich názvov.

<i>Názov chemikálie</i>	<i>Výrobca/dodávateľ</i>
1,2,3,4,5-pentametylcyklopentadién 95% (Cp*)	Sigma-Aldrich
2-(2-(difenylfosfíno)etyl)pyridín p. a. (pyep)	Sigma-Aldrich
1,10-fenantrolín (phen)	Sigma-Aldrich
4-hydroxybenzaldehyd	Sigma-Aldrich
4-pyrrolidínpyridín	Sigma-Aldrich
2, 2':6, 2''-terpyridín 98%	Sigma-Aldrich
2,3,4,5-tetrametyl-2-cyklopentanón	Sigma-Aldrich
α-terpinén 95%	Sigma-Aldrich
batofenantrolín 98% (bphen)	Alfa Aesar
benzoylchlorid	Sigma-Aldrich
dichlórmetán p.a.	Penta
dimetylsulfoxid- <i>d</i> ₆	Sigma-Aldrich
dusičnan strieborný 99,995%	Alfa Aesar
fenylmagnéziumbromid – 3M roztok v dietyléteri	Sigma-Aldrich
hexafluorofosfát draselný 99% p. a.	Acros Organics
hexafluorofosfát amónny 99% p. a.	Acros Organics
<i>n</i> -hexán 99% p.a.	Penta
hydridohlinitan lítny	Sigma-Aldrich
hydrochlorid 4-piperidínbutánovej kyseliny	Sigma-Aldrich
hydroxid draselný 85%	Sigma-Aldrich
hydroxid sodný 98%	Sigma-Aldrich
chlorid amónny p.a.	Chemapol
chlorid iriditý – hydrát 99%	Sigma-Aldrich
chlorid osmitý – hydrát 99%	Sigma-Aldrich
chlorid róditý – hydrát 99%	Sigma-Aldrich

chlorid rutitý – hydrát 99%	Sigma-Aldrich
chlorid sodný	Sigma-Aldrich
chloroform- <i>d</i>	Sigma-Aldrich
pyridín p.a. (py)	Lach-Ner
tetrahydrofurán p. a.	Lach-Ner
tetrametyl-(n-propyl)-cyklopentadién 97%	Sigma-Aldrich
trans-3-(3-pyridyl)akrylová kyselina 99% (pyaa)	Sigma-Aldrich
trifluorometanosulfonát strieborný (AgOTf) 99%	Sigma-Aldrich

^1H NMR a ^1H - ^1H gs-COSY 2D NMR experimenty boli prevádzané na prístroji 400 MHz NMR spektrometri (Varian) a 600 MHz JNM-ECA 600 II NMR spektrometri (JEOL). Vzorky na NMR experimenty boli rozpustené v CDCl_3 , $\text{MeOD-}d_4$ lebo $\text{DMSO-}d_6$ a analyzované pri teplote 298 K. Získané ^1H NMR spektrá boli referencované voči reziduálnym signálom daného rozpúšťadla s hodnotami δ rovnými 7,26 ppm pre CDCl_3 , 3,31 ppm pre $\text{MeOD-}d_4$ a 2,50 ppm pre $\text{DMSO-}d_6$. Štiepenie signálu v ^1H NMR spektrách je definované ako s = singlet, d = dublet, t = triplet, dd = dublet dubletu, sep = septet, m = multiplet.

Infračervené spektrá boli zmerané na prístroji FT/IR-4700 (Jasco) v rozsahu vlnočtov 400–4000 cm^{-1} za použitia techniky ATR.

Hmotnostné spektrá boli namerané prístrojom LCQ Fleet (Thermo Scientific) pre hmotnostnú spektrometriu MS s ionizáciou elektrosprejom ESI.

Na vybrané syntézy bol použitý mikrovlnný reakčný systém Monowave 50 (Anton Paar Czech Republic s.r.o., Praha, Česká republika).

3.2. Syntéza

3.2.1. Syntéza NAMPT inhibítora

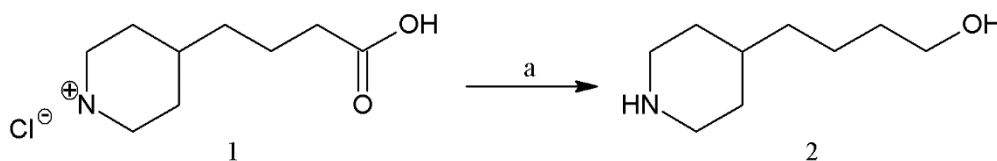
APO866: Príprava NAMPT inhibítora APO866 (FK866) bola prevádzaná na základe postupov z literatúry a optimalizáciou týchto postupov.^{253, 254}

- a) 1. 0,80 g **1** (hydrochlorid kyseliny 4-piperidínbutánovej) bolo rozsuspenzovaných v 15 ml THF pod atmosférou dusíku za stáleho miešania v ľadovom kúpeli. Ku suspenzii

bolo postupne pridávaných 0,37 g LiAlH₄. Výsledná suspenzia bola miešaná po dobu 1 hodiny pod atmosférou dusíku pri teplote 0 °C. Suspenzia bola následne doplnená o 20 ml THF, bola odstavená dusíková atmosféra a zmes bola ponechaná refluxovať pri 40 °C počas noci. Následne bolo pridaných 10 ml 20% vodného roztoku NaOH a zmes bola miešaná po dobu 1 hodiny za laboratórnej teploty. Zmes bola prefiltrovaná a filtrát bol následne odsatý na rotačnej vákuovej odparke RVO (*obr. 34*).

2. K suspenzii 1,81 g **1** v 30 ml THF bolo veľmi pomaly postupne pridaných 1,70 g LiAlH₄ za stáleho miešania. Reakčná zmes bola miešaná za laboratórnej teploty 10 minút a následne bola refluxovaná po dobu 4 hodín. Z dôvodu nedostatočného zregovania (TLC kontrola) bola zmes ponechaná na refluxe ďalších 24 hodín. Následne bolo pridaných 15 ml 30% vodného roztoku KOH do vychladenej reakčnej zmesi. Suspenzia bola miešaná 1 hodinu za laboratórnej teploty a následne bol filtrát odparený na RVO (*obr. 34*).

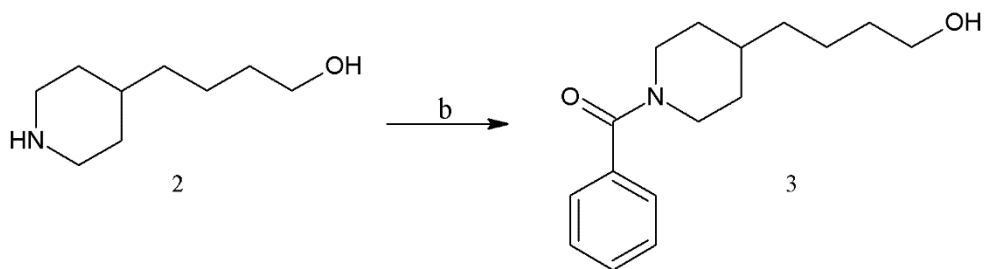
¹H NMR (MeOD-*d*₄, ppm): δ 3,51 (t, 2H), 2,97 (d, 2H), 2,51 (t, 2H), 1,66 (d, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,36 (m, 3H), 1,24 (m, 2H), 1,08 (m, 2H).



Obrázok 34: Schéma 1. kroku prípravy NAMPT inhibítora APO866.

b) V atmosfére dusíku bolo k vychladenej zmesi **2** s 20 ml CH₂Cl₂ pridaných 1,49 g trietylamínu a 1,03 g benzoylchloridu. Po 1 hodine bol roztok zriedený nasýteným roztokom NH₄Cl a extrahovaný vychladeným CH₂Cl₂. Organický extrakt boli následne premytý 2M roztokom NaOH a solankou (nasýteným roztokom NaCl). Bolo pridané primerané množstvo Na₂SO₄. Bol odfiltrovaný roztok, z ktorého bolo následne na RVO odparené rozpúšťadlo (*obr. 35*).

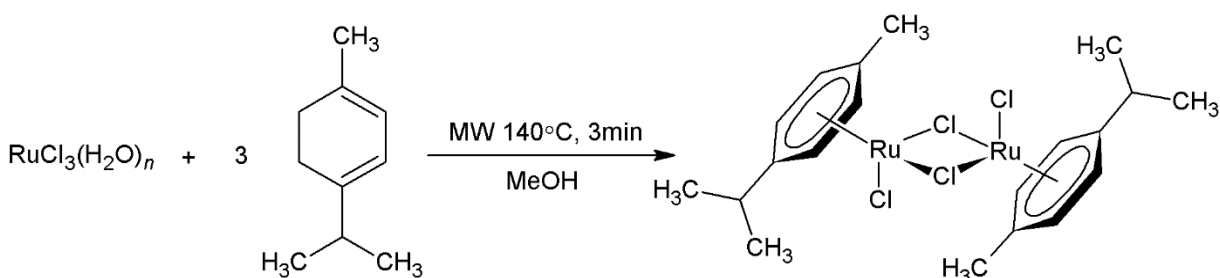
¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 8,03 (m, 1H), 7,57–7,33 (m, 4H), 4,68 (br, 1H), 4,32 (m, 1H), 3,70 (br, 1H), 3,62 (t, 1H), 2,96 (br, 1H), 2,74 (br, 1H), 2,16 (br, 1H), 1,76 (m, 2H), 1,54 (m, 3H), 1,45–1,10 ppm (m, 6-H)



Obrázok 35: Schéma 2. kroku prípravy NAMPT inhibítora APO866.

3.2.2. Syntéza komplexných zlúčenín

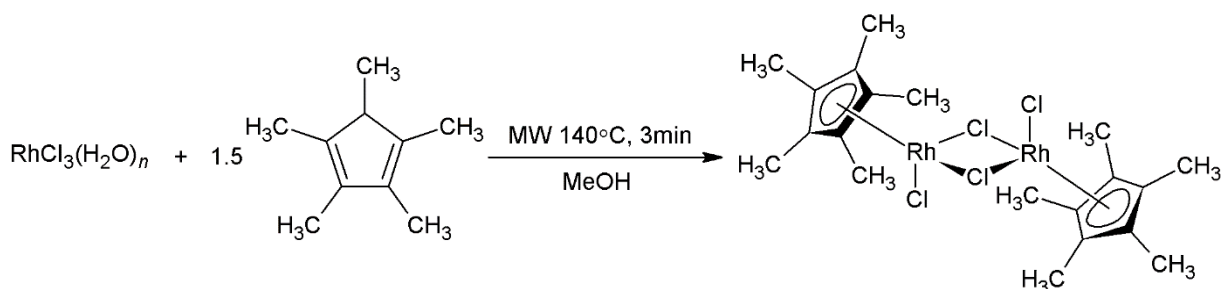
Dimér $[\text{Ru}_2(\mu\text{-Cl})_2(\eta^6\text{-pcym})_2\text{Cl}_2]$: Príprava diméru bola prevádzaná na základe postupov uvedených v literatúre.²⁵⁵ 0,50 g $\text{RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})_n$ (2,40 mmol) s 0,94 ml α -terpinénu (7,00 mmol) bolo v 5 ml metanolu vložených v hrubostennej vialke do mikrovlnného syntetizátoru. Podmienky syntézy boli nastavené na 140 °C po dobu 3 minút. Po reakcii bol roztok komplexu oddekantovaný do vialky a po pár hodinách bolo pridaných pár ml Et_2O . Výsledná hnedá zrazenina komplexu **Rud** bola odsatá, na frite premytá Et_2O a vysušená. Výťažnosť **Rud** komplexu bola 68%.



Obrázok 36: Schéma prípravy **Rud** komplexu.

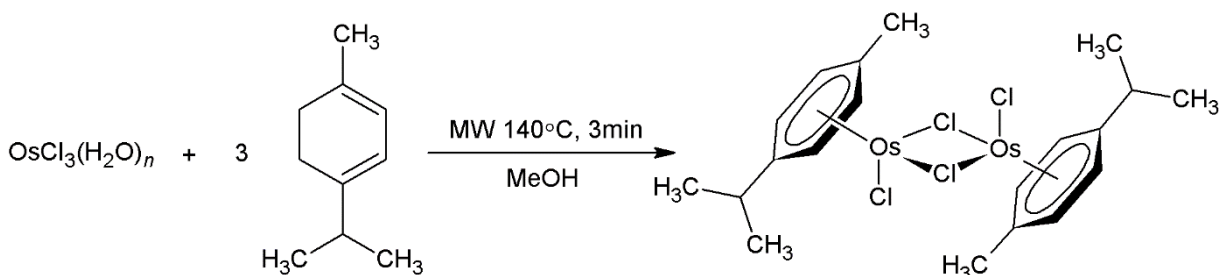
Dimér $[\text{Rh}_2(\mu\text{-Cl})_2(\eta^5\text{-Cp}^*)_2\text{Cl}_2]$: Príprava diméru bola prevádzaná na základe postupov uvedených v literatúre.²⁵⁵ 0,50 g $\text{RhCl}_3(\text{H}_2\text{O})_n$ (1,92 mmol) bolo rozpustených v 5 ml MeOH v hrubostennej vialke a do suspenzie bolo pridaných 0,45 ml 1,2,3,4,5-pentametylcyklopentadiénu (2,85 mmol). Vialka bola umiestnená do mikrovlnného prístroja a podmienky reakcie boli nastavené na 140 °C po dobu 3 minút rovnako ako u **Rud**. Po vychladnutí na laboratórnu teplotu bolo k zdekantovanému roztoku komplexu **Rhd** pridaných

pár ml Et₂O. Výsledná hnedá zrazenina komplexu **Rhd** bola odsatá, na frite premytá Et₂O a vysušená. Výťažnosť **Rhd** komplexu bola 71%.



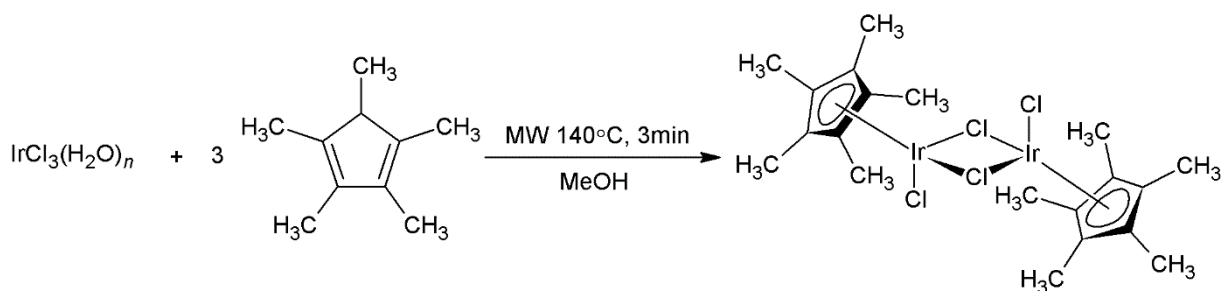
Obrázok 37: Schéma prípravy **Rhd** komplexu.

Dimér [Os₂(μ-Cl)₂(η⁶-pcym)₂Cl₂]: Príprava diméru bola prevádzaná na základe postupov uvedených v literatúre.²⁵⁶ Tento komplex bol pripravený rovnakým postupom ako jeho Ru analógu. Na syntézu bolo použitých 0,50 g OsCl₃(H₂O)_n (1,69 mmol) s 0,67 ml α-terpinénu (5,00 mmol) v 5 ml metanolu. Výsledná zrazenina komplexu **Osd** bola odsatá, na frite premytá Et₂O a vysušená. Výťažnosť **Osd** komplexu bola 65%.



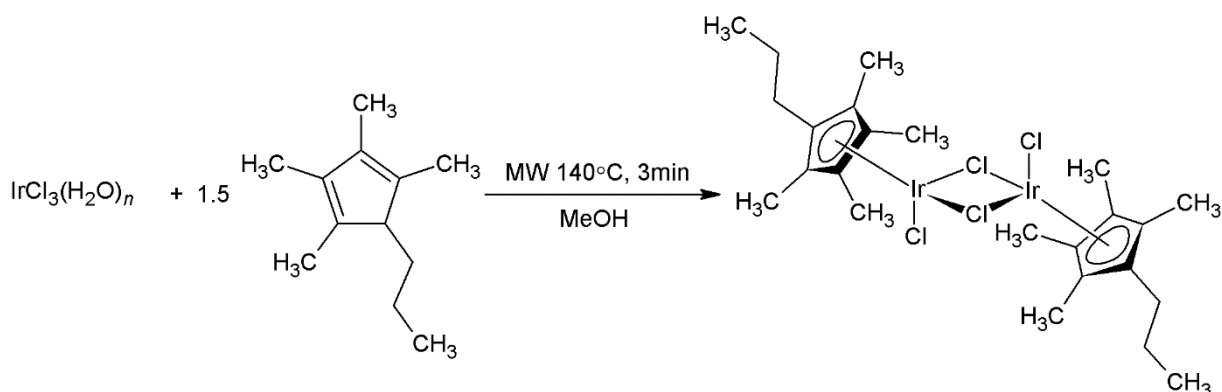
Obrázok 38: Schéma prípravy **Osd** komplexu.

Dimér [Ir₂(μ-Cl)₂(η⁵-Cp*)₂Cl₂]: Príprava diméru bola prevádzaná na základe postupov uvedených v literatúre.²⁵⁵ Tento komplex bol pripravený rovnakým postupom ako jeho Rh analógu. Na syntézu bolo použitých 0,50 g IrCl₃(H₂O)_n (1,38 mmol) bolo rozpustených v 5 ml MeOH v hrubostennej vialke a do suspenzie bolo pridaných 0,67 ml (4,27 mmol) 1,2,3,4,5-pentametylcyklopentadiénu. Výťažnosť tmavooranžovej zrazeniny komplexu **Ird** bola 76%.



Obrázok 39: Schéma prípravy **Ird** komplexu.

Dimér [Ir₂(μ-Cl)₂(η⁵-C₅Me₄Pr)₂Cl₂]: Príprava diméru bola prevádzaná na základe postupov uvedených v literatúre.²⁵⁵ Tento komplex bol pripravený rovnakým postupom ako jeho **Ird** analóg. Na syntézu bolo použitých 0,50 g IrCl₃(H₂O)_n (1,38 mmol) bolo rozpustených v 5 ml MeOH v hrubostennej vialke a do suspenzie bolo pridaných 0,43 ml (2,13 mmol) tetrametyl-(*n*-propyl)-cyklopentadiénu. Výťažnosť oranžovej zrazeniny komplexu **Ird2** bola 64%.



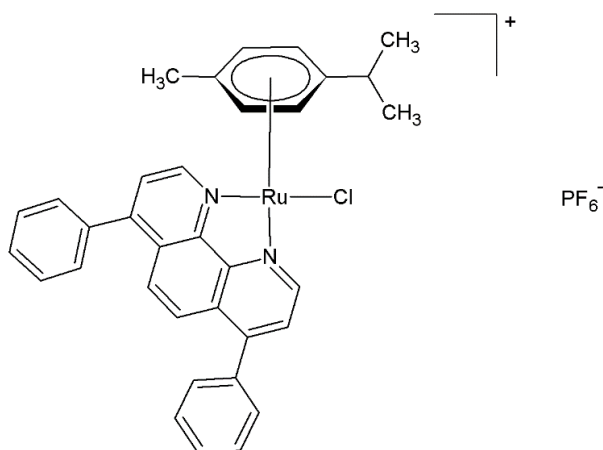
Obrázok 40: Schéma prípravy **Ird2** komplexu.

Komplex [Ru(η⁶-pcym)(bphen)Cl]PF₆

Príprava komplexu bola prevádzaná na základe postupov uvedených v literatúre.¹⁰⁰ 61,24 mg (0,10 mmol) diméru **Rud** bolo rozpustených v 5 ml MeOH a následne bolo k zmesi pridaných 49,86 mg (0,15 mmol) batofenantrolínu. Reakčná zmes bola v hrubostennej vialke vložená do mikrovlnného syntetizátoru. Podmienky boli nastavené na 140 °C na 3 minúty. Ku zmesi bolo po vychladnutí pridaných 0,49 g (3,0 mmol) NH₄PF₆. Po 15 minútach miešania bol výsledný komplex odsatý, premytý MeOH a vysušený na frite. Výťažnosť komplexu **Ru-Cl** bola 84%.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, ppm): δ 10,01 (d, 2H, bphen), 8,14 (m, 4H, bphen), 7,71 (m, 10H, bphen), 6,40 (d, 2H, pcym), 6,19 (d, 2H, pcym), 2,72 (sep, 1H, pcym), 2,19 (s, 3H, pcym), 1,02

(d, 6H, pcym). ESI+ MS (metanol, m/z): 603,2 (vyp. 603,1; 100%; $[\text{Ru}(\text{pcym})(\text{bphen})\text{Cl}]^+$), 568,3 (vyp. 568,1; 50%; $\{[\text{Ru}(\text{pcym})(\text{bphen})]-\text{H}\}^+$). IR (ATR, cm^{-1}): 3092, 2669, 2926, 1622, 1599, 1559, 1518, 1495, 1470, 1445, 1417, 1402, 1230, 1161, 1030, 1000, 926, 879, 864, 832, 770, 736, 700, 671, 636, 556, 490.

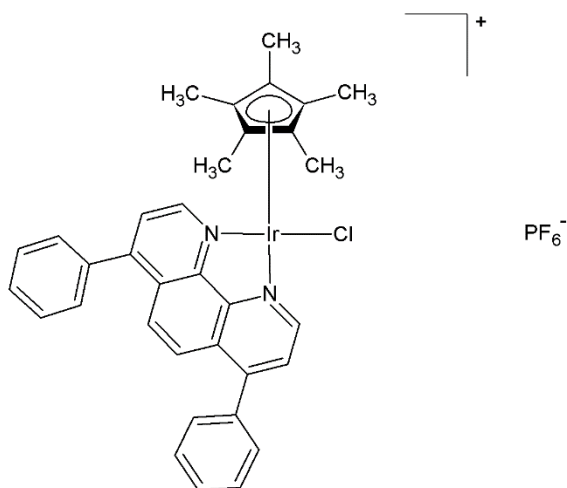


Obrázok 41: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})\text{Cl}]\text{PF}_6$.

Komplex $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bphen})\text{Cl}]\text{PF}_6$

39,84 mg (0,05 mmol) diméru **Ir**d bolo rozpustených v 5 ml MeOH a následne bolo k zmesi pridaných 49,86 mg (0,15 mmol) batofenantrolínu. Reakčná zmes bola v hrubostennej vialke vložená do mikrovlnného prístroja. Podmienky boli nastavené na 140 °C na 3 minúty. Ku zmesi bolo po vychladnutí pridaných 40,75 mg (0,25 mmol) NH_4PF_6 . Po 20 hodinách miešania bol výsledný komplex odsatý, premytý Et_2O a MeOH a vysušený na frite. Výťažnosť komplexu **Ir-Cl** bola 89%.

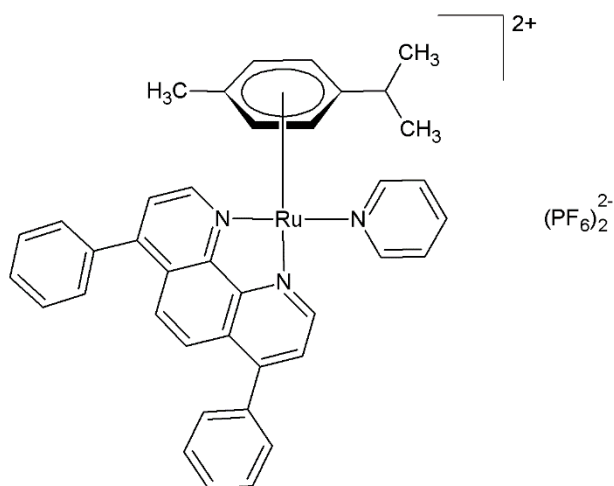
^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, ppm): δ 9,47 (d, 2H, bphen), 8,20 (s, 2H, bphen), 8,17 (d, 2H, bphen), 7,72 (m, 10H, bphen), 1,79 (s, 15H, Cp*). ESI+ MS (metanol, m/z): 695,3 (vyp. 695,2; 100%; $[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{bphen})\text{Cl}]^+$), 659,5 (vyp. 659,2; 5%; $\{[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{bphen})]-\text{H}\}^+$). IR (ATR, cm^{-1}): 3726, 3627, 3599, 3082, 2963, 2924, 1625, 1601, 1559, 1517, 1482, 1448, 1425, 1403, 1378, 1299, 1227, 1161, 1078, 1029, 926, 862, 833, 763, 734, 700, 671, 636, 556, 488, 456.



Obrázok 42: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bphen})\text{Cl}]\text{PF}_6$.

Komplex $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$

Príprava komplexu bola prevádzaná na základe postupov uvedených v literatúre.¹⁰⁰ K 37,40 mg (0,05 mmol) komplexu **Ru-Cl** rozpusteného v pár ml MeOH bolo pridaných 12,84 mg (0,05 mmol) AgOTf. Reakčná zmes bol miešaná po dobu 1 hodiny. Zmes bola prefiltrovaná a k filtrátu bolo pridaných 19,78 mg (0,25 mmol) pyridínu za stáleho miešania. Ku zmesi bolo pridaných 46,00 mg (0,25 mmol) KPF₆. Po 20 hodinách miešania bolo ku roztoku komplexu pridaných pár ml Et₂O. Výsledný oranžový komplex bol odsatý, premytý CH₂Cl₂ a vysušený na frite. Výťažnosť komplexu **Ru-py** bola 69%.



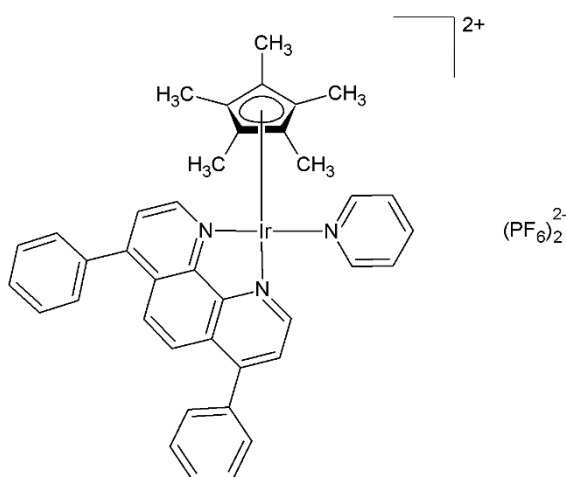
Obrázok 43: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$.

^1H NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 10,36 (d, 2H, bphen), 8,61 (d, 2H, py), 8,37 (d, 2H, bphen), 8,12 (s, 2H, bphen), 7,95 (t, 1H, py), 7,69 (m, 10H, bphen), 7,48 (t, 2H, py), 6,76 (d, 2H, pcym), 6,41 (d, 2H, pcym), 2,45 (sep, 1H, pcym), 1,78 (s, 3H, pcym), 0,78 (d, 6H, pcym). ESI+ MS (metanol, m/z): 603,2 (vyp. 603,1; 100%; $[\text{Ru}(\text{pcym})(\text{bphen})\text{Cl}]^+$), 568,2 (vyp. 568,1; 40%; $\{[\text{Ru}(\text{pcym})(\text{bphen})]-\text{H}\}^+$).

Komplex $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bphen})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$

21,00 mg (0,025 mmol) **Ir-Cl** komplexu bolo rozpustených v pár ml MeOH a k roztoku bolo pridaných 4,25 mg (0,05 mmol) AgNO_3 . Zmes bola po dobu 1 hodiny miešaná v alobale. Výsledná zmes bola prefiltrovaná a k filtrátu bolo pridaných 98,80 mg (1,25 mmol) pyridínu. Roztok bol miešaný 48 hodín pri laboratórnej teplote a následne bol odsatý, premytý Et_2O a vysušený. Výťažnosť komplexu **Ir-py** bola 72%.

ESI+ MS (methanol, m/z): 659,5 (vyp. 659,2; 10%; $\{[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{bphen})]-\text{H}\}^+$).

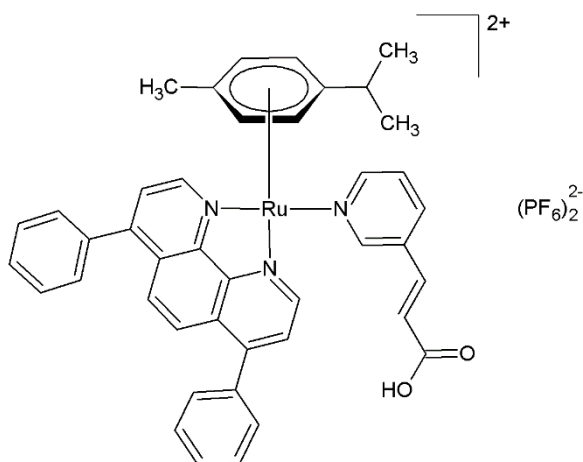


Obrázok 44: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bphen})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$.

Komplex $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{pyaa})](\text{PF}_6)_2$

37,40 mg (0,05 mmol) **Ru-Cl** komplexu bolo rozpustených v pár ml MeOH a k roztoku bolo pridaných 8,49 mg (0,10 mmol) AgNO_3 . Zmes bola po dobu 1 hodiny miešaná v alobale. Výsledná zmes bola prefiltrovaná a k filtrátu bolo pridaných 0,19 g (1,25 mmol) *trans*-3-(3-pyridyl)akrylovej kyseliny. Roztok bol miešaný 20 hodín pri laboratórnej teplote a následne bol odsatý, premytý Et_2O a vysušený. Výťažnosť výsledného žltého komplexu **Ru-pyaa** bola 68%.

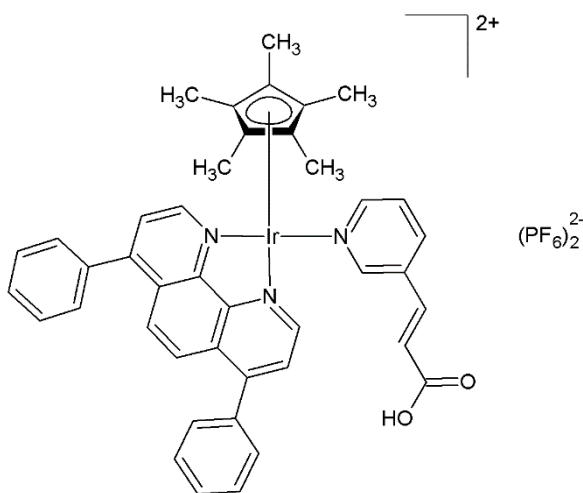
ESI+ MS (methanol, m/z): 716,1 (vyp. 716,2; 100%; {[Ru(pcy η^6)(bphen)(pyaa)]+PF $_6^-$ -H} $^+$), 567,3 (vyp. 567,1; 80%; {[Ru(pcy η^6)(bphen)]-H} $^+$).



Obrázok 45: Štruktúrny vzorec komplexu [Ru(η^6 -pcy)(bphen)(pyaa)](PF $_6$) $_2$.

Komplex [Ir(η^5 -Cp*)(bphen)(pyaa)](PF $_6$) $_2$

42,02 mg (0,05 mmol) **Ir-Cl** komplexu bolo rozpustených v pár ml MeOH a k roztoku bolo pridaných 8,49 mg (0,10 mmol) AgNO $_3$. Zmes bola po dobu 1 hodiny miešaná v alobale. Výsledná zmes bola prefiltrovaná a k filtrátu bolo pridaných 0,19 g (1,25 mmol) *trans*-3-(3-pyridyl)akrylovej kyseliny. Roztok bol miešaný 20 hodín pri laboratórnej teplote a následne bol odsatý, premytý Et $_2$ O a vysušený. Výťažnosť výsledného bledožltého komplexu **Ir-pyaa** bola 74%.



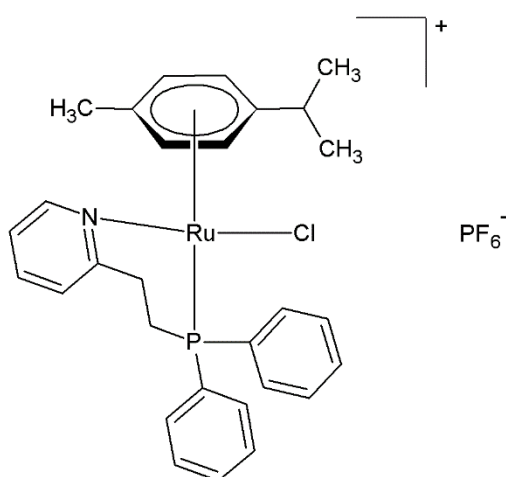
Obrázok 46: Štruktúrny vzorec komplexu [Ir(η^5 -Cp*)(bphen)(pyaa)](PF $_6$) $_2$.

ESI+ MS (metanol, m/z): 808,2 (vyp. 808,2; 70%; {[Ir(Cp*)(bphen)(pyaa)]+PF₆-H}⁺), 659,5 (vyp. 659,2; 100%; {[Ir(Cp*)(bphen)]-H}⁺).

Komplex [Ru(η^6 -pcym)(pyep)Cl]PF₆

61,24 mg (0,10 mmol) diméru **Rud** bolo rozpustených v 3 ml MeOH a následne bolo k zmesi pridaných 116,53 mg (0,40 mmol) 2-(2-(difenylfosfino)etyl)pyridínu. Reakčná zmes bola v hrubostennej vialke vložená do mikrovlnného syntetizátoru. Podmienky boli nastavené na 100 °C na 3 minúty. Ku zmesi bolo po vychladnutí pridaných 92,03 mg (0,5 mmol) KPF₆. Po 15 minútach miešania bol výsledný komplex odsatý, premytý Et₂O a vysušený na frite. Výťažnosť výsledného oranžového komplexu **Ru-pyep** bola 70%.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, ppm): δ 9,35 (d, 1H, pyep^{py}), 8,01 (t, 1H, pyep^{py}), 7,74 (t, 2H, pyep^{ph}), 7,68 (d, 1H, pyep^{py}), 7,62 (bs, 3H, pyep^{ph}), 7,44 (t, 1H, pyep^{py}), 7,40 (bs, 1H, pyep^{ph}), 7,33 (m, 4H, pyep^{ph}), 5,82 (d, 1H, pcym), 5,71 (d, 1H, pcym), 5,67 (d, 1H, pcym), 5,49 (d, 2H, pcym), 3,78 (dd, 1H, pyep^{et}), 3,30 (m, 1H, pyep^{et}), 3,07 (dd, 1H, pyep^{et}), 2,44 (sep, 1H, pcym), 1,91 (bs, 1H, pyep^{et}), 1,88 (s, 3H, pcym), 1,10 (d, 3H, pcym), 0,92 (d, 3H, pcym). ESI+ MS (metanol, m/z): 562,1 (vyp. 562,1; 100%; [Ru(pcym)(pyep)Cl]⁺), 526,2 (vyp. 526,1; 10%; {[Ru(pcym)(pyep)]-H}⁺), 426,1 (vyp. 426,1; 40%; {[Ru(pyep)Cl]⁺+ [Ru(pyep)(OCH₃)]⁺} (ca 1:1), 390,1 (vyp. 390,0; 50%; {[Ru(pyep)]-3H}⁺). IR (ATR, cm⁻¹): 3725, 3701, 3629, 3598, 3120, 3077, 3057, 2977, 2919, 2888, 1605, 1569, 1541, 1482, 1435, 1392, 1313, 1269, 1194, 1165, 1097, 1052, 1027, 998, 927, 876, 831, 777, 752, 697, 675, 556, 528, 512, 487, 473, 421.

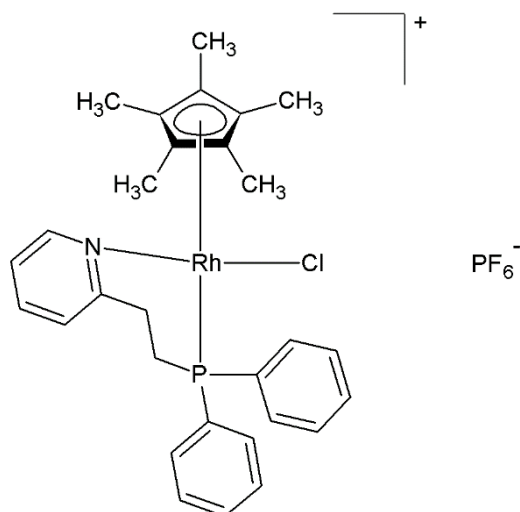


Obrázok 47: Štruktúrny vzorec komplexu [Ru(η^6 -pcym)(pyep)Cl]PF₆.

Komplex $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$

61,80 mg (0,10 mmol) diméru **Rhd** bolo rozpustených v 3 ml MeOH a následne bolo k zmesi pridaných 116,53 mg (0,40 mmol) 2-(2-(difenylfosfino)etyl)pyridínu. Reakčná zmes bola v hrubostennej vialke vložená do mikrovlnného prístroja. Podmienky boli nastavené na 100 °C na 3 minúty. Ku zmesi bolo po vychladnutí pridaných 92,03 mg (0,5 mmol) KPF_6 . Po 15 minútach miešania bol výsledný komplex odsatý, premytý Et_2O a vysušený na frite. Výťažnosť výsledného oranžového komplexu **Rh-pyep** bola 73%.

ESI+ MS (metanol, m/z): 564,1 (vyp. 564,1; 70%; $[\text{Rh}(\text{Cp}^*)(\text{pyep})\text{Cl}]^+$), 528,2 (vyp. 528,1; 70%; $\{[\text{Rh}(\text{Cp}^*)(\text{pyep})]-\text{H}\}^+$). IR (ATR, cm^{-1}): 3724, 3644, 3064, 3004, 2988, 2910, 2859, 1588, 1568, 1476, 1435, 1376, 1311, 1177, 1119, 1104, 1070, 1018, 997, 931, 831, 791, 770, 741, 716, 692, 631, 598, 556, 514, 478, 426.

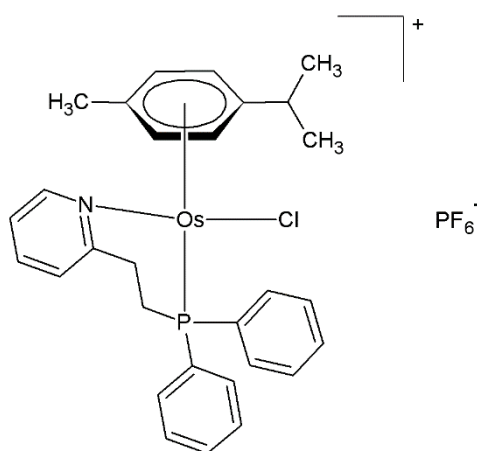


Obrázok 48: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$.

Komplex $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$

47,30 mg (0,06 mmol) diméru **Osd** bolo rozpustených v 3 ml MeOH a následne bolo k zmesi pridaných 69,92 mg (0,24 mmol) 2-(2-(difenylfosfino)etyl)pyridínu. Reakčná zmes bola v hrubostennej vialke vložená do mikrovlnného syntetizátoru. Podmienky boli nastavené na 100 °C na 3 minúty. Ku zmesi bolo po vychladnutí pridaných 48,90 mg (0,3 mmol) NH_4PF_6 . Po 15 minútach miešania bolo k výslednému roztoku komplexu pridaných pár kvapiek CH_2Cl_2 a hexánu. Výsledný komplex bol odsatý, premytý Et_2O a vysušený na frite. Výťažnosť výsledného komplexu **Os-pyep** bola 76%.

^1H NMR (DMSO- d_6 , ppm): δ 9,22 (d, 1H, pyep^{py}), 7,98 (t, 1H, pyep^{py}), 7,71 (d, 1H, pyep^{py}), 7,60 (m, 4H, pyep^{ph}), 7,54 (bs, 1H, pyep^{ph}), 7,49 (t, 2H, pyep^{ph}), 7,41 (m, 4H, pyep^{py}+pyep^{ph}), 5,97 (d, 1H, pcym), 5,78 (d, 1H, pcym), 5,74 (d, 1H, pcym), 5,48 (d, 2H, pcym), 3,86 (dd, 1H, pyep^{et}), 3,18 (m, 1H, pyep^{et}), 3,08 (dd, 1H, pyep^{et}), 2,41 (sep, 1H, pcym), 1,95 (s, 3H, pcym), 1,91 (m, 1H, pyep^{et}), 1,12 (d, 3H, pcym), 0,92 (d, 3H, pcym). ESI+ MS (metanol, m/z): 652,3 (vyp. 652,2; 100%; $[\text{Os}(\text{pcym})(\text{pyep})\text{Cl}]^+$), 616,3 (vyp. 616,2; 5%; $\{[\text{Os}(\text{pcym})(\text{pyep})]-\text{H}\}^+$), 514,1 (vyp. 514,1; 5%; $\{[\text{Os}(\text{pyep})\text{Cl}]^+ + [\text{Os}(\text{pyep})(\text{OCH}_3)]^+\}$ (ca 1:1), 480,2 (vyp. 480,1; 3%; $\{[\text{Os}(\text{pyep})]-3\text{H}\}^+$). IR (ATR, cm^{-1}): 3700, 3077, 2977, 1608, 1529, 1483, 1436, 1314, 1163, 1097, 1051, 1027, 879, 832, 778, 752, 699, 676, 557, 531, 514, 489, 474, 424.

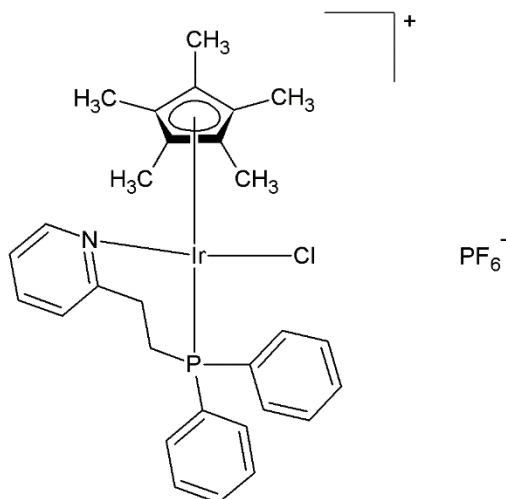


Obrázok 49: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$.

Komplex $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$

34,53 mg (0,04 mmol) diméru **Ir**d bolo rozpustených v 3 ml MeOH a následne bolo k zmesi pridaných 50,50 mg (0,17 mmol) 2-(2-(difenylfosfino)etyl)pyridínu. Reakčná zmes bola v hrubostennej vialke vložená do mikrovlnného prístroja. Podmienky boli nastavené na 100 °C na 3 minúty. Ku zmesi bolo po vychladnutí pridaných 35,05 mg (0,2 mmol) NH_4PF_6 . Po 15 minútach miešania bolo k výslednému roztoku komplexu pridaných pár kvapiek CH_2Cl_2 a hexánu. Výsledný komplex bol odsatý, premytý CH_2Cl_2 a vysušený na frite. Výťažnosť výsledného komplexu **Ir-pyep** bola 73%.

ESI+ MS (metanol, m/z): 945,1 (vyp. 945,3; 30%; $[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{pyep})_2\text{Cl}]^+$), 654,3 (vyp. 654,2; 100%; $[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{pyep})\text{Cl}]^+$), 618,4 (vyp. 618,2; 5%; $\{[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{pyep})]-\text{H}\}^+$). IR (ATR, cm^{-1}): 3723, 3642, 3054, 2972, 2929, 1595, 1570, 1471, 1435, 1377, 1316, 1223, 1200, 1157, 1099, 1019, 998, 935, 836, 746, 725, 696, 631, 594, 556, 538, 523, 506, 485, 453.

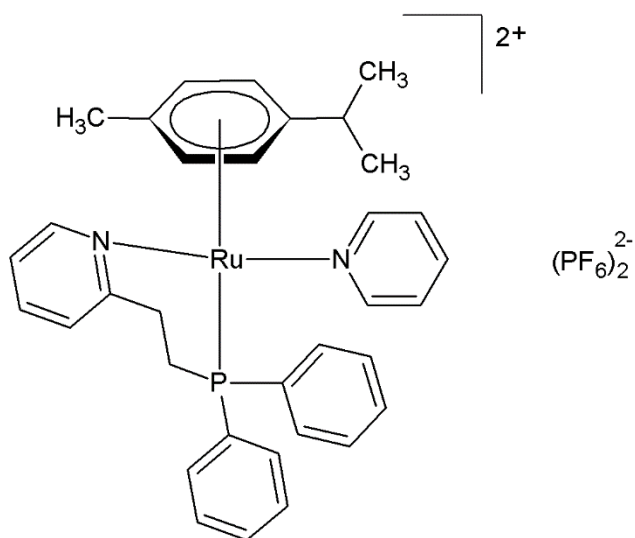


Obrázok 50: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$.

Komplex $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{pyep})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$

35,35 mg (0,05 mmol) **Ru-pyep** komplexu bolo rozpustených v pár ml MeOH a k roztoku bolo pridaných 4,25 mg (0,05 mmol) AgNO_3 . Zmes bola po dobu 1 hodiny miešaná v alobale. Výsledná zmes bola prefiltrovaná a k filtrátu bolo pridaných 98,80 mg (1,25 mmol) pyridínu. Roztok bol miešaný 48 hodín pri laboratórnej teplote a následne bol odsatý, premytý Et_2O a vysušený. Výťažnosť komplexu **Ru-pyep** bola 65%.

ESI+ MS (methanol, m/z): 526,2 (vyp. 526,1; 10%; $\{[\text{Ru}(\text{pcym})(\text{pyep})]-\text{H}\}^+$), 426,1 (vyp. 426,1; 45%; $\{[\text{Ru}(\text{pyep})\text{Cl}]^+ + [\text{Ru}(\text{pyep})(\text{OCH}_3)]^+\}$ (ca 1:1), 390,1 (vyp. 390,0; 50%; $\{[\text{Ru}(\text{pyep})]-3\text{H}\}^+$).

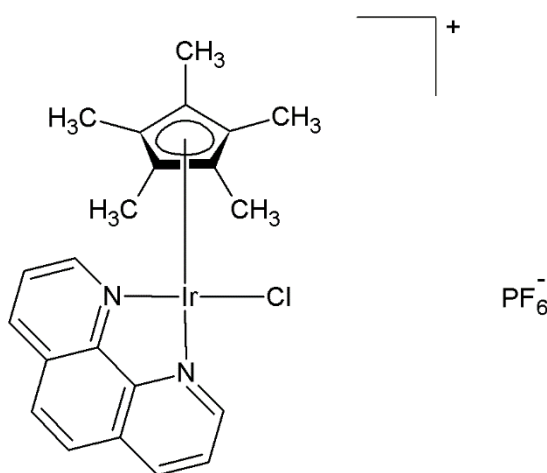


Obrázok 51: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{pyep})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$.

Komplex $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$

39,84 mg (0,05 mmol) diméru **Ir**d bolo rozpustených v 5 ml MeOH a následne bolo k zmesi pridaných 27,03 mg (0,15 mmol) 1,10-fenantrolínu a 40,75 mg (0,25 mmol) NH_4PF_6 . Reakčná zmes bola v hrubostennej vialke vložená do mikrovlnného prístroja. Podmienky boli nastavené na 110 °C na 5 minút. Výsledný komplex odsatý, premytý Et_2O a vysušený na frite. Výťažnosť komplexu **Ir-phenCl** bola 83%.

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, ppm): δ 9,40 (d, 2H, phen), 8,98 (d, 2H, phen), 8,37 (s, 2H, phen), 8,22 (m, 2H, phen), 1,73 (s, 15H, Cp^*). ESI+ MS (metanol, m/z): 543,2 (vyp. 543,1; 100%; $[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{phen})\text{Cl}]^+$), 507,4 (vyp. 507,1; 60%; $\{[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{phen})]-\text{H}\}^+$).

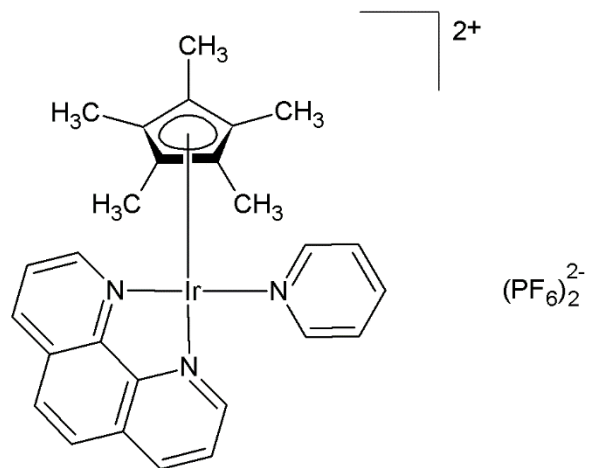


Obrázok 52: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$.

Komplex $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{phen})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$

K 30,00 mg (0,05 mmol) komplexu **Ir-phenCl** rozpusteného v pár ml MeOH bolo pridaných 12,84 mg (0,05 mmol) AgOTf . Reakčná zmes bol miešaná po dobu 2 hodín pod alobalom. Zmes bola prefiltrovaná a k filtrátu bolo pridaných 98,80 mg (1,25 mmol) pyridínu za stáleho miešania. Po 48 hodinách miešania bolo ku roztoku komplexu pridaných 40,75 mg (0,25 mmol) NH_4PF_6 rozpustených v malom množstve MeOH. Zmes bola miešaná po dobu 15 minút a výsledný komplex bol odsatý, premytý Et_2O a vysušený na frite. Výťažnosť komplexu **Ir-phenpy** bola 63%.

ESI+ MS (metanol, m/z): 543,3 (vyp. 543,1; 100%; $[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{phen})\text{Cl}]^+$), 507,3 (vyp. 507,1; 40%; $\{[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{phen})]-\text{H}\}^+$).



Obrázok 53: Štruktúrny vzorec komplexu $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{phen})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$.

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Trendom vo vývoji bioanorganických zlúčenín sa stala príprava multi-cieľových komplexov, ktorých dôležitou vlastnosťou je možnosť ich derivatizácie bioaktívnymi substituentmi. Práve tento inovatívny prístup bol inšpiráciou a motiváciou o snahu pripraviť tento typ zlúčenín. Cieľom práce bola modifikácia biologicky aktívnych polosendvičových komplexov vybraných prechodných kovov (Ru, Rh, Os a Ir) ako naviazanie na školiteľom na pracovisku skúmané multi-cieľové polosendvičové komplexy. Dizajnovanie komplexov skúmaných v tejto práci je založené na známej stabilite väzby kov-pyridín, na základe ktorej je možné indukovať uvoľnenie pyridínu či jeho derivátov ožiaréním o vhodnej vlnovej dĺžke.²⁵⁷ Práve preto boli z možných bioaktívnych ligandov vybrané NAMPT inhibítory (APO866), ktorých štruktúra je často odvodená od pyridínu. Polosendvičové komplexy obsahujúce vo svojej štruktúre vhodný NAMPT inhibítor koordinovaný cez pyridínový kruh sú dizajnované ako proliečivá, ktoré sú stabilné vo fyziologickom prostredí kým nie sú ožiarené elektromagnetickým žiarením vhodnej vlnovej dĺžky. Po ožiarení dochádza k rozštiepeniu väzby kov-inhibítora, čím vznikajú dve bioaktívne časti – komplex a inhibítora, ktoré hypoteticky pôsobia na cieľovú bunku synergickým spôsobom dvoma rôznymi mechanizmami účinku. Kvôli vzájomnému porovnávaniu a detailnejšiemu zoznámeniu sa so syntézou a chémiou fotoaktivovateľných polosendvičových komplexov s NAMPT inhibítormi na báze pyridínu boli pripravované modelové zlúčeniny obsahujúce samotný pyridín.

Vzhľadom k dlhodobo neúspešnej príprave NAMPT inhibítora APO866, boli rozšírené ciele práce o ďalšie dva smery – syntézu vhodných prekurzorov pre budúcu prípravu iných typov multi-cieľových polosendvičových komplexov a syntézu biologicky perspektívnych polosendvičových komplexov Ru, Rh, Os, a Ir s vhodným *N,P*-ligandom. Jedným cieľom tak bolo pripraviť komplexy s vhodným ligandom obsahujúcim terminálnu alifatickú -COOH skupinu na následnú funkcionalizáciu bioaktívnymi organickými liečivami obsahujúcimi hydroxy (tvorba esterov) alebo amino (tvorba amidov) skupinu. Ako predstaviteľ tejto skupiny bola na syntézu vybraná kyselina *trans*-3-(3-pyridyl)akrylová. Druhým cieľom bolo, v súlade so súčasným výskumným zameraním školiteľa na polosendvičové komplexy Ru, Rh, Os a Ir s *N,P*-ligandmi (napr. 3-(difenylfosfino)-1-propylamín), ktoré v mnohých prípadoch vykázali výraznú cytotoxicitu (nepublikované výsledky), začleniť do práce prípravu komplexov s 2-(2-(difenylfosfino)etyl)pyridínom. V prípade, že by boli chloro komplexy predloženej práce dostatočne cytotoxické, by bolo možné aj na tieto komplexy nahliadať ako

na prekursorov pre následnú funkcionalizáciu bioaktívnymi ligandmi v rámci prípravy multi-cieľových zlúčenín.

4.1. Syntéza

Postupmi popísanými v experimentálnej časti bol pripravovaný inhibítor APO866 podľa uvedených zdrojov.^{253,254} Napriek príprave podľa inštrukcií však syntéza tejto bioaktívnej zlúčeniny nebola dokončená. Jednotlivé kroky syntéz, ktoré boli uvádzané v literatúre museli byť optimalizované – zmena teploty, dĺžky syntézy, množstvá reaktantov aj rozpúšťadla. V prvom kroku reakcie, kedy bola východzia 4-piperidín butánová kyselina redukovaná na alkohol (4-piperidín butanol; **2**) pomocou LiAlH₄, bola nutná zmena reakčných podmienok, nakoľko v prípade, že bola reakčná zmes po pridaní LiAlH₄ miešaná po dobu 24 hodín pri izbovej teplote, bola čistota a výťažnosť (23%, v literatúre uvádzaných 40%) konečného produktu **2** tejto reakcie nedostatočná. Dostatočná čistota a lepšia výťažnosť (38%) produktu **2** bola dosiahnutá v prípade, že po pridaní LiAlH₄ bola zmes hodinu miešaná pri 0 °C a následne 22 hodín refluxovaná (optimalizácia 1. postupu). V prípade 2. postupu uvádzaného pri syntéze **2** bola rovnako nutná optimalizácia postupu, nakoľko podľa TLC kontroly nebolo zreagované dostatočné množstvo zmesi po 8 hodinách refluxu po pridaní LiAlH₄ do zmesi, ktoré boli uvádzané v literatúre. Reakciu bolo nutné refluxovať po dobu 4 hodín a následne 24 hodín miešať pri izbovej teplote.

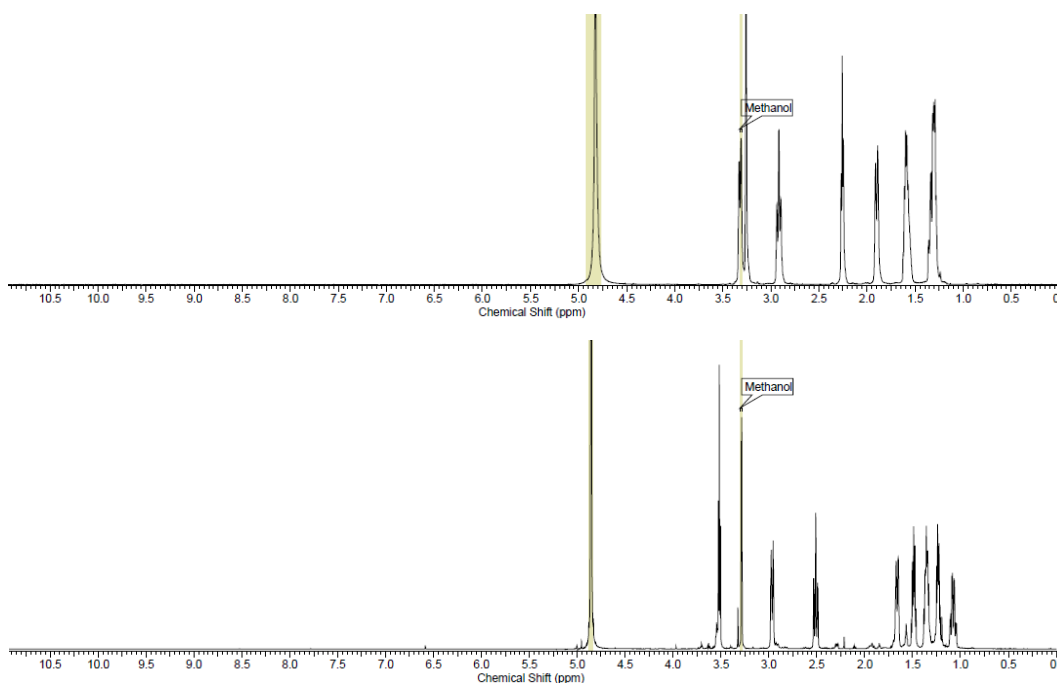
Ďalším krokom syntézy bola reakcia **2** s benzoylchloridom, ktorej produktom bol *N*-benzoyl-4-piperidínbutanol. Aj napriek mnohým opakovaným pokusom však nebola možná následná syntéza kvôli nedostatočnému množstvu produktu **3** (57%, v literatúre uvádzaných 90%) a jeho čistote, v prípade ktorého nebolo dokončené optimalizovanie podmienok jeho syntézy z dôvodu kratšieho času stráveného v laboratóriu tak, aby produkt vykazoval dostatočnú výťažnosť a čistotu na ďalšie kroky syntézy APO866 inhibítora.

Bolo pripravených 18 komplexných zlúčenín, pričom 5 dimérnych komplexov slúžilo ako prekursorov pre ďalšiu syntézu. Pri syntéze polosendvičových komplexov boli zvolené ako *N,N*-ligandy batofenantrolín, resp. fenantrolín a ako *N,P*-ligand 2-(2-difenylyfosfino)etylpyridín. Prvým krokom prípravy boli vždy chloro komplexy, ktoré boli následne použité na ďalšiu syntézu. Chloro komplexy vyizolované vo forme hexafluorofosfátovej soli ([Ru(η⁶-p_{cym})(bphen)Cl]PF₆, [Ir(η⁵-Cp*)(bphen)Cl]PF₆,

[Ru(η^6 -pcym)(pyep)Cl]PF₆ a [Ir(η^5 -Cp*)(phen)Cl]PF₆ a boli použité na následné reakcie, v ktorých boli ich chlorido ligandy nahrádzané pyridínom (pre komplexy [Ru(η^6 -pcym)(bphen)(py)](PF₆)₂, [Ir(η^5 -Cp*)(bphen)(py)](PF₆)₂, [Ru(η^6 -pcym)(pyep)(py)](PF₆)₂ a [Ir(η^5 -Cp*)(phen)(py)](PF₆)₂ resp. *trans*-3-(3-pyridyl)akrylovou kyselinou v prípade [Ru(η^6 -pcym)(bphen)(pyaa)](PF₆)₂ a [Ir(η^5 -Cp*)(bphen)(pyaa)](PF₆)₂. Pripravené komplexy boli charakterizované pomocou vhodných analytických techník, ktorých výsledky sú uvedené pri príslušných komplexoch v *Experimentálnej časti*.

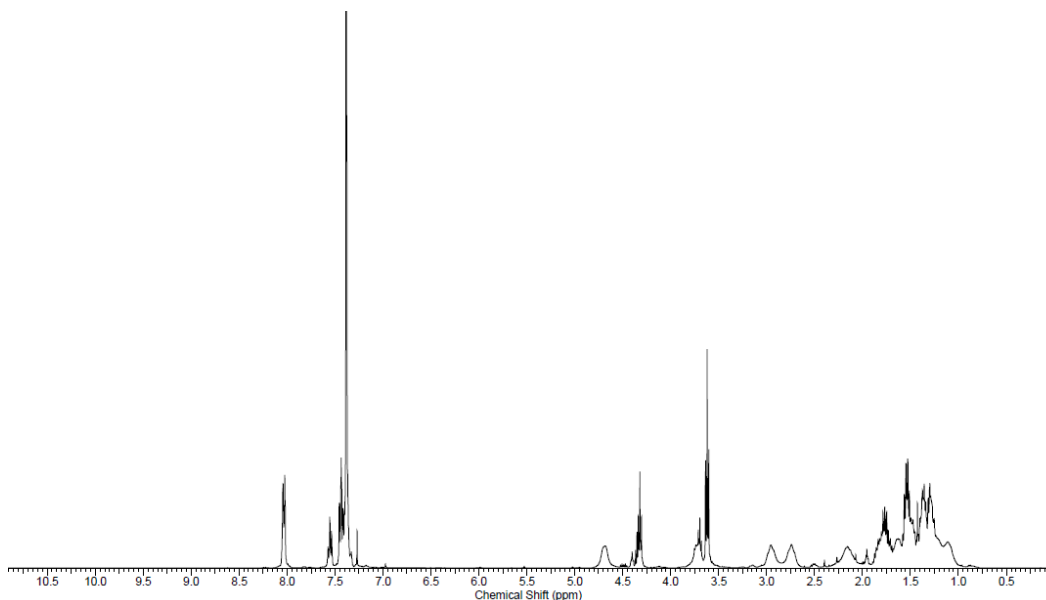
4.2. NMR spektrometria

Na primárnu charakterizáciu pripravených zlúčenín (organických aj komplexných) bola použitá ¹H NMR spektrometria. Vznik 4-piperidínbutanolu (**2**) sa v dôsledku redukcie východzej kyseliny 4-piperidínbutánovej prejavil v ¹H NMR spektre, kde v dôsledku redukcie vzrástol počet signálov v porovnaní s východzou látkou (*obr. 54*). V spektre neboli pozorované signály -OH a -NH skupín v dôsledku použitia daného rozpúšťadla.



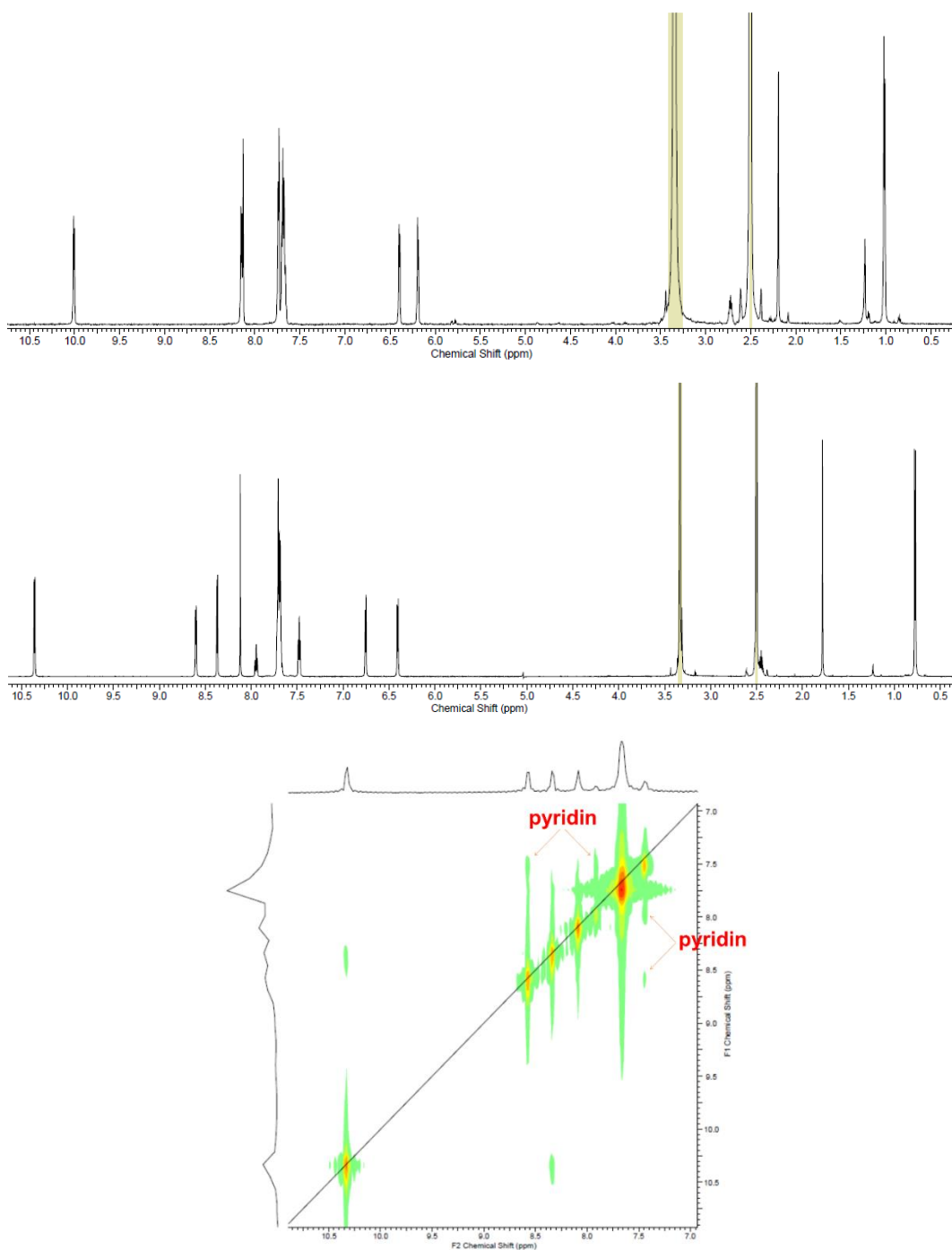
Obrázok 54: ¹H NMR spektrá východzej kyseliny 4-piperidínbutánovej (dole) a vzniknutého produktu 4-piperidínbutanolu (hore); merané v MeOD-*d*₄.

Následný krok prípravy *N*-benzoyl-4-piperidínbutanolu (**3**) bol limitovaný úspešnou prípravou zlúčeniny **2**. Až posledná prevedená syntéza viedla k príprave surového produktu v dostatečnom množstve na následné syntetické kroky (*obr. 55*).



Obrázok 55: ^1H NMR spektrum *N*-benzoyl-4-piperidínbutanolu (**3**); merané v CDCl_3 .

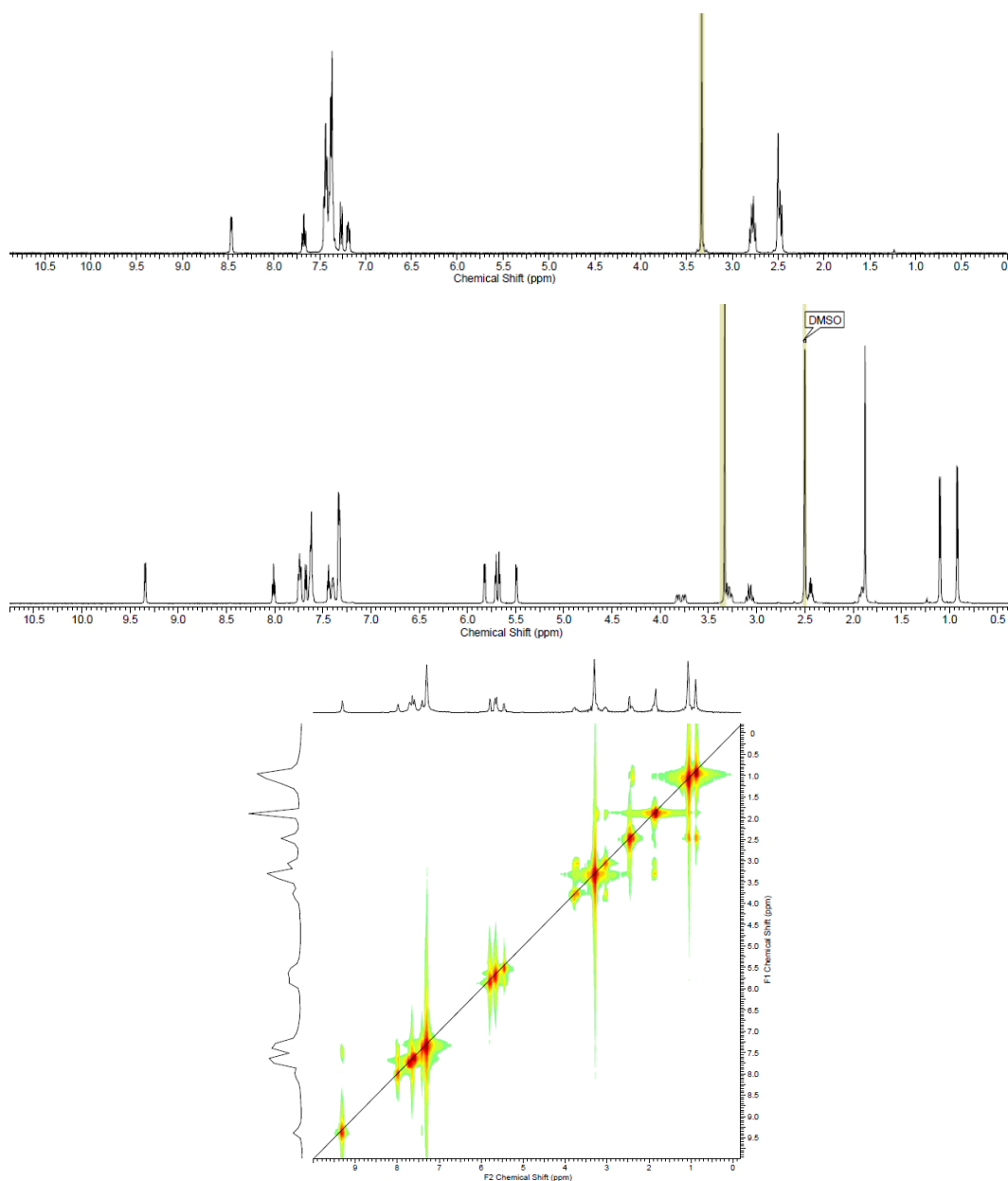
Pri porovnaní spektier východzieho $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ komplexu s $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$ (*obr. 56*) je možné pozorovať, že v prípade chloro komplexu sú detekované charakteristické signály arénového ligandu (pcym) v aromatickej aj v alifatickej časti spektra, a signály bphen ligandu (napr. $\delta = 10,01$ ppm). V prípade výsledného komplexu s naviazaným pyridínom však vyššie zmienené ^1H NMR signály boli detekované pri odlišných chemických posunoch (napr. $\delta = 10,36$ ppm pre vyššie uvedený bphen signál) a okrem toho boli detekované tri nové signály koordinovaného pyridínu ($\delta = 8,61, 7,95$ a $7,48$ ppm). Signály bphen a py boli priradené pomocou ^1H - ^1H COSY experimentu (*obr. 56* dole).



Obrázok 56: Porovnanie ^1H NMR spektier komplexov $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (hore) a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$ (uprostred), a ^1H - ^1H COSY spektrum komplexu $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{py})](\text{PF}_6)_2$ (dole) s označením krosipíkov koordinovaného pyridínu.

Porovnaním spektier voľného 2-(2-(defenylfosfino)etyl)pyridínu (pyep) a komplexu $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$ možno preukázať prítomnosť tohto ligandu v komplexe, aj napriek

tomu, že sa spektrum voľného ligandu a komplexu výrazne líšia (*obr. 57*). Pre komplex $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$ je možné signály pyridínu pyep ligandu pozorovať pri $\delta = 9,35, 8,01, 7,68$ a $7,44$ ppm. V alifatickej oblasti sú pôvodné dva $-\text{CH}_2$ signály voľného pyep ligandu ($\delta = 2,50$ a $2,75$ ppm) v spektre komplexu rozštiepené na štyri signály (tzv. AB systémy²⁵⁹). Podobne ako je diskutované vyššie pri komplexe s pyridínom, aj pre komplexy s pyep ligandom platí, že v dôsledku koordinácie na daný centrálny atóm dochádza ku zmene chemickým posunov (napr. z $8,47$ na $9,35$ ppm).

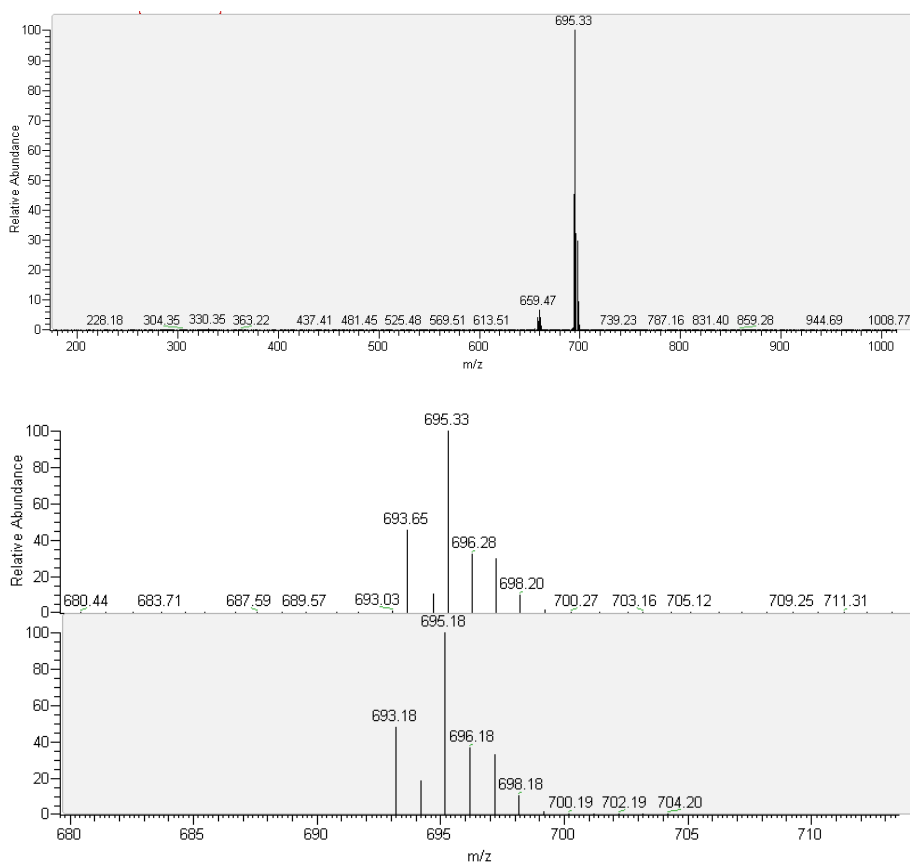


Obrázok 57: Porovnanie ^1H NMR spektier voľného ligandu (pyep; hore) a komplexu $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (uprostred) a $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spektrum komplexu (dole).

4.3. Hmotnostná spektrometria

Ďalšou technikou použitou na charakterizáciu pripravených komplexov bola hmotnostná spektrometria s ionizáciou elektrosprejom (s ohľadom na zloženie boli analyzované len spektrá získané v pozitívnom ionizačnom móde).

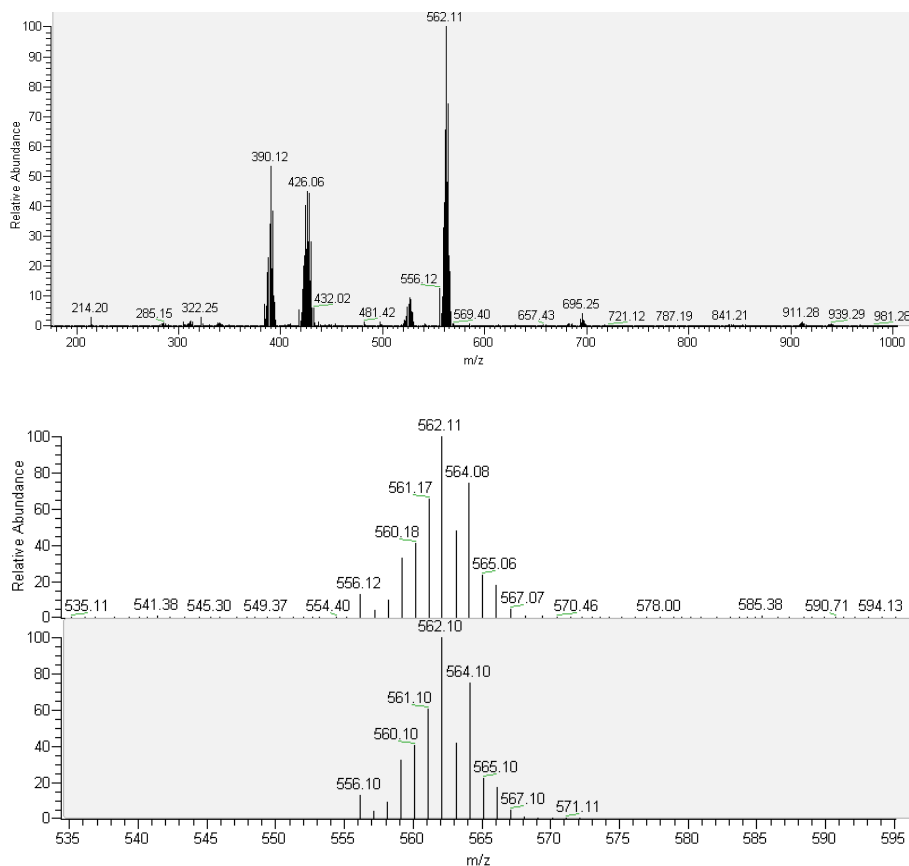
V ESI+ hmotnostnom spektre komplexu $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bphen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ neboli detekované molekulové píky, ale len píky odpovedajúce častici $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bphen})\text{Cl}]^+$ a jeho dechlorovanému fragmentu (*obr. 58*).



Obrázok 58: ESI+ hmotnostné spektrum komplexu $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bphen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (hore) a detail experimentálneho (biele) a teoretického (šedé) izotopového rozloženia signálu častice $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bphen})\text{Cl}]^+$ (dole); ESI+ ionizácia elektrosprejom v pozitívnom móde.

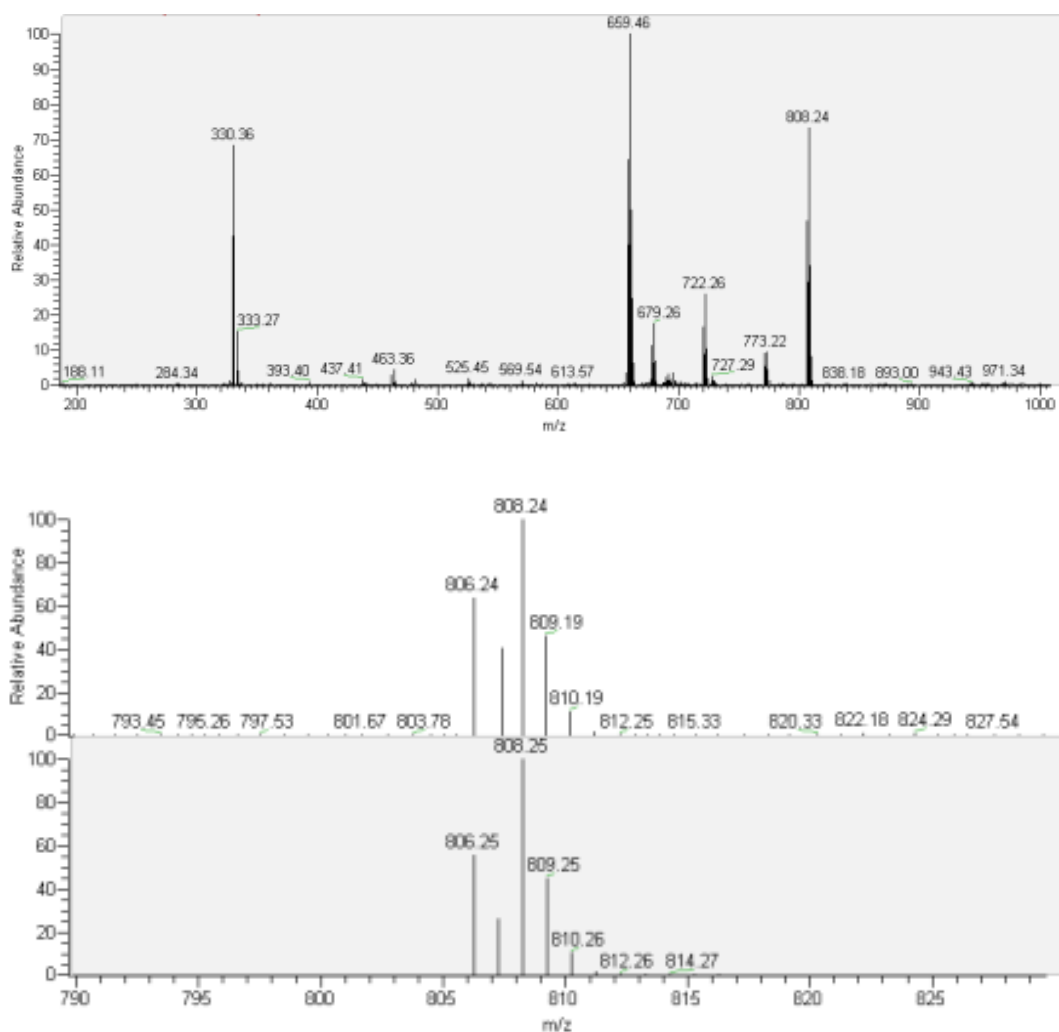
V ESI+ hmotnostnom spektre komplexu $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pym})(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$ neboli detekované molekulové píky, ale len píky odpovedajúce častici $[\text{Ru}(\text{pym})(\text{pyep})\text{Cl}]^+$ a jeho dechlorovanému fragmentu. Okrem typických signálov boli tiež detekované signály, ktoré

podľa hodnoty m/z a izotopového rozloženia možno priradiť časticiam $[\text{Ru}(\text{pyep})\text{Cl}]^+$, $[\text{Ru}(\text{pyep})(\text{OCH}_3)]^+$ (vzájomne se prekrývajú) a $\{[\text{Ru}(\text{pyep})]-3\text{H}\}^+$ (obr. 59). Obdobné výsledky boli získané pre analogický Os komplex.



Obrázok 59: ESI+ hmotnostné spektrum komplexu $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (hore) a detail experimentálneho (biele) a teoretického (šedé) izotopového rozloženia signálu častice $[\text{Ru}(\text{pcym})(\text{pyep})\text{Cl}]^+$ (dole); ESI+ ionizácia elektrosprejom v pozitívnom móde.

V hmotnostných spektrách komplexov a koordinovaným pyridínom neboli detekované žiadne signály, ktoré by potvrdili ich vznik prevedenými syntézami, čo je zrejme dané ich +2 nábojom. V ich spektrách boli len signály východných chloro komplexov (viď vyššie). Naopak, komplexy s *trans*-3-(3-pyridyl)akrylovou kyselinou, ktorá obsahuje karboxylovú skupinu, vytvárajú v iónovom zdroji vďaka deprotonizácii karboxylovej skupiny častice s nábojom +1, ktoré boli jednoznačne detekované v ESI+ hmotnostných spektrách študovaných Ru a Ir komplexov (obr. 60).

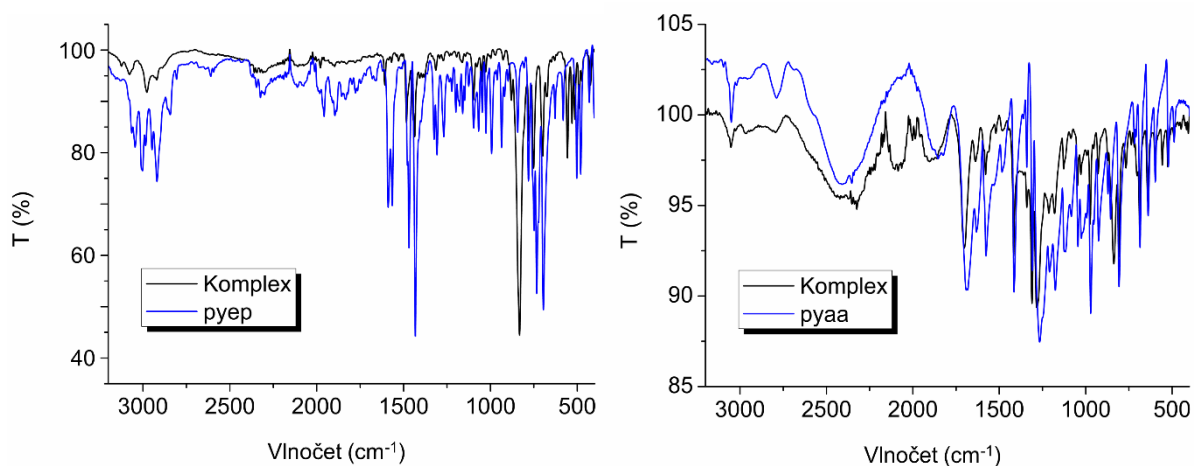


Obrázok 60: ESI+ hmotnostné spektrum komplexu $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bphen})(\text{pyaa})](\text{PF}_6)_2$ (hore) a detail experimentálneho (biele) a teoretického (šedé) izotopového rozloženia signálu častice $\{[\text{Ir}(\text{Cp}^*)(\text{bphen})(\text{pyaa})]\text{-H}\}^+$ (dole); ESI+ ionizácia elektrosprejom v pozitívnom móde.

4.4. Infračervená spektrometria

Zlúčeniny boli charakterizované aj pomocou infračervenej (IR) spektrometrie (hodnoty vlnočtov vibračných píkov sú uvedené v *Experimentálnej časti*). V IR spektrách komplexov boli detekované píky charakteristických vibrácií použitých arénových ligandov Cp^* a pcym . Boli v nich tiež prítomné signály, ktoré možno priradiť vibráciám použitého PF_6^- aniónu (napr. intenzívny signál pri približne 830 cm^{-1}). Bola preukázaná prítomnosť použitého N,P -donorového ligandu (pyep) v štruktúre Ru , Rh , Os a Ir komplexov, nakoľko

charakteristické píky voľného ligandu boli detekované tiež v spektrách komplexov (*obr. 61*). Podobne bol detekovaný aj ligand pyaa v IR spektrách komplexov $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{pyaa})](\text{PF}_6)_2$ a $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bphen})(\text{pyaa})](\text{PF}_6)_2$ (*obr. 61*).



Obrázok 61: Infračervené spektrá komplexu $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{pyep})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (vľavo) a komplexu $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{pyaa})](\text{PF}_6)_2$ (vpravo), nakreslené spolu so spektrami použitých voľných ligandov pyep a pyaa.

Percentuálne zastúpenie prvkov C, H, N elementárnou analýzou nebolo namerané, nakoľko sú všetky komplexy izolované ako PF_6^- soli, ktoré nie sú vhodné na stanovenie percentuálneho obsahu uhlíku, vodíku a dusíku na prístroji Flash 2000 (Thermo Scientific). V prípade použitia väčšieho aniónu bez fluóru (napr. BPh_4^-) by bola ovplyvnená ako rozpustnosť, tak aj výsledná biologická aktivita komplexov.²⁵⁸

5. ZÁVER

Teoretická časť tejto práce bola zameraná na rešerš o biologicky aktívnych komplexoch platiny a ďalších platinových kovov. Najrozsiahljšiu časť literárnej rešerše tvoria NAMPT inhibítory, ich biologická účinnosť, štruktúrne typy a biologicky perspektívne multi-cieľové komplexy s týmito inhibítormi.

Praktická časť sa zaoberá syntézou organického ligandu APO866, ktorá nebola z časových dôvodov a optimalizovania podmienok syntézy dokončená. Ďalej je v nej popísaná syntéza dimérnych komplexov všeobecného zloženia $[M(\mu\text{-Cl})_2(\eta\text{-ar})_2\text{Cl}_2]$ ($M/\text{ar} = \text{Ru-pcym}, \text{Os-pcym}, \text{Rh/Cp}^* \text{ alebo } \text{Ir/Cp}^*$), ktoré boli použité na následnú prípravu polosendvičových chloro komplexov, resp. polosendvičových komplexov obsahujúcich vo svojej koordinačnej sfére pyridín (py) alebo kyselinu *trans*-3-(3-(pyridyl)akrylovú (pyaa), nakoľko na báze pyridínu je aj väčšina štruktúr NAMPT inhibítorov. Použitý ligand pyaa je vhodný na ďalšiu funkcionalizáciu v rámci vývoja potenciálnych multi-cieľových komplexov. Ako *N,N*-ligandy boli zvolené batofenantrolín (bphen), resp. 1,10-fenantrolín (phen) a ako predstaviteľ *N,P*-ligandu bol zvolený 2-(2-(difenylfosfíno)etyl)pyridín (pyep). Pripravené zlúčeniny boli charakterizované pomocou NMR a IR spektroskopie, a ESI+ hmotnostnej spektrometrie. Vďaka týmto analytickým technikám bola dokázaná koordinácia ligandov (py, pyep a pyaa) v štruktúre pripravených polosendvičových komplexov a ich dostačujúca čistota pre prípadné ďalšie syntézy potenciálne biologicky aktívnych multi-cieľových polosendvičových komplexov. Štúdium látok tohto typu by malo do budúcnosti pokračovať práve ich funkcionalizáciou a následným testovaním biologickej aktivity (*in vitro* cytotoxická aktivita).

6. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. MJOS, K. D. a kol.: Metalldrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chemical Reviews*. **2014**, *114*, 4540-4563
2. ALDERDEN, R. A. a kol.: The Discovery and Development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education*. **2006**, *83*, 728.
3. HANIF, M. a kol.: Anticancer metalldrugs: where is the next cisplatin? *Future Medicinal Chemistry*. **2018**, *10*, 615-617.
4. ROSENBERG, B. a kol.: Anti-Animal Tumor Method. *U.S. Patent Office*. **1979**, *4*, 177-263.
5. MARLOYE, M. a kol.: A survey of the mechanisms of action of anticancer transition metal complexes. *Future Medicinal Chemistry*. **2016**, *8*, 2263-2286.
6. SHAILI, E.: Platinum Anticancer Drugs and Photochemotherapeutic Agents: Recent Advances and Future Developments. *Science Progress*. **2019**, *97*, 20-40.
7. ROSENBERG, B. a kol.: Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*. **1969**, *222*, 385-386.
8. JOHNSTONE, T. C. a kol.: The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical Reviews*. **2016**, *116*, 3436-3486.
9. FRICKER, S. P.: Metal based drugs: from serendipity to design. *Dalton Transactions*. **2007**, *43*, 4903-4917.
10. JOHNSTONE, T. C. a kol.: Monofunctional and Higher-Valent Platinum Anticancer Agents. *Inorganic Chemistry*. **2013**, *52*, 12234-12249.
11. ROMERO-CANELÓN, I. a kol.: Next-Generation Metal Anticancer Complexes: Multitargeting via Redox Modulation. *Inorganic Chemistry*. **2013**, *52*, 12276-12291.
12. HALL, M. D. a kol.: The Role of Cellular Accumulation in Determining Sensitivity to Platinum-Based Chemotherapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **2008**, *48*, 495-535.
13. BOULIKAS, T. a kol.: Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Therapy*. **2007**, *5*, 537-583.
14. VARDANYAN, R. a kol.: Antineoplastic Agents. *Synthesis of Best-Seller Drugs*. Elsevier, **2016**, *28*, 495-547.
15. SHIMADA, M. a kol.: Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. *Cancer Management and Research*. **2013**, *5*, 67-76.

16. REEDIJK, J.: Platinum Anticancer Coordination Compounds: Study of DNA Binding Inspires New Drug Design. *European Journal of Inorganic Chemistry*. **2009**, *10*, 1303-1312.
17. KELLAND, L.: The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. **2007**, *7*, 573-584.
18. LOVEJOY, K. S. a kol.: Spectrum of Cellular Responses to Pyriplatin, a Monofunctional Cationic Antineoplastic Platinum(II) Compound, in Human Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. **2011**, *10*, 1709-1719.
19. LOVEJOY, K. S. a kol.: *cis*-Diammine(pyridine)chloroplatinum(II), a monofunctional platinum(II) antitumor agent: Uptake, structure, function, and prospects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2008**, *105*, 8902-8907.
20. ZHU, G. a kol.: Monofunctional Platinum-DNA Adducts Are Strong Inhibitors of Transcription and Substrates for Nucleotide Excision Repair in Live Mammalian Cells. *Cancer Research*. **2012**, *72*, 790-800.
21. PARK, G. Y. a kol.: Phenanthriplatin, a monofunctional DNA-binding platinum anticancer drug candidate with unusual potency and cellular activity profile. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2012**, *109*, 11987-11992.
22. KRATZ, F. I. a kol.: Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy. *ChemMedChem*. **2008**, *3*, 20-53.
23. HALL, M. D. a kol.: Determination of the Platinum Oxidation State Distribution in Cancer Cells Treated with Platinum(IV) Anticancer Agents. *Journal of the American Chemical Society*. **2003**, *125*, 7524-7525.
24. GALANSKI, M. a kol.: Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches. *Current Medicinal Chemistry*. **2005**, *12*, 2075-2094.
25. MI, Q. a kol.: Current Status for Oral Platinum (IV) Anticancer Drug Development. *International Journal of Medical Physics, Clinical Engineering and Radiation Oncology*. **2018**, *7*, 231-247.
26. PIZARRO, A. M. a kol.: Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie*. **2009**, *91*, 1198-1211.
27. TAO, L. a kol.: Co-targeting cancer drug escape pathways confers clinical advantage for multi-target anticancer drugs. *Pharmacological Research*. **2015**, *102*, 123-131.
28. CHENG, Q. a kol.: The ligation of aspirin to cisplatin demonstrates significant synergistic effects on tumor cells. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7427-7430.

29. SUNTHARALINGAM, K. a kol.: Conjugation of vitamin E analog α -TOS to Pt(IV) complexes for dual-targeting anticancer therapy. *Chemical Communications*. **2014**, *50*, 2465-2468.
30. MA, L. a kol.: Chalcoplatin, a dual-targeting and p53 activator-containing anticancer platinum(IV) prodrug with unique mode of action. *Chemical Communications*. **2015**, *51*, 6301-6304.
31. NOVOHRADSKY, V. a kol.: Antitumor platinum(IV) derivatives of oxaliplatin with axial valproato ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2014**, *140*, 72-79.
32. ŠTARHA, P. a kol.: Non-platinum complexes containing releasable biologically active ligands. *Coordination Chemistry Reviews*. **2019**, *395*, 130-145.
33. GABANO, E. a kol.: Pros and cons of bifunctional platinum(IV) antitumor prodrugs: two are (not always) better than one. *Dalton Transactions*. **2014**, *43*, 9813-9820.
34. KENNY, R. G. a kol.: Platinum(IV) Prodrugs - A Step Closer to Ehrlich's Vision? *European Journal of Inorganic Chemistry*. **2017**, *12*, 1596-1612.
35. GIBSON, Dan: Multi-action Pt(IV) anticancer agents; do we understand how they work? *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2019**, *191*, 77-84.
36. ANG, W. H. a kol.: Rational Design of Platinum(IV) Compounds to Overcome Glutathione-S-Transferase Mediated Drug Resistance. *Journal of the American Chemical Society*. **2005**, *127*, 1382-1383.
37. VANDER HEIDEN, M. G. a kol.: Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. **2009**, *324*, 1029-1033.
38. MICHELAKIS, E. D. a kol.: Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *British Journal of Cancer*. **2008**, *99*, 989-994.
39. DHAR, S. a kol.: Mitaplatin, a potent fusion of cisplatin and the orphan drug dichloroacetate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2009**, *106*, 22199-22204.
40. ZHENG, W. a kol.: Multi-Targeted Anticancer Agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2017**, *17*, 3084-3098.)
41. PETRUZZELLA, E. a kol.: Triple action Pt(IV) derivatives of cisplatin: a new class of potent anticancer agents that overcome resistance. *Chemical Science*. **2018**, *9*, 4299-4307.
42. AI, Z. a kol.: Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1-regulated cancer metabolism. *Cancer Letters*. **2016**, *373*, 36-44.

43. SHEN, D. a kol.: Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacological Reviews*. **2012**, *64*, 706-721.
44. COVERDALE, J. a kol.: Designing Ruthenium Anticancer Drugs: What Have We Learnt from the Key Drug Candidates? *Inorganics*. **2019**, *7*, 31.
45. SCHLUGA, P. a kol.: Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. *Dalton Transactions*. **2006**, *14*, 1796-1802.
46. WIŚNIEWSKA, J. a kol.: The reduction of ruthenium(III) complexes with triazolopyrimidine ligands by ascorbic acid and mechanistic insight into their action in anticancer therapy. *Inorganica Chimica Acta*. **2019**, *484*, 305-310.
47. FONG, J. a kol.: A novel class of ruthenium-based photosensitizers effectively kills in vitro cancer cells and in vivo tumors. *Photochemical & Photobiological Sciences*. **2015**, *14*, 2014-2023.
48. DASARI, S. a kol.: Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. **2014**, *740*, 364-378.
49. DOUGAN, S. J. a kol.: Catalytic organometallic anticancer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2008**, *105*, 11628-11633.
50. KANDIOLLER, W. a kol.: Organometallic anticancer complexes of lapachol: metal centre-dependent formation of reactive oxygen species and correlation with cytotoxicity. *Chemical Communications*. **2013**, *49*, 3348-3350.
51. ZHANG, P. a kol.: Advances in the design of organometallic anticancer complexes. *Journal of Organometallic Chemistry*. **2017**, *839*, 5-14.
52. ALESSIO, E.: Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *European Journal of Inorganic Chemistry*. **2017**, *12*, 1549-1560.
53. CLARKE, M. J.: Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews*. **2003**, *236*, 209-233.
54. ARTNER, C. a kol.: Characterizing activation mechanisms and binding preferences of ruthenium metallo-prodrugs by a competitive binding assay. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2017**, *177*, 322-327.
55. LEIJEN, S. a kol.: Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Investigational New Drugs*. **2015**, *33*, 201-214.

56. DYSON, P. J. a kol.: Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Transactions*. **2006**, *16*, 1929–1933.
57. TRONDL, R. a kol.: NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chem. Sci*. **2014**, *5*, 2925-2932.
58. MORBIDELLI, L. a kol.: Antiangiogenic properties of selected ruthenium(III) complexes that are nitric oxide scavengers. *British Journal of Cancer*. **2003**, *88*, 1484-1491.
59. FELIERS, D. a kol.: VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells. *Kidney International*. **2005**, *68*, 1648-1659.
60. OSZAJCA, M. a kol.: Interaction of the NAMI-A complex with nitric oxide under physiological conditions. *New J. Chem*. **2014**, *38*, 3386-3394.
61. LAI, H. a kol.: Antiangiogenic ruthenium(II) benzimidazole complexes, structure-based activation of distinct signaling pathways. *Metallomics*. **2015**, *7*, 439-447.
62. ZHANG, W. a kol.: MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. **2002**, *12*, 9-18.
63. CARGNELLO, M. a kol.: Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **2011**, *75*, 50-83.
64. BERGAMO, A. a kol.: Influence of components of tumour microenvironment on the response of HCT-116 colorectal cancer to the ruthenium-based drug NAMI-A. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2017**, *168*, 90-97.
65. PILLOZZI, S. a kol.: NAMI-A is highly cytotoxic toward leukaemia cell lines: evidence of inhibition of K_{Ca}3.1 channels. *Dalton Trans*. **2014**, *43*, 12150-12155.
66. URREGO, D. a kol.: Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **2014**, *369*, 1-9.
67. GRÖSSINGER, E. M. a kol.: Targeting proliferation of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells through K_{Ca}3.1 blockade. *Leukemia*. **2014**, *28*, 954-958.
68. BULK, E. a kol.: Epigenetic dysregulation of K_{Ca}3.1 channels induces poor prognosis in lung cancer. *International Journal of Cancer*. **2015**, *137*, 1306-1317.
69. PELILLO, C. a kol.: Inhibition of adhesion, migration and of $\alpha 5\beta 1$ integrin in the HCT-116 colorectal cancer cells treated with the ruthenium drug NAMI-A. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2016**, *160*, 225-235.

70. PETI, W. a kol.: Synthesis of Tumor-Inhibiting Complex Salts Containing the Anion *trans*-Tetrachlorobis(indazole)ruthenate(III) and Crystal Structure of the Tetraphenylphosphonium Salt. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1551-1555.
71. DICKSON, N. R. a kol.: A phase I dose-escalation study of NKP-1339 in patients with advanced solid tumors refractory to treatment. *Journal of Clinical Oncology.* **2011**, *29*, 2607-2607.
72. LIU, J. a kol.: Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* **2015**, 1-12.
73. DIEHN, M. a kol.: Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature.* **2009**, *458*, 780-783.
74. GORRINI, C. a kol.: Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery.* **2013**, *12*, 931-947.
75. COVERDALE, J. a kol.: Asymmetric transfer hydrogenation by synthetic catalysts in cancer cells. *Nature Chemistry.* **2018**, *10*, 347-354.
76. SOLDEVILA-BARREDA, J. J. a kol.: Transfer hydrogenation catalysis in cells as a new approach to anticancer drug design. *Nature Communications.* **2015**, *6*, 1-9.
77. FLOCKE, L. S. a kol.: Molecular mode of action of NKP-1339 – a clinically investigated ruthenium-based drug – involves ER- and ROS-related effects in colon carcinoma cell lines. *Investigational New Drugs.* **2016**, *34*, 261-268.
78. HEFFETER, P. a kol.: The ruthenium compound KP1339 potentiates the anticancer activity of sorafenib in vitro and in vivo. *European Journal of Cancer.* **2013**, *49*, 3366-3375.
79. HEINEMANN, F. a kol.: Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy. *Accounts of Chemical Research.* **2017**, *50*, 2727-2736.
80. MCFARLAND, S. A. a kol.: Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology? *Current Opinion in Chemical Biology.* **2020**, *56*, 23-27.
81. MARI, C. a kol.: Combination of Ru(II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy. *Chemical Science.* **2015**, *6*, 2660-2686.
82. KASPLER, P. a kol.: A ruthenium(II) based photosensitizer and transferrin complexes enhance photo-physical properties, cell uptake, and photodynamic therapy safety and efficacy. *Photochemical & Photobiological Sciences.* **2016**, *15*, 481-495.

83. GHOSH, G. a kol.: Cyclometalated Ruthenium(II) Complexes Derived from α -Oligothiophenes as Highly Selective Cytotoxic or Photocytotoxic Agents. *Inorganic Chemistry*. **2018**, *57*, 7694-7712.
84. JI, J. a kol.: Syntheses and properties of cyclometalated ruthenium(II) complexes with 1,10-phenanthroline and phenylphthalazine ligands. *Zeitschrift für Naturforschung B*. **2019**, *74*, 267-271.
85. GLAZER, E. C.: Light-Activated Metal Complexes that Covalently Modify DNA. *Israel Journal of Chemistry*. **2013**, *53*, 391-400.
86. ERTL, C. D. a kol.: Sticking and Patching: Tuning and Anchoring Cyclometallated Ruthenium(II) Complexes. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 1557–1570.
87. PEACOCK, A. F. A. a kol.: Medicinal Organometallic Chemistry: Designing Metal Arene Complexes as Anticancer Agents. *Chemistry - An Asian Journal*. **2008**, *3*, 1890-1899.
88. ENGLINGER, B. a kol.: Metal Drugs and the Anticancer Immune Response. *Chemical Reviews*. **2018**, *119*, 1519-1624.
89. CHATTERJEE, S. a kol.: The ruthenium(II)–arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53–JNK pathways. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. **2008**, *13*, 1149-1155.
90. MURRAY, B. S. a kol.: The development of RAPTA compounds for the treatment of tumors. *Coordination Chemistry Reviews*. **2016**, *306*, 86-114.
91. ADHIREKSAN, Z. a kol.: Allosteric cross-talk in chromatin can mediate drug-drug synergy. *Nature Communications*. **2017**, *8*, 1-11.
92. SCALAMBRA, F. a kol.: New Findings in Metal Complexes with Antiproliferative Activity Containing 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane (PTA) and Derivative Ligands. *European Journal of Inorganic Chemistry*. **2019**, *11*, 1529-1538.
93. RAUSCH, M. a kol.: Recent Considerations in the Application of RAPTA-C for Cancer Treatment and Perspectives for Its Combination with Immunotherapies. *Advanced Therapeutic*. **2019**, *2*, 1-12.
94. STAMOS, J. a kol.: Structure of the Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Domain Alone and in Complex with a 4-Anilinoquinazoline Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. **2002**, *277*, 46265-46272.
95. JI, L. a kol.: Novel ruthenium complexes ligated with 4-anilinoquinazoline derivatives: Synthesis, characterisation and preliminary evaluation of biological activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2014**, *77*, 110-120.

96. ZHANG, Y. a kol.: Dual-targeting organometallic ruthenium(II) anticancer complexes bearing EGFR-inhibiting 4-anilinoquinazoline ligands. *Dalton Transactions*. **2015**, *44*, 13100-13111.
97. DU, J. a kol.: Discovery of a dual-targeting organometallic ruthenium complex with high activity inducing early stage apoptosis of cancer cells. *Metallomics*. **2015**, *7*, 1573-1583.
98. CARUSO, F. a kol.: Ruthenium-arene complexes of curcumin: x-ray and density functional theory structure, synthesis, and spectroscopic characterization, *in vitro* antitumor activity, and dna docking studies of (*p*-cymene)ru(curcuminato)chloro. *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 1072-1081.
99. CASTONGUAY, A. a kol.: New Ruthenium(II)–Letrozole Complexes as Anticancer Therapeutics. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2012**, *55*, 8799-8806.
100. ŠTARHA, P. a kol.: Half-Sandwich Ru(II) and Os(II) Bathophenanthroline Complexes Containing a Releasable Dichloroacetato Ligand. *Molecules*. **2018**, *23*, 1-16.
101. WU, Z. a kol.: Rhodium-catalyzed oxidative amidation of allylic alcohols and aldehydes: effective conversion of amines and anilines into amides. *Chemical Science*. **2016**, *7*, 969-975.
102. KIM, S. a kol.: Cp*Rh(III)-catalyzed C(sp³)–H alkylation of 8-methylquinolines in aqueous media. *Chemical Communications*. **2017**, *53*, 3006-3009.
103. BERRY, J. F. a kol.: Metal–Metal Bonds: From Fundamentals to Applications. *Inorganic Chemistry*. **2017**, *56*, 7577-7581.
104. CHIFOTIDES, H. T. a kol.: Interactions of Metal–Metal-Bonded Antitumor Active Complexes with DNA Fragments and DNA. *Accounts of Chemical Research*. **2005**, *38*, 146-156.
105. AGUIRRE, J. D. a kol.: Effect of Axial Coordination on the Electronic Structure and Biological Activity of Dirhodium (II,II) Complexes. *Inorganic Chemistry*. **2007**, *46*, 7494-7502.
106. LUTTERMAN, D. A. a kol.: Cis-[Rh₂(μ-O₂CCH₃)₂(CH₃CN)₆]²⁺ as a Photoactivated Cisplatin Analog. *Journal of the American Chemical Society*. **2006**, *128*, 738-739.
107. LI, Z. y kol.: Optimizing the Electronic Properties of Photoactive Anticancer Oxypyridine-Bridged Dirhodium (II,II) Complexes. *Journal of the American Chemical Society*. **2014**, *136*, 17058-17070.

108. MOLLIN, S. a kol.: Octahedral rhodium(III) complexes as kinase inhibitors: Control of the relative stereochemistry with acyclic tridentate ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2015**, *148*, 11-21.
109. ZHONG, H.-J. a kol.: A Rhodium(III) Complex as an Inhibitor of Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8-Activating Enzyme with in Vivo Activity against Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2017**, *60*, 497-503.
110. MONNEY, A. a kol.: Transition metal bioconjugates with an organometallic link between the metal and the biomolecular scaffold. *Coordination Chemistry Reviews*. **2013**, *257*, 2420-2433.
111. SCHWIZER, F. a kol.: Artificial Metalloenzymes: Reaction Scope and Optimization Strategies. *Chemical Reviews*. **2017**, *118*, 142-231.
112. ALBADA, H. B. a kol.: The Chemoselective Reactions of Tyrosine-Containing G-Protein-Coupled Receptor Peptides with $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{H}_2\text{O})_3](\text{OTf})_2$, Including 2D NMR Structures and the Biological Consequences. *Journal of the American Chemical Society*. **2012**, *134*, 10321-10324.
113. OHATA, J. a kol.: A Three-Component Organometallic Tyrosine Bioconjugation. *Angewandte Chemie International Edition*. **2018**, *57*, 2827-2830.
114. OHATA, J. a kol.: Rhodium at the chemistry–biology interface. *Dalton Transactions*. **2018**, *47*, 14855-14860.
115. ZHANG, J.-J. a kol.: A multi-target caffeine derived rhodium(I) N-heterocyclic carbene complex: evaluation of the mechanism of action. *Dalton Transactions*. **2016**, *45*, 13161-13168.
116. MARKHAM, J. a kol.: (Pentamethylcyclopentadienato)rhodium Complexes for Delivery of the Curcumin Anticancer Drug. *European Journal of Inorganic Chemistry*. **2017**, *12*, 1812-1823.
117. PEACOCK, A. F. A. a kol.: Tuning the Reactivity of Osmium(II) and Ruthenium(II) Arene Complexes under Physiological Conditions. *Journal of the American Chemical Society*. **2006**, *128*, 1739-1748.
118. DWYER, F. P. a kol.: Biological Activity of Complex Ions. *Nature*. **1952**, *170*, 190-191.
119. LIU, L.-J. a kol.: Antagonizing STAT5B dimerization with an osmium complex. *Scientific Reports*. **2016**, *6*, 1-9.

120. JORDAN, V. C.: Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2003**, 2, 205-213.
121. JAOUEN, G. A kol.: The Ferrocifen Family as Potent and Selective Antitumor Compounds: Mechanisms of Action. *Advances in Organometallic Chemistry and Catalysis*. **2013**, 563-580.
122. BRAGA, S. S. a kol.: A New Age for Iron: Antitumoral Ferrocenes. *Organometallics*. **2013**, 32, 5626-5639.
123. LEE, H. Z. S. a kol.: Synthesis, Characterization, and Biological Properties of Osmium-Based Tamoxifen Derivatives - Comparison with Their Homologues in the Iron and Ruthenium Series. *European Journal of Inorganic Chemistry*. **2015**, 25, 4217-4226.
124. SCALCON, V. a kol.: Osmocenyl-tamoxifen derivatives target the thioredoxin system leading to a redox imbalance in Jurkat cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2016**, 160, 296-304.
125. BRUYÈRE, C. a kol.: Ferrocifen derivatives that induce senescence in cancer cells: selected examples. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2014**, 141, 144-151.
126. BRUIJNINCX, P. C. A. a kol.: Controlling platinum, ruthenium, and osmium reactivity for anticancer drug design. *Elsevier*, **2009**, 61, 1-62.
127. MEIER-MENCHES, S. M. a kol.: Structure–activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents – towards clinical development. *Chemical Society Reviews*. **2018**, 47, 909-928.
128. SHNYDER, S. D. a kol.: Anti-colorectal cancer activity of an organometallic osmium arene azopyridine complex. *MedChemComm*. **2011**, 2, 666-668.
129. FU, Y. a kol.: Organometallic Osmium Arene Complexes with Potent Cancer Cell Cytotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, 53, 8192-8196.
130. HARTINGER, C. G. a kol.: From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2006**, 100, 891-904.
131. GALANSKI, M. a kol.: Recent Developments in the Field of Tumor-Inhibiting Metal Complexes. *Current Pharmaceutical Design*. **2003**, 9, 2078-2089.
132. BÜCHEL, G. E. a kol.: En Route to Osmium Analogues of KP1019: Synthesis, Structure, Spectroscopic Properties and Antiproliferative Activity of trans-[Os^{IV}Cl₄(Hazole)₂]. *Inorganic Chemistry*. **2011**, 50, 7690–7697.

133. KUHN, P.-S. a kol.: Osmium(III) Analogues of KP1019: Electrochemical and Chemical Synthesis, Spectroscopic Characterization, X-ray Crystallography, Hydrolytic Stability, and Antiproliferative Activity. *Inorganic Chemistry*. **2014**, *53*, 11130-11139.
134. MCCARTHY, M. R. a kol.: Nitric Oxide Abstracts a Nitrogen Atom from an Osmium Nitrido Complex To Give Nitrous Oxide. *Journal of the American Chemical Society*. **2000**, *122*, 12391-12392.
135. NI, W.-X. a kol.: Osmium(VI) nitrido complexes bearingazole heterocycles: a new class of antitumor agents. *Chemical Science*. **2012**, *3*, 1582-1588.
136. TANG, Q. a kol.: Synthesis and antitumor activity of a series of osmium(VI) nitrido complexes bearing quinolinolato ligands. *Chemical Communications*. **2013**, *49*, 9980-9982.
137. PRACHAROVA, J. a kol.: Half-sandwich Os(II) and Ru(II) bathophenanthroline complexes: anticancer drug candidates with unusual potency and a cellular activity profile in highly invasive triple-negative breast cancer cells. *Dalton Transactions*. **2018**, *47*, 12197-12208.
138. LO, K. K.-W. a kol.: Cyclometalated iridium(III) polypyridine dibenzocyclooctyne complexes as the first phosphorescent bioorthogonal probes. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4271-4273.
139. KONKANKIT, C. C. a kol.: Anticancer activity of complexes of the third row transition metals, rhenium, osmium, and iridium. *Dalton Transactions*. **2018**, *47*, 9934-9974.
140. PRIER, C. K. a kol.: Visible Light Photoredox Catalysis with Transition Metal Complexes: Applications in Organic Synthesis. *Chemical Reviews*. **2013**, *113*, 5322-5363.
141. LEUNG, C.-H. a kol.: A Metal-Based Inhibitor of Tumor Necrosis Factor- α . *Angewandte Chemie International Edition*. **2012**, *51*, 9010-9014.
142. PAITANDI, R. P. a kol.: Anticancer Activity of Iridium(III) Complexes Based on a Pyrazole-Appended Quinoline-Based BODIPY. *Inorganic Chemistry*. **2017**, *56*, 12232-12247.
143. CHEN, M.-H. a kol.: Light-Up Mitophagy in Live Cells with Dual-Functional Theranostic Phosphorescent Iridium(III) Complexes. *ACS Applied Materials & Interfaces*. **2017**, *9*, 13304-13314.

144. YOULE, R. J. a kol.: Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2011**, *12*, 9-14.
145. PRACHAROVA, J. a kol.: Exploring the Effect of Polypyridyl Ligands on the Anticancer Activity of Phosphorescent Iridium(III) Complexes: From Proteosynthesis Inhibitors to Photodynamic Therapy Agents. *Chemistry – A European Journal*. **2018**, *24*, 4607-4619.
146. LI, Y. a kol.: Cyclometalated iridium(III) N-heterocyclic carbene complexes as potential mitochondrial anticancer and photodynamic agents. *Dalton Transactions*. **2017**, *46*, 11363-11371.
147. GOTHE, Y. a kol.: Cytotoxic activity and protein binding through an unusual oxidative mechanism by an iridium(I)–NHC complex. *Chemical Communication*. **2015**, *51*, 3151-3153.
148. NOVOHRADSKY, V. a kol.: Mechanism of cellular accumulation of an iridium(III) pentamethylcyclopentadienyl anticancer complex containing a C,N-chelating ligand. *Metallomics*. **2014**, *6*, 682-690.
149. LIU, Z. a kol.: Organometallic Half-Sandwich Iridium Anticancer Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, *54*, 3011-3026.,
150. LI, L. a kol.: An Efficient Low-Temperature Route to Polycyclic Isoquinoline Salt Synthesis via C–H Activation with $[\text{Cp}^*\text{MCl}_2]_2$ (M=Rh, Ir). *Journal of the American Chemical Society*. **2008**, *130*, 12414-12419.
151. ŠTARHA, P. a kol.: Protinádorově účinné komplexy přechodných kovů: historie a současnost. *Chemické listy*. **2018**, *112*, 412-420.
152. ŠTARHA, P. a kol.: Cell-based studies of the first-in-class half-sandwich Ir(III) complex containing histone deacetylase inhibitor 4-phenylbutyrate. *Applied Organometallic Chemistry*. **2018**, *32*, 1-11.
153. BOLDEN, J. E. a kol.: Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2006**, *5*, 769-784.
154. CHIARUGI, A. a kol.: The NAD⁺ metabolome — a key determinant of cancer cell biology. *Nature Reviews Cancer*. **2012**, *12*, 741-752.
155. ROULSTON, A. a kol.: New strategies to maximize therapeutic opportunities for NAMPT inhibitors in oncology. *Molecular & Cellular Oncology*. **2015**, *3*, 1-33.
156. SAMPATH, D. a kol.: Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. **2015**, *151*, 16-31.

157. ISHIDOH, K. a kol.: Quinolate phosphoribosyl transferase, a key enzyme in *de novo* NAD⁺ synthesis, suppresses spontaneous cell death by inhibiting overproduction of active-caspase-3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **2010**, 1803, 527-533.
158. ULLMARK, T. a kol.: Anti-apoptotic quinolate phosphoribosyltransferase (QPRT) is a target gene of Wilms' tumor gene 1 (WT1) protein in leukemic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2017**, 482, 802-807.
159. OLESEN, U. H. a kol.: A Preclinical Study on the Rescue of Normal Tissue by Nicotinic Acid in High-Dose Treatment with APO866, a Specific Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*. **2010**, 9, 1609-1617.
160. CHOWDHRY, S. a kol.: NAD metabolic dependency in cancer is shaped by gene amplification and enhancer remodelling. *Nature*. **2019**, 569, 570-575.
161. GARTEN, A. a kol.: Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD⁺ metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*. **2015**, 11, 535-546.
162. DUARTE-PEREIRA, S. a kol.: Extensive regulation of nicotinate phosphoribosyltransferase (NAPRT) expression in human tissues and tumors. *Oncotarget*. **2016**, 7, 1973-1983.
163. XIAO, Y. a kol.: Dependence of Tumor Cell Lines and Patient-Derived Tumors on the NAD⁺ Salvage Pathway Renders Them Sensitive to NAMPT Inhibition with GNE-618. *Neoplasia*. **2013**, 15, 1151-1160.
164. LI, X.-Q. a kol.: NAMPT and NAPRT, Key Enzymes in NAD⁺ Salvage Synthesis Pathway, Are of Negative Prognostic Value in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*. **2019**, 9, 1-11.
165. DALAMAGA, M. a kol.: The role of extracellular and intracellular Nicotinamide phosphoribosyl-transferase in cancer: Diagnostic and therapeutic perspectives and challenges. *Metabolism*. **2018**, 82, 72-87.
166. BUONVICINO, D. a kol.: Identification of the Nicotinamide Salvage Pathway as a New Toxication Route for Antimetabolites. *Cell Chemical Biology*. **2018**, 25, 471-482.
167. TOLSTIKOV, V. a kol.: Metabolomics Analysis of Metabolic Effects of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibition on Human Cancer Cells. *PLOS ONE*. **2014**, 9, 1-24.

168. MURPHY, J. P. a kol.: The NAD⁺ Salvage Pathway Supports PHGDH-Driven Serine Biosynthesis. *Cell Reports*. **2018**, *24*, 2381-2391.
169. TATEISHI, K. a kol.: The Alkylating Chemotherapeutic Temozolomide Induces Metabolic Stress in IDH1-Mutant Cancers and Potentiates NAD⁺ Depletion–Mediated Cytotoxicity. *Cancer Research*. **2017**, *77*, 4102-4115.
170. YAKU, K. a kol.: Metabolism in Cancer Therapeutics. *Frontiers in Oncology*. **2018**, *8*, 1-9.
171. CHEN, H. a kol.: Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) in carcinogenesis: new clinical opportunities. *Expert Review of Anticancer Therapy*. **2016**, *16*, 827-838.
172. ZHU, Y. a kol.: Subcellular compartmentalization of NAD⁺ and its role in cancer: A sereneNADe of metabolic melodies. *Pharmacology & Therapeutics*. **2019**, *200*, 27-41.
173. IMAI, S.-I. a kol.: NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends in Cell Biology*. **2014**, *24*, 464-471.
174. CHALKIADAKI, A. a kol.: The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nature Reviews Cancer*. **2015**, *15*, 608-624.
175. BRANDL, L. a kol.: The c-MYC/NAMPT/SIRT1 feedback loop is activated in early classical and serrated route colorectal cancer and represents a therapeutic target. *Medical Oncology*. **2019**, *36*, 1-14.
176. PAN, J.-H. a kol.: Nicotinamide phosphoribosyl transferase regulates cell growth via the SIRT1/p53 signaling pathway and is a prognosis marker in colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*. **2019**, *234*, 4385-4395.
177. ZHAO, H. a kol.: The NAMPT/E2F2/SIRT1 axis promotes proliferation and inhibits p53-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2017**, *493*, 77-84.
178. MA, R. a kol.: Exogenous pyruvate represses histone gene expression and inhibits cancer cell proliferation via the NAMPT–NAD⁺–SIRT1 pathway. *Nucleic Acids Research*. **2019**, *47*, 11132-11150.
179. HESKE, C. M.: Beyond Energy Metabolism: Exploiting the Additional Roles of NAMPT for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. **2020**, *9*, 1-11.
180. HESKE, C. M. a kol.: Matrix Screen Identifies Synergistic Combination of PARP Inhibitors and Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors in Ewing Sarcoma. *Clinical Cancer Research*. **2017**, *23*, 7301-7311.

181. BAJRAMI, I. a kol.: Synthetic lethality of PARP and NAMPT inhibition in triple-negative breast cancer cells. *EMBO Molecular Medicine*. **2012**, *4*, 1087-1096.
182. ZHU, B. a kol.: NAMPT is involved in DNA double-strand break repair. *Chinese Journal of Cancer*. **2012**, *31*, 392-398.
183. GORTHI, A. a kol.: EWS–FLI1 increases transcription to cause R-loops and block BRCA1 repair in Ewing sarcoma. *Nature*. **2018**, *555*, 387-391.
184. PIACENTE, F. a kol.: Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase Regulates Cancer Cell Metabolism, Susceptibility to NAMPT Inhibitors, and DNA Repair. *Cancer Research*. **2017**, *77*, 3857-3869.
185. ZERP, S. F. a kol.: NAD⁺ depletion by APO866 in combination with radiation in a prostate cancer model, results from an *in vitro* and *in vivo* study. *Radiotherapy and Oncology*. **2014**, *110*, 348-354.
186. LI, N. a kol.: Dual PAK4-NAMPT inhibition impacts growth and survival, and increases sensitivity to DNA-damaging agents in Waldenstrom Macroglobulinemia. *Clinical Cancer Research*. **2018**, 1-26.
187. JU, H.-Q. a kol.: Regulation of the Nampt-mediated NAD⁺ salvage pathway and its therapeutic implications in pancreatic cancer. *Cancer Letters*. **2016**, *379*, 1-11.
188. CHE, X.-M.: Overexpression of Nampt in gastric cancer and chemopotentiating effects of the NAMPT inhibitor FK866 in combination with fluorouracil. *Oncology Reports*. **2011**, *26*, 1251-1267.
189. OGINO, Y. a kol.: Genomic and tumor biological aspects of the anticancer nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitor FK866 in resistant human colorectal cancer cells. *Genomics*. **2019**, *111*, 1889-1895.
190. TRACHOOTHAM, D. a kol.: Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery*. **2009**, *8*, 579-591.
191. HONG, S. M. a kol.: Increased nicotinamide adenine dinucleotide pool promotes colon cancer progression by suppressing reactive oxygen species level. *Cancer Science*. **2018**, *110*, 629-638.
192. XU, R. a kol.: Inhibition of NAMPT decreases cell growth and enhances susceptibility to oxidative stress. *Oncology Reports*. **2017**, *38*, 1767-1773.
193. CERNA, D. a kol.: Inhibition of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Activity by Small Molecule GMX1778 Regulates Reactive Oxygen Species (ROS)-mediated Cytotoxicity in a p53- and Nicotinic Acid

- Phosphoribosyltransferase1 (NAPRT1)-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*. **2012**, 287, 22408-22417.
194. XIAO, Y. a kol.: Metabolic Response to NAD⁺ Depletion across Cell Lines Is Highly Variable. *PLOS ONE*. **2016**, 11, 1-17.
195. MUTZ, C. N. a kol.: EWS-FLI1 confers exquisite sensitivity to NAMPT inhibition in Ewing sarcoma cells. *Oncotarget*. **2017**, 8, 24679-24693.
196. JEONG, B. a kol.: FOXO1 functions in the regulation of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2019**, 511, 398-403.
197. GE, X. a kol.: NAMPT regulates PKM2 nuclear location through 14-3-3zeta: Conferring resistance to tamoxifen in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*. **2019**, 234, 23409-23420.
198. GROLLA, A. A. a kol.: Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is a tumoural cytokine released from melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*. **2015**, 28, 718-729.
199. GHOLINEJAD, Z. a kol.: Extracellular NAMPT/Visfatin induces proliferation through ERK1/2 and AKT and inhibits apoptosis in breast cancer cells. *Peptides*. **2017**, 92, 9-15.
200. CEA, M. a kol.: Targeting NAD⁺ salvage pathway induces autophagy in multiple myeloma cells via mTORC1 and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) inhibition. *Blood*. **2012**, 120, 3519-3529.
201. SCHUSTER, S. a kol.: FK866-induced NAMPT inhibition activates AMPK and downregulates mTOR signaling in hepatocarcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2015**, 458, 334-340.
202. ESPINDOLA-NETTO, J. M. a kol.: Preclinical efficacy of the novel competitive NAMPT inhibitor STF-118804 in pancreatic cancer. *Oncotarget*. **2017**, 8, 1-14.
203. MPILLA, G. a kol.: PAK4-NAMPT Dual Inhibition as a Novel Strategy for Therapy Resistant Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancers*. **2019**, 11, 1-19.
204. CEA, M. a kol.: Targeting NAD⁺ salvage pathway induces autophagy in multiple myeloma cells via mTORC1 and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) inhibition. *Blood*. **2012**, 120, 3519-3529.
205. AUDRITO, V. a kol.: Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a Therapeutic Target in BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. **2018**, 110, 290-303.

206. OHANNA, M. a kol.: Pivotal role of NAMPT in the switch of melanoma cells toward an invasive and drug-resistant phenotype. *Genes & Development*. **2018**, *32*, 448-461.
207. LUCENA-CACACE, A. a kol.: NAMPT as a Dedifferentiation-Inducer Gene: NAD⁺ as Core Axis for Glioma Cancer Stem-Like Cells Maintenance. *Frontiers in Oncology*. **2019**, *9*, 1-32.
208. LUCENA-CACACE, A. a kol.: NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis. *Oncotarget*. **2017**, *8*, 99514-99530.
209. LUCENA-CACACE, A. a kol.: NAMPT Is a Potent Oncogene in Colon Cancer Progression that Modulates Cancer Stem Cell Properties and Resistance to Therapy through Sirt1 and PARP. *Clinical Cancer Research*. **2018**, *24*, 1202-1215.
210. GUJAR, A. D. a kol.: An NAD⁺-dependent transcriptional program governs self-renewal and radiation resistance in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2016**, *113*, 1-10.
211. ZHANG, B. a kol.: FK866 inhibits the epithelial-mesenchymal transition of hepatocarcinoma MHCC97-H cells. *Oncology Letters*. **2018**, *16*, 7231-7238.
212. SONCINI, D. a kol.: Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition as a Soluble Factor Independent of Its Enzymatic Activity. *Journal of Biological Chemistry*. **2014**, *289*, 34189-34204.
213. CHENG, G. a kol.: Visfatin promotes osteosarcoma cell migration and invasion via induction of epithelial-mesenchymal transition. *Oncology Reports*. **2015**, *34*, 987-994.
214. WANG, W. a kol.: Decreased NAD⁺ Activates STAT3 and Integrin Pathways to Drive Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecular & Cellular Proteomics*. **2018**, *17*, 2005-2017.
215. LEE, J. a kol.: Selective Cytotoxicity of the NAMPT Inhibitor FK866 Toward Gastric Cancer Cells With Markers of the Epithelial-Mesenchymal Transition, Due to Loss of NAPRT. *Gastroenterology*. **2018**, *155*, 799-814.
216. AUDRITO, V. a kol.: Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **2015**, *125*, 111-123.
217. CHAKER, M. a kol.: GTPase effectors and NAD⁺ metabolism in cancer immune suppression. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. **2017**, *22*, 9-17.

218. TRAVELLI, C. a kol.: Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Acts as a Metabolic Gate for Mobilization of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research*. **2019**, *79*, 1938-1951.
219. PYLAEVA, E. a kol.: NAMPT signaling is critical for the proangiogenic activity of tumor-associated neutrophils. *International Journal of Cancer*. **2019**, *144*, 136-149.
220. WATSON, M. a kol.: The Small Molecule GMX1778 Is a Potent Inhibitor of NAD⁺ Biosynthesis: Strategy for Enhanced Therapy in Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase 1-Deficient Tumors. *Molecular and Cellular Biology*. **2009**, *29*, 5872-5888.
221. OLESEN, U. H. a kol.: A Preclinical Study on the Rescue of Normal Tissue by Nicotinic Acid in High-Dose Treatment with APO866, a Specific Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*. **2010**, *9*, 1609-1617.
222. GEHRKE, I. a kol.: On-Target Effect of FK866, a Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase Inhibitor, by Apoptosis-Mediated Death in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Clinical Cancer Research*. **2014**, *20*, 4861-4872.
223. BURGOS, E. S. a kol.: A phosphoenzyme mimic, overlapping catalytic sites and reaction coordinate motion for human NAMPT. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2009**, *106*, 13748-13753.
224. OH, A. a kol.: Structural and Biochemical Analyses of the Catalysis and Potency Impact of Inhibitor Phosphorylation by Human Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *ChemBioChem*. **2014**, *15*, 1121-1130.
225. DRAGOVICH, P. S. a kol.: Fragment-based design of 3-aminopyridine-derived amides as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2014**, *24*, 954-962.
226. ZHENG, X. a kol.: Structure-Based Discovery of Novel Amide-Containing Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2013**, *56*, 6413-6433.
227. ZHANG, S.-I. a kol.: Crystal structure-based comparison of two NAMPT inhibitors. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2018**, *39*, 294-301.
228. GALLI, U. a kol.: Medicinal Chemistry of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2013**, *56*, 6279-6296.

229. CHRISTENSEN, M. K. a kol.: Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitors, Design, Preparation, and Structure–Activity Relationship. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2013**, *56*, 9071-9088.
230. ZHENG, X. a kol.: Discovery of potent and efficacious cyanoguanidine-containing nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2014**, *24*, 337-343.
231. GIANNETTI, A. M. a kol.: Fragment-Based Identification of Amides Derived from trans-2-(Pyridin-3-yl)cyclopropanecarboxylic Acid as Potent Inhibitors of Human Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Journal of Medicinal Chemistry*. **2014**, *57*, 770-792.
232. ZHENG, X. a kol.: Identification of amides derived from 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylic acid as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2013**, *23*, 5488-5497.
233. DRAGOVICH, P. S. a kol.: Identification of 2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-c]pyridine-derived ureas as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2013**, *23*, 4875-4885.
234. GUNZNER-TOSTE, J. a kol.: Discovery of potent and efficacious urea-containing nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors with reduced CYP2C9 inhibition properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2013**, *23*, 3531-3538.
235. ZHENG, X. a kol.: Structure-Based Identification of Ureas as Novel Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2013**, *56*, 4921-4937.
236. SAMPATH, D. a kol.: Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. **2015**, *151*, 16-31.
237. CHAN, D. A. a kol.: Targeting GLUT1 and the Warburg Effect in Renal Cell Carcinoma by Chemical Synthetic Lethality. *Science Translational Medicine*. **2011**, *3*, 1-9.
238. ADAMS, D. J. a kol.: NAMPT Is the Cellular Target of STF-31-Like Small-Molecule Probes. *ACS Chemical Biology*. **2014**, *9*, 2247-2254.

239. TAKEUCHI, M. a kol.: Discovery of a Novel Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase (NAMPT) Inhibitor via in Silico Screening. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2014**, *37*, 31-36.
240. MATHENY, C. J. a kol.: Next-Generation NAMPT Inhibitors Identified by Sequential High-Throughput Phenotypic Chemical and Functional Genomic Screens. *Chemistry & Biology*. **2013**, *20*, 1352-1363.
241. MARI, C. a kol.: Combination of Ru(II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy. *Chemical Science*. **2015**, *6*, 2660-2686.
242. RESPONDEK, T. a kol.: Inhibition of Cathepsin Activity in a Cell-Based Assay by a Light-Activated Ruthenium Compound. *ChemMedChem*. **2014**, *9*, 1306-1315.
243. ANSTAETT, P. a kol.: Two-photon uncageable enzyme inhibitors bearing targeting vectors. *Photochemical & Photobiological Sciences*. **2015**, *14*, 1821-1825.
244. HOPKINS, S. L. a kol.: An in vitro cell irradiation protocol for testing photopharmaceuticals and the effect of blue, green, and red light on human cancer cell lines. *Photochemical & Photobiological Sciences*. **2016**, *15*, 644-653.
245. LI, A. a kol.: Illuminating cytochrome P450 binding: Ru(II)-caged inhibitors of CYP17A1. *Chem Commun (Camb)*. **2017**, *53*, 3673-3676.
246. KNOLL, J. D. a kol.: New Ru(II) Complexes for Dual Photoreactivity: Ligand Exchange and ¹O₂ Generation. *Accounts of Chemical Research*. **2015**, *48*, 2280-2287.
247. YIN, H. a kol.: In Vitro Multiwavelength PDT with 3 IL States: Teaching Old Molecules New Tricks. *Inorganic Chemistry*. **2014**, *53*, 4548-4559.
248. BAHREMAN, A. a kol.: Spontaneous Formation in the Dark, and Visible Light-Induced Cleavage, of a Ru-S Bond in Water: A Thermodynamic and Kinetic Study. *Inorganic Chemistry*. **2013**, *52*, 9456-9469.
249. HUISMAN, M. a kol.: Caging the uncageable: using metal complex release for photochemical control over irreversible inhibition. *Chemical Communications*. **2016**, *52*, 12590-12593.
250. OLESEN, U. H. a kol.: Anticancer agent CHS-828 inhibits cellular synthesis of NAD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2008**, *367*, 799-804.
251. KNOLL, J. a kol.: Unusually Efficient Pyridine Photodissociation from Ru(II) Complexes with Sterically Bulky Bidentate Ancillary Ligands. *The Journal of Physical Chemistry A*. **2014**, *118*, 10603-10610.
252. WEI, J. a kol.: Photolabile ruthenium complexes to cage and release a highly cytotoxic anticancer agent. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2018**, *179*, 146-153.

253. GALLI, U. a kol.: Synthesis and Biological Evaluation of Isosteric Analogues of FK866, an Inhibitor of NAD Salvage. *ChemMedChem*. **2008**, *3*, 771-779.
254. *Piperidine Derivates For Use In The Treatment Of Pancreatic Cancer*. EP 3 279 192 A1. Udelené **2/2018**.
255. TÖNNEMANN, J. a kol.: Efficient and Rapid Synthesis of Chlorido-Bridged Half-Sandwich Complexes of Ruthenium, Rhodium, and Iridium by Microwave Heating. *European Journal of Inorganic Chemistry*. **2013**, *26*, 4558-4562.
256. COVERDALE, J. P. C. a kol.: Easy to synthesize, robust organo-osmium asymmetric transfer hydrogenation catalysts. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 8043–8046.
257. BETANZOS-LARA, S. a kol.: Photoactivatable Organometallic Pyridyl Ruthenium(II) Arene Complexes. *Organometallics*. **2012**, *31*, 3466–3479.
258. ZHANG, H. a kol.: Significant effects of counteranions on the anticancer activity of iridium(iii) complexes. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 4421-4424.
259. WINGAD, R. L. a kol.: Catalytic Conversion of Ethanol to *n*-Butanol Using Ruthenium P–N Ligand Complexes. *ACS Catalysis*. **2015**, *5*, 5822-5826.