

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2015-585

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07K 5/04 (2006.01)
C07J 41/00 (2006.01)
C07J 9/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30.08.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **02.11.2016**
(Věstník č. 44/2016)

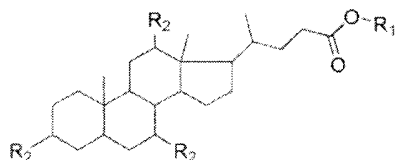
(71) Přihlašovatel:
University of Jyväskylä, Department of Chemistry,
Jyväskylä, FI
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6, CZ

(72) Původce:
prof. RNDr. Vladimír Král, DSc., Praha 2, CZ
Chinnappareddy Bhupendra Reddy, Ph.D., YSR
(DT), Andhra Pradesh, IN
Mgr. Milla Vasina, Praha 4, CZ
prof. emer. Dr. Erkki Kolehmainen, Säynätsalo, FI
Dr. Elina Sievänen, Vaajakoski, FI

(74) Zástupce:
PATENT SKY s.r.o., Ing. Petra Kolářová, Dušní
8/11, 110 00 Praha 1

(54) Název přihlášky vynálezu:
Transportér nukleotidových struktur

(57) Anotace:
Transportér nukleotidových struktur sestavený
z guanidinem substituovaných žlučových kyselin
použitelný především jako nosič či transportní systém
řetězců či fragmentů RNA a DNA přes syntetické či
biologické membrány.



$R_1 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2, \text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$
 $R_2 = \text{H}, \text{OH}, \text{NH}_2, \text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$

~~11/11~~

23.08.16

~~70-2016-581~~

-/-

Transportér nukleotidových struktur

Oblast techniky

Vynález představuje jednoduchou syntézu guanidinových substituovaných žlučových kyselin. Syntetizovány byly sloučeniny guanidinových derivátů kyseliny cholové, chenodeoxycholové, deoxycholové a lithocholové. Vytvořené guanidinové deriváty se ukázaly být vysoce efektivními transportéry jak RNA, tak DNA do buněk, jak bylo prokázáno in vitro experimenty pomocí PAMPA (paralelní analýza permeability umělou membránou).

Dosažení

Stav techniky

RNA interference (RNAi) je nově vznikající technologie, která revolučně mění řadu strategických přístupů k biochemické analýze, vývoji nových léčiv a v terapii (Leung KM, Whittaker PA (2005) RNA interference: From gene silencing to genespecific Therapeutics. Pharmacol Ther 107:222–239; Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL (2010) RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. Trends Biotechnol 28:570–579; Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK (2011) RNA interference in the clinic: Challenges and future directions. Nat Rev Cancer 11:59–67; Castanotto D, Rossi JJ (2009) The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. Nature 457:426–433; Davidson BL, McCray PB (2011) Current prospects for RNA interference-based therapies. Nat Rev Genet 12:329–340; Aagaard L, Rossi JJ (2007) RNAi therapeutics: Principles, prospects, and challenges. Adv Drug Deliv Rev 59:75–86). RNAi je mechanismus umožňující endogenní tlumení genů na základě selektivního rozpoznání sekvencí, který je znám z řady organismů. (Hannon GJ. RNA interference. Nature 2002; 418:244-51; Sharp PA. RNA interference—2001. Genes Dev 2001; 15:485-90; Zamore PD. RNA interference: Listening to the sound of silence. Nat Struct Biol 2001; 8:746-50.) V rámci RNAi dráhy, malé interferující RNA (siRNA) indukují posttranskripční, sekvenčně specifické tlumení aktivity genu s využitím endogenního

intracelulárního mechanismu, který by selektivně potlačoval genovou expresi, a tím snížil syntézu cílového proteinu (Elbashir SM, et al. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494–498). Výsledný efekt je ekvivalentní inhibicí proteinu bez použití nízkomolekulárních inhibitorů. Specifičnost RNAi také umožňuje syntetizovat inhibitory proti původně neléčitelným onemocněním. Všudypřítomnost RNAi drah uvnitř těla a snadnost s jakou siRNA mohou být použity k potlačení konkrétních genů učinily z siRNA slibnou třídu molekul pro léčbu rakoviny, virových infekcí, očních a genetických chorob. I když se tyto molekuly jeví jako silný nástroj pro ovlivnění toho, zda se příslušný tělu škodlivý gen bude projevovat či nikoli, mají značná omezení pro reálnou aplikaci. Neexistují uspokojivé mechanismy dopravy siRNA do buněk, mají vedlejší účinky v důsledku tlumení genů, narušují fyziologické funkce buněčného systému zapojeného do umlčení genu a indukují vrozenou imunitní odpověď. (E.Miele, G. P. Spinelli, E. D. Fabrizio, E. Ferretti, S. Tomao, and A. Gulino, (2012) “Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 7, pp. 3637–3657). Pro aktivní distribuci léku, jeho vložení do nosiče a cílení léku v nosiči je třeba vyvinout spolehlivé transportní systémy. V poslední době se zvyšuje potřeba nových menších transportních systémů, které splňují požadovaný specifický design (R. K. Upadhyay(2014) “Drug Delivery Systems, CNS Protection, and the Blood Brain Barrier“, Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, vol.,. Art. ID 869269, pp.37). Schopnost léčiva nebo sondy překročit biologické bariéry byla historicky považována za funkci jeho fyzikálních vlastností. Tento pohled z velké části omezuje návrh struktur a typů léčiv na výběr aktivních látek v úzkém rozmezí. Molekulární transportní systémy nabízejí strategii, jak tato omezení obejít.

V případě guanidiniových transportérů (GRTs), typicky ve vodě vysoce rozpustných konjugátů, bylo zjištěno, že snadno prochází nepolární membránou buňky a některé i tkáňovými bariérami. Látky, které vykazují špatnou biologickou dostupnost jsou metabolizovány atp. Právě proto jsou právě hledány vhodné transportní systémy, které by tyto účinné látky donesly skrz buněčné membrány. Pro mnoho aplikací, se připravuje pro-léčivo, kdy konjugátem je transportér-léčivo s linkerem, který je chemicky nebo biochemicky odštěpen po průchodu přes překážku, což umožňuje uvolňování volného léčiva v cílových buňkách nebo tkáních. Guanidiniové skupiny

jsou vhodné pro vazbu na buněčné povrchy s centry záporně nabitých funkčních skupin. Vytvořené komplexy by umožnily uvolnění léčiva po vstupu do vnitřního buněčného prostoru. Guanidiniové transportéry disponují více mechanismy prostupu do buněk, např. endocytózou. Také byly provedeny experimenty studující uvolňování léčiva endosomální inhibicí (Wender, P. A.; Galliher, W. C.; Goun, E. A.; Jones, L. R.; Pillow, T. H. (2008) The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 60, 452–472). Pro tkáňové selektivní vazby je schopnost GRTs vstoupit do tkáně kritickým parametrem. Podobné studie ukázaly, že pro zlepšení vstupu GRTs do tkáně tenkého nebo tlustého střeva myši, byly injekčně podány roztoky biotinylovaného oligoargininu (L.R. Wright, J.B. Rothbard, P.A. Wender, (2003) Guanidinium rich peptide transporters and drug delivery, *Curr. Protein Pept. Sci.* 4 105–124). GRTs ukázaly, že pronikají do mnoha typů tkání, otázkou však je, s jakou selektivitou. Jedna strategie pro dosažení selektivity je použití lokální distribuce. To má potenciálně široké uplatnění podávání léku do plicích, do očí nebo do kůže. GRTs vykazují vychytávání v plicních tkáních při vdechnutí a při průniku do epidermálních a dermálních vrstev při topické aplikaci. Kromě místního podání, může být použit i cílený transportní systém. Tento přístup byl demonstrován na strategii s pro-léčivem, ve kterém je přechodně transportéru vypnuta intramolekulární interakce s polykarboxylátem připojeným k transportéru prostřednictvím peptidu. Peptid je vybrán jako substrát pro extracelulární proteázy, který je lokalizován v cílové tkáni.

Tyto guanidinem bohaté molekulární transportní systémy mohou zlepšit prostupnost různých látek přes biologické bariéry, kterými jsou například buněčné membrány. (Wender PA, Cooley CB, Geihe EG (2012) Beyond cell penetrating peptides: Designed molecular transporters. *Drug Discov Today Technol* 9:e49–e55; Wender PA, Galliher WC, Goun EA, Jones LR, Pillow TH (2008) The design of guanidinium- rich transporters and their internalization mechanisms. *Adv Drug Delivery Rev* 60:452–472).

Byly hledány účinné transportéry pro RNA a DNA. Nejdříve byly testovány guanidiniové transportéry, u kterých se funkčnost transportu do buněk očekávala. Z polyaniontu DNA a RNA byla tvorbou komplexu s molekulami guanidinu vytvořena elektroneutrální molekula, která však přes buněčnou membránu neprocházela. Transport RNA fragmentu do buněk je velmi

neefektivní díky náboji a hydrofilicitě. Samotná nábojová neutralizace např. kationty typu kvartérní amoniové soli nestačí tento trend zvrátit. Proto bylo nutné hledat jiné systémy, které by byly schopné sloužit jako nosiče DNA a RNA molekul přes buněčné membrány.

Podstata vynálezu

Našli jsme struktury, které jsou schopné s nukleotidovými řetězci, tedy ribonukleovými a deoxyribonukleovými kyselinami tvořit stabilní komplex, který po průchodu přes membránu do vnitřního prostoru buněk molekuly RNA či DNA nebo jejich fragmenty opět uvolní. Tyto struktury sestávají z guanidinových derivátů žlučových kyselin. Tento komplex má lipofilní povahu, snadno prochází přes lipidovou dvojvrstvu buněčných membrán a jeho guanidinový zbytek se váže na fosfodiesterovou vazbu DNA a RNA, proto nezáleží na tom jaké je řetězec délky, ani které dusíkaté báze obsahuje.

Zjistili jsme, že sloučenina, která efektivně vytváří komplex fosfodiester - guanidin v kombinaci s lipofilním substituentem, nejlépe steroidem, představuje díky této unikátní kombinaci velmi efektivní a laditelný systém transportu RNA a DNA do buněk.

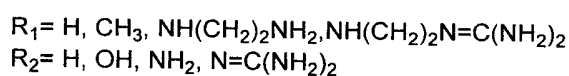
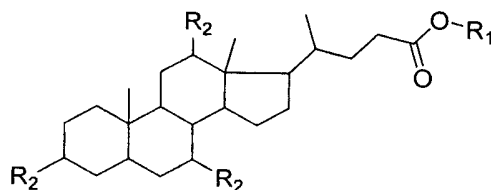
Tyto transportéry velice účinně přenášejí RNA a DNA přes buněčné membrány. Nově jsme syntetizovali guanidinem substituovanou kyselinu cholovou, chenodeoxycholovou, deoxycholovou a lithocholovou a připravili tak velmi efektivní transporter pro RNA a DNA molekuly. Jejich vlastnosti jsme testovali na syntetických buněčných membránách. Byly stanoveny koncentrace RNA a DNA, které jsou transportéry schopné přes membránu dopravit. Také byly stanoveny konstanty stability kvantifikující sílu vazby molekuly v komplexu a jejich vyvázání po průchodu membránou.

Mechanismus transportu probíhá tak, že transporter je k molekule DNA či RNA vázán přes guanidinový zbytek na fosfodiesterovou vazbu a steroidní část struktury transportéru dale interaguje šroubovici DNA či RNA. Takto molekuly transportéru v podstatě obalí molekulu RNA či DNA a díky lipofilitě a biologickému charakteru steroidních struktur tento komplex snadno prochází membránou, tudíž ani nezávisí na její velikost. Je tedy možný transport jak fragmentů RNA či DNA, tak celých molekul.

Také bylo zjištěno, že velmi záleží na molárním poměru mezi transportérem a transportovanou RNA či DNA. Rostoucí desetinásobný a vyšší přebytek transportéru nemá pozitivní vliv na

účinnost transportu do buněk, naopak má negativní dopad na transportovatelnost vzniklého komplexu.

Naše nově navržené sloučeniny mají obecný vzorec:



Struktura obsahuje skupinu R_1 , která je připojena ke kyslíku karboxylu. Skupina R_2 je napojena v poloze C-3, C-7 a C-12. Struktura je tvořena sedmnácti uhlíkovými atomy spojenými čtyřmi kruhy. Tři kruhy se skládají z šesti atomů uhlíku a jeden je z pěti uhlíkatého kruhu.

Kde skupina R_1 je H, CH_3 , $\text{NH(CH}_2)_2\text{NH}_2$ a $\text{NH(CH}_2)_2\text{N=C(NH}_2)_2$ a skupina R_2 je H, OH, NH_2 a $\text{N=C(NH}_2)_2$. Studovali jsme dopravu RNA a DNA pomocí PAMPA testu s guanidinem substituovanými žlučovými kyselinami, RNA a DNA od krmných kvasnic a fosfátem pufrovaného fyziologického roztoku (PBS). Dosáhli jsme velmi dobrých výsledků pro naše sloučeniny, které působí jako dobré transportéry.

Objasnění
Přehled obrázků na výkresbě

- Obr. 1: Výsledky PAMPA testu pro transport RNA dle příkladu 7
- Obr. 2: Graf zobrazující efektivnost transportu RNA jednotlivých transportérů; SG-1, 2, 4, 5 a 6, číselné označení je označení příkladu, dle kterého byly připraveny
- Obr. 3: Graf zobrazující efektivitu transportu RNA jednotlivých transportérů při koncentraci 1 mmol/l transportéru vůči 0,05 mmol/l RNA.
- Obr. 4: Graf zobrazující efektivitu transportu RNA jednotlivých transportérů při koncentraci 10 mmol/l transportéru vůči 0,05 mmol/l RNA.
- Obr. 5: Graf zobrazující efektivitu transportu RNA transportéru dle příkladu 6 při koncentraci 0,1/1/10 mmol/l transportéru vůči 0,05 mmol/l RNA.
- Obr. 6: Graf zobrazující efektivitu transportu RNA transportéru dle příkladu 4 při koncentraci 0,1/1/10 mmol/l transportéru vůči 0,05 mmol/l RNA.
- Obr. 7: Výsledky PAMPA testu pro transport DNA dle příkladu 8.
- Obr. 8: Graf zobrazující efektivnost transportu DNA jednotlivých transportérů; SG-1, 2, 4, 5 a 6, číselné označení je označení příkladu, dle kterého byly připraveny.
- Obr. 9: Graf zobrazující efektivitu transportu DNA jednotlivých transportérů při koncentraci 1 mmol/l transportéru vůči 0,05 mmol/l DNA.
- Obr. 10: Graf zobrazující efektivitu transportu DNA jednotlivých transportérů při koncentraci 10 mmol/l transportéru vůči 0,05 mmol/l DNA.
- Obr. 11: Graf zobrazující efektivitu transportu DNA transportéru dle příkladu 6 při koncentraci 0,1/1/10 mmol/l transportéru vůči 0,05 mmol/l DNA.
- Obr. 12: Graf zobrazující efektivitu transportu DNA transportéru dle příkladu 4 při koncentraci 0,1/1/10 mmol/l transportéru vůči 0,05 mmol/l DNA.
- Obr. 13: Graf závislosti absorbance na vlnové délce při rozdílných koncentracích RNA a transportéru pro stanovení konstanty stability transportéru dle příkladu 6.
- Obr. 14: Graf závislosti absorbance na vlnové délce při rozdílných koncentracích RNA a transportéru pro stanovení konstanty stability transportéru dle příkladu 4.

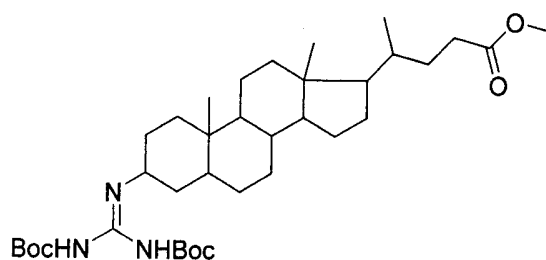
Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

prekurzor

0,3 g (0,77 mmol) 3-amino methyl lithocholátu bylo zpracováno ve 30 ml dichlormethanu (dále DCM) při 0 °C s 1,1 ekvivalentem chloridu rtuťnatého, což odpovídalo 0,23 g (0,85 mmol), 1,0 ekvivalentu N, N'-di (terc-butoxykarbonyl) thiomocoviny, což odpovídalo 0,21 g (0,77 mmol) a 3,1 ekvivalentu triethylaminu, což odpovídalo 0,33 ml (2 mmol). Výsledná směs se míchala při teplotě 0 °C po dobu 1 h a 2 hodiny při teplotě místnosti. Následně se reakční směs zředila 10 ml ethylacetátu (dále EtOAc) a filtrovala se přes vrstvu celitu, aby se odstranil vytvořený sulfid rtuťnatý. Filtrační koláč byl promyt 5 ml EtOAc. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a potom roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml), následně byla sušena bezvodým Na₂SO₄ a zkoncentrována za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 95:5.

Byl získán methyl lithocholát substituovaný na C-3 Boc-chráněným guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 83 % a strukturním vzorcí,



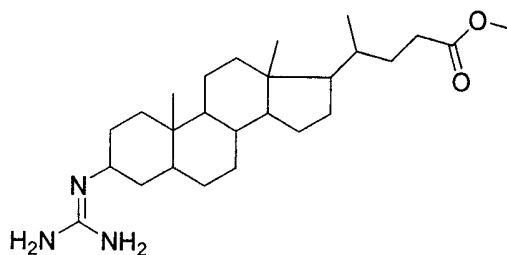
který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 0,65(s, 3H, CH₃-18), 0,91 (d, J=10,5 Hz, 3H, CH₃-21), 0,99 (s, 3H, CH₃-19), 1,50(s, 18H, Boc), 3,66 (s, 3H), 4,54 (s, 1H, CH-3); 8,9(s, 1H, BocNH), 11,48(s, 1H, BocNH). ¹³C NMR (126 MHz; CDCl₃) : 12,04, 18,27, 21,06, 24,16, 24,96, 26,22, 26,76, 28,08, 28,09, 28,32, 30,67, 31,04, 31,24, 35,05, 35,35, 35,68, 37,86, 39,90, 40,10, 42,75, 51,43, 55,93, 56,43, 153,28, 157,07, 174,73. LCMS, (m/z):633 [M+1]⁺

23.08.16

-8-

derivát

0,3 g (0,47 mmol) Boc-chráněný guanidinu substituovaný na C-3 methyl lithocholátu se nechal reagovat s 15 ml 50% roztoku kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu za intenzivního míchání po dobu 3 hodin. Pak směs byla neutralizována přebytkem roztoku amoniaku a extrahována chloroformem. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a následně roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml). Vzniklý produkt byl sušen bezvodým Na_2SO_4 a zkoncentrován za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 85:15. Byl získán methyl lithocholát substituovaný na C-3 guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 67 % a strukturním vzorcí,



který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 0,69(s, 3H, CH_3 -18), 0,92 (d, $J=5,0$ Hz, 3H, CH_3 -21), 1,02 (s, 3H, CH_3 -19), 3,65 (s, 3H), 3,83 (s, 1H, CH-3). ^{13}C NMR (126 MHz; MeOD) : 12,44, 18,71, 22,12, 24,32, 25,20, 25,75, 27,26, 27,72, 29,19, 31,56, 31,85, 32,20, 36,06, 36,68, 37,01, 38,56, 41,14, 41,41, 43,90, 48,99, 49,62, 52,00, 57,41, 57,79, 157,77, 176,43. HRMS calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_2$: 431,3512. Found: 432,3586 (M+H)

Příklad 2

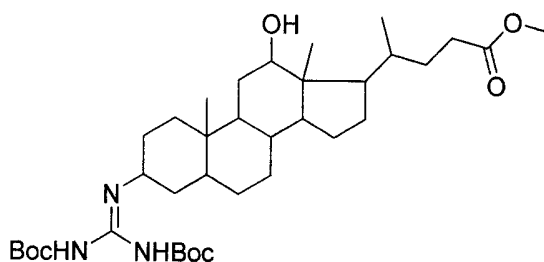
prekurzor

0,3 g (0,74 mmol) 3-amino methyl deoxycholátu bylo zpracováno ve 30 ml DCM při 0 °C s 1,1 ekvivalentem chloridu rtuťnatého, což odpovídalo 0,22 g (0,81 mmol), 1,0 ekvivalentu N, N'-di-(terc-butoxykarbonyl) thiomočoviny, což odpovídalo 0,2 g (0,74 mmol) a 3,1 ekvivalentu triethylaminu, což odpovídalo 0,32 ml (2,3 mmol). Výsledná směs se míchala při teplotě 0 °C po dobu 1 h a 3,5 hodiny při teplotě místnosti. Následně se reakční směs zředila 10 ml EtOAc a filtrovala se přes vrstvu celitu, aby se odstranil vytvořený sulfid rtuťnatý. Filtrační koláč byl

23.08.18

- 9 -

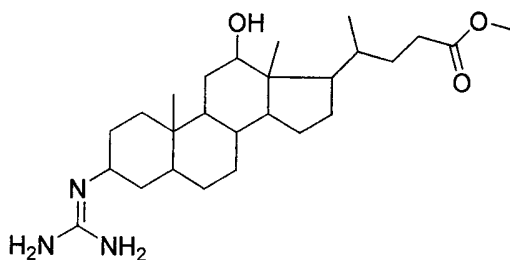
promyt 5 ml EtOAc. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a potom roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml), následně byla sušena bezvodým Na_2SO_4 a zkoncentrována za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 95:5. Byl získán methyl deoxycholát substituovaný na C-3 Boc-chráněným guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 80 % o strukturním vzorci,



který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 0,68(s, 3H, CH₃-18), 0,97 (m, 6H, CH₃-19, CH₃-21), 1,50(s, 18H, Boc), 3,66 (s, 3H), 3,98(s, 1H, C-12), 4,49 (br s, 1H, CH-3); 8,9(s, 1H, BocNH), 11,48(s, 1H, BocNH), ^{13}C NMR (126 MHz; CDCl_3) : 12,74, 17,34, 23,59, 23,86, 24,88, 25,91, 26,67, 27,40, 28,08, 28,29, 28,97, 30,62, 30,91, 31,06, 33,12, 34,60, 35,88, 37,85, 46,51, 47,36, 48,24, 51,47, 73,13, 152,63, 156,96, 174,67. LCMS, (m/z): 649 [M+1]⁺

derivát

0,3 g (0,46 mmol) Boc-chráněného guanidinu substituovaného na C-3 methyl deoxycholátu se nechal reagovat s 15 ml 50% roztoku kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu za intenzivního míchání po dobu 3 hodin. Pak směs byla neutralizována roztokem amoniaku a extrahována chloroformem. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a následně roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml). Vzniklý produkt byl sušen bezvodým Na_2SO_4 a zkoncentrován za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 85:15. Byl získán methyl deoxycholát substituovaný na C-3 guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 70 % o strukturním vzorci,



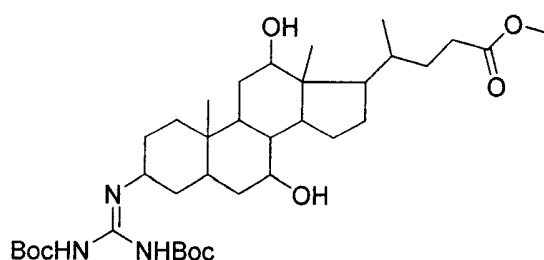
2

který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: ^1H NMR (MeOD, 500 MHz): 0,74(s, 3H, CH₃-18), 1,01 (s, 3H, CH₃-19), 1,02 (d, $J=5.0$ Hz, 3H, CH₃-21), 3,67 (s, 3H), 3,84(s,1H, C-12), 3,99 (br s, 1H, CH-3). ^{13}C NMR (126 MHz; MeOD) :11,73, 16,12, 22,62, 23,39, 24,19, 25,67, 26,31, 27,22, 28,59, 30,09, 30,16, 30,46, 30,79, 32,72, 34,25, 35,31, 35,76, 37,21, 46,20, 46,51, 46,68, 47,50, 50,58, 72,58, 156,36, 175,07. HRMS calcd. for C₂₆H₄₅N₃O₃: 447,3461. Found: 448,3528 (M+H)

Příklad 3

prekurzor

0,3 g (0,71 mmol) 3-amino methyl cholátu bylo zpracováno ve 30 ml DCM při 0 °C s 1,1 ekvivalentem chloridu rtuťnatého, což odpovídalo 0,21 g (0,78 mmol), 1,0 ekvivalentu N, N'-di(terc-butoxykarbonyl) thiomočoviny, což odpovídalo 0,197 g (0,71 mmol) a 3,1 ekvivalentu triethylaminu, což odpovídalo 0,3 ml (2,2 mmol). Výsledná směs se míchala při teplotě 0 °C po dobu 1 h a 5 hodin při teplotě místnosti. Následně se reakční směs zředila 10 ml EtOAc a filtrovala se přes vrstvu celitu, aby se odstranil vytvořený sulfid rtuťnatý. Filtrační koláč byl promyt 5 ml EtOAc. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a potom roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml), následně byla sušena bezvodým Na₂SO₄ a zkoncentrována za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 90:10. Byl získán methyl cholát substituovaný na C-3 Boc-chráněným guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 76 % o strukturním vzorci,



který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: ^1H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 0,70(s, 3H, CH₃-18), 0,99 (m, 6H, CH₃-19, CH₃-21), 1,49 (d, $J=4\text{Hz}$, 18H, Boc), 3,66 (s, 3H), 3,86 (s, 1H, C-12), 3,98(br s,1H, C-7) 4,41 (br s, 1H, CH-3); 8,89(s, 1H, BocNH), 11,48(s, 1H, BocNH), ^{13}C NMR (126 MHz; CDCl₃) : 13,09, 17,83, 23,62, 23,70, 25,23, 26,62, 27,84, 28,50, 28,71, 29,09, 31,27, 31,43, 33,97, 34,62, 35,49, 37,66, 39,87, 42,31, 46,80, 47,42, 51,68, 68,33, 72,91, 152,65, 157,74, 173,87. LCMS, (m/z): 665[M+1]⁺

23.05.16

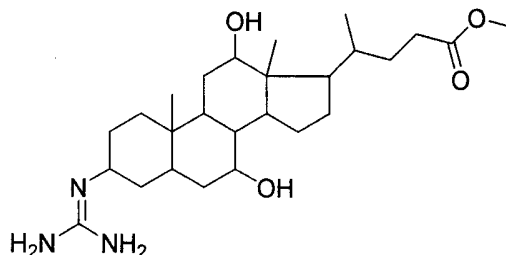
-11-

derivát

0,3 g (0,45 mmol) Boc-chráněného guanidinu substituovaného na C-3 methyl cholátu se nechal reagovat s 15 ml 50% roztoku kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu za intenzivního míchání po dobu 3 hodin. Pak byl neutralizován roztokem amoniaku a extrahován chloroformem.

Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a následně roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml). Vzniklý produkt byl sušen bezvodým Na_2SO_4 a zkoncentrován za sníženého tlaku.

Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 85:15. Byl získán methyl cholát substituovaný na C-3 guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 65 % o strukturním vzorci,



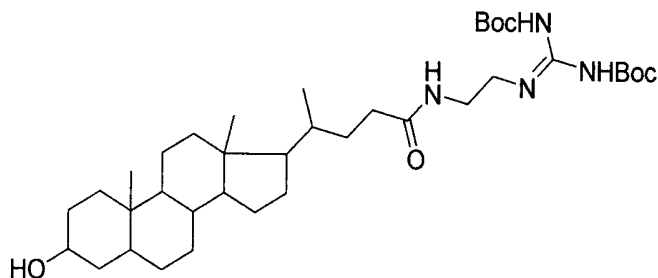
který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: ^1H NMR (MeOD, 500 MHz): 0,69(s, 3H, CH₃-18), 0,96 (s, 3H, CH₃-19), 0,97-0,98 (d, $J=5,0$ Hz, 3H, CH₃-21), 3,66 (s, 3H), 3,86 (s, 1H, C-12), 3,98(bs, 1H, C-7) 4,41 (br s, 1H, CH-3). ^{13}C NMR (126 MHz; MeOD) :11,73, 16,12, 22,62, 23,39, 24,19, 25,67, 26,31, 27,22, 28,59, 30,09, 30,16, 30,46, 30,79, 32,72, 34,25, 35,31, 35,76, 37,21, 46,20, 46,51, 47,50, 50,58, 68,32, 72,58, 156,36, 175,07.

Příklad 4

prekurzor

0,3 g (0,72 mmol) 26-amino lithocholyl ethyl amidu bylo zpracováno v 30 ml DCM při 0 °C s 1,1 ekvivalentem chloridu rtuťnatého, což odpovídalo 0,21 g (0,79 mmol), 1,0 ekvivalentu N, N'-di (terc)-butoxykarbonyl) thiomocoviny, což odpovídalo 0,198 g (0,71 mmol) a 3,1 ekvivalentu triethylaminu, což odpovídalo 0,31 ml (2,2 mmol). Výsledná směs se míchala při teplotě 0 °C po dobu 1 h a 4 hodiny při teplotě místnosti. Následně se reakční směs zředila 10 ml EtOAc a filtrovala se přes vrstvu celitu, aby se odstranil vytvořený sulfid rtuťnatý. Filtrační koláč byl promyt 5 ml EtOAc. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a potom roztokem

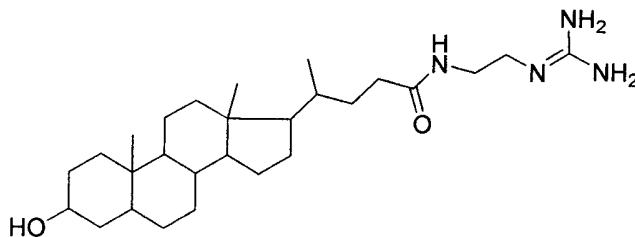
chloridu sodného (1 x 30 ml), následně byla sušena bezvodým Na₂SO₄ a zkoncentrována za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 90:10. Byl získán ethylamid lithocholát substituovaný na C-26 Boc-chráněným guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 82 % o strukturním vzorci,



který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: ¹H NMR (500 MHz; CDCl₃): 0,62(s, 3H, CH₃-18), 0,91 (br s, 6H, CH₃-19, CH₃-21), 1,50(s, 18H, Boc) 3,42 (m, 2H, NH₂CH₂), 3,61 (m, 3H, NHCH₂, CH-3), 7,29(s, 1H, CH₂-NH), 8,76(s, 1H, Boc-NH), 11,43(s, 1H, Boc-NH). ¹³C NMR (126 MHz; CDCl₃): 12,04, 18,40, 20,83, 23,38, 24,22, 26,43, 27,21, 28,03, 28,25, 30,56, 31,71, 33,56, 34,59, 35,36, 35,56, 35,87, 36,49, 40,19, 40,44, 40,88, 42,12, 42,74, 56,14, 56,16, 71,86, 84,21, 152,88, 157,06 174,03. calcd. for C₃₇H₆₄N₄O₆Na⁺: 683,47181. Found: 683,4717 (M+Na)

derivát

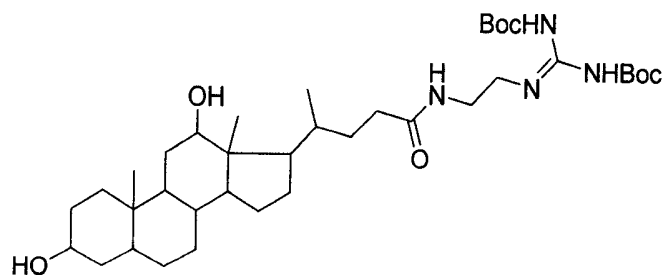
0,3 g (0,45 mmol) Boc-chráněného guanidinu substituovaného na C-3 lithocholyl ethylamidu se nechal reagovat s 15 ml 50% roztoku kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu za intenzivního míchání po dobu 3 hodin. Pak byl neutralizován roztokem amoniaku a extrahován chloroformem. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a následně roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml). Vzniklý produkt byl sušen bezvodým Na₂SO₄ a zkoncentrován za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 85:15. Byl získán lithocholyl ethylamid substituovaný na C-26 guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 65 % o strukturním vzorci,



který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: $\delta^1\text{H}$ (500 MHz; CDCl_3): 0,71(s, 3H, CH_3 -18), 0,96 (br s, 3H, CH_3 -19), 1,02(d, $J=5,0$, 3H, CH_3 -21), 3,1(t, 2H, NH_2CH_2), 3,2 (t, 2H, NHCH_2), 4,45 (m, CH-3). ^{13}C NMR (126 MHz; MeOD): 11,06, 17,44, 20,53, 22,51, 23,85, 26,24, 26,94, 27,88, 28,65, 29,77, 31,87, 32,66, 34,26, 35,06, 35,46, 35,83, 35,95, 38,55, 40,12, 40,48, 42,12, 42,51, 56,01, 56,53, 70,99, 175,30, 175,79. LCMS, (m/z): 462[M+H]⁺

Příklad 5

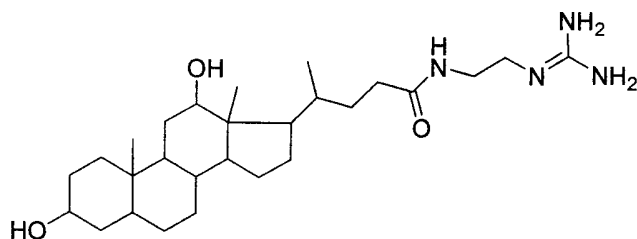
0,3 g (0,69 mmol) 26-amino deoxycholyl ethylamidu bylo zpracováno v 30 ml DCM při 0 °C s 1,1 ekvivalentem chloridu rtuťnatého, což odpovídalo 0,206 g (0,76 mmol), 1,0 ekvivalentu N, N'-di (terc-butoxykarbonyl) thiomočoviny, což odpovídalo 0,191 g (0,71 mmol) a 3,1 ekvivalentu triethylaminu, což odpovídalo 0,32 ml (2,1 mmol). Výsledná směs se míchala při teplotě 0 °C po dobu 1 h a 6 hodin při teplotě místnosti. Následně se reakční směs zředila 10 ml EtOAc a filtrovala se přes vrstvu celitu, aby se odstranil vytvořený sulfid rtuťnatý. Filtrační koláč byl promyt 5 ml EtOAc. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a potom roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml), následně byla sušena bezvodým Na_2SO_4 a zkoncentrována za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 90:10. Byl získán deoxycholyl ethylamid substituovaný na C-26 Boc-chráněným guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 78 % o strukturním vzorci,



který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: ^1H NMR (500 MHz; CDCl_3): 0,66(s, 3H, CH_3 -18), 0,90 (s, 3H, CH_3 -19), 0,98(d, $J=6,0$ 3H, CH_3 -21), 1,50(s, 18H, Boc) 3,42 (m, 2H, NH_2CH_2), 3,63(m, 3H, NHCH_2 , CH-12), 3,95-3,97(m, 1H, C-3), 7,41(s, 1H, CH_2 -NH), 8,84(s, 1H, Boc-NH), 11,42(s, 1H, Boc-NH). ^{13}C NMR (126 MHz; CDCl_3): 12,73, 17,45, 23,12, 23,65, 26,12, 27,12, 27,48, 28,00, 28,21, 28,55, 30,46, 31,571, 33,45, 33,62, 34,12, 35,26, 36,02, 36,42, 40,71, 42,08, 46,52, 47,33, 48,21, 71,79, 73,15, 84,16, 152,75, 156,96, 174,12. calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_7$: 677,48478. Found: 677,4860(M+H)

derivát

0,3 g (0,45 mmol) deoxycholyl ethylamidu substituovaného na C-26 Boc-chráněným guanidinem se nechal reagovat s 15 ml 50% roztoku kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu za intenzivního míchání po dobu 3 hodin. Pak byl neutralizován roztokem amoniaku a extrahován chloroformem. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a následně roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml). Vzniklý produkt byl sušen bezvodým Na_2SO_4 a zkoncentrován za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 85:15. Byl získán deoxycholyl ethylamid substituovaný na C-26 guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 63 % o strukturním vzorci,

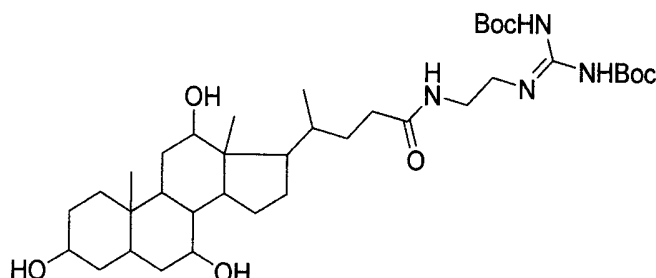


který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: δH (500 MHz; CDCl_3): 0,71(s, 3H, CH_3 -18), 0,96 (s, 3H, CH_3 -19), 0,98 (d, $J=5.0$ 3H, CH_3 -21), 3,02(m, 4H, NH_2CH_2), 3,56(m, 1H, C-12); 4,97(m, 1H, C-3). ^{13}C NMR (126 MHz; MeOD): 11,06, 17,43, 20,52, 22,22, 23,83, 25,72, 26,06, 27,88, 29,77, 31,35, 31,72, 32,53, 34,26, 35,05, 35,83, 37,99, 39,97, 40,48, 41,80, 42,11, 42,49, 56,301, 56,53, 70,98, 79,34, 157,51, 176,41. LCMS, (m/z): 478[M+H]⁺

Příklad 6

0,3 g (0,66 mmol) 26-amino cholyl ethyl amidu bylo zpracováno v 30 ml DCM při 0 °C s 1,1 ekvivalentem chloridu rtuťnatého, což odpovídalo 0,198 g (0,73 mmol), 1,0 ekvivalentu N, N'-di-(terc-butoxykarbonyl) thiomočoviny, což odpovídalo 0,184 g (0,71 mmol) a 3,1 ekvivalentu triethylaminu, což odpovídalo 0,3 ml (2,0 mmol). Výsledná směs se míchala při teplotě 0 °C po dobu 1 h a 8 hodin při teplotě místnosti. Následně se reakční směs zředila 10 ml EtOAc a filtrovala se přes vrstvu celitu, aby se odstranil vytvořený sulfid rtuťnatý. Filtrační koláč byl promyt 5 ml EtOAc. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a potom roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml), následně byla sušena bezvodým Na_2SO_4 a zkoncentrována za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru

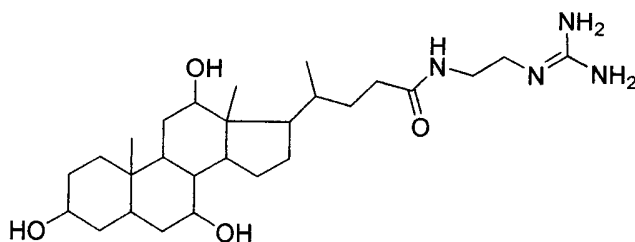
90:10. Byl získán cholyl ethylamid substituovaný na C-26 Boc-chráněným guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 77 % o strukturním vzorci,



který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: ^1H NMR (500 MHz; CDCl_3): 0,65(s, 3H, CH_3 -18), 0,87 (s, 3H, CH_3 -19), 0,98(d, $J=5,0$ 3H, CH_3 -21), 1,50(s, 18H, Boc) 3,38 (m, 3H, NH_2CH_2 , CH-12), 3,53 (m, 2H, NHCH_2), 3,82(br s, 1H, C-7), 3,95 (m, 1H, C-3), 7,48(s, 1H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 8,59(s, 1H, Boc-NH), 11,42(s, 1H, Boc-NH). ^{13}C NMR (126 MHz; CDCl_3): 12,88, 17,78, 22,05, 23,65, 26,12, 27,12, 27,48, 28,00, 28,21, 28, 85, 30,46, 29,14, 29,81, 33,22, 34,72, 35,77, 40,19, 41,02, 41,16, 41,63, 46,38, 46,52, 47,33, 48,21, 68,41, 71,79, 73,03, 79,45, 83,46, 152,98, 157,24, 174,43. calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_3$: 447,3461. Found: 448.3528 (M+H)

derivát

0,3 g (0,45 mmol) cholyl ethylamidu substituovaného na C-26 Boc-chráněným guanidinem se nechal reagovat s 15 ml 50% roztoku kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu za intenzivního míchání po dobu 3 hodin. Pak byl neutralizován roztokem amoniaku a extrahován chloroformem. Organická fáze byla promyta nejprve vodou (2 x 30 ml) a následně roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml). Vzniklý produkt byl sušen bezvodým Na_2SO_4 a zkoncentrován za sníženého tlaku. Získaný produkt se čistil pomocí silikagelu elucí směsí DCM:MeOH v poměru 85:15. Byl získán cholyl ethylamid substituovaný na C-26 guanidinem ve formě bílé látky o výtěžku 60 % o strukturním vzorci,



který byl potvrzen pomocí nukleární magnetické rezonance: $\delta^1\text{H}$ (500 MHz; CDCl_3): 0,64(s, 3H, CH_3 -18), 0,85 (s, 3H, CH_3 -19), 0,91(d, $J=6,5$ 3H, CH_3 -21), 3,33 (m, 3H, NH_2CH_2 , CH-12), 3,53 (m, 2H, NHCH_2), 3,82(br s, 1H, C-7), 4,97(m, 1H, C-3). ^{13}C NMR (126 MHz; MeOD): 12,58, 18,07, 23,09, 24,22, 26,35, 26,89, 27,59, 28,22, 31,35, 31,00, 32,54, 32,86, 33,67, 34,94, 35,59, 35,80, 39,39, 42,08, 42,84, 43,32, 46,39, 50,87, 72,14, 80,12, 82,82, 158,93, 177,47. LCMS, (m/z): 494 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Příklad 7

Test účinnosti transportéru lithocholyl ethylamid substituovaný na C-26 guanidinem, připraveného dle příkladu 4 pro RNA

V této studii byla použita PAMPA metoda (= parallel artificial membrane permeability assay). Tato in vitro metoda určuje propustnost látek prostřednictvím fosfolipidové vrstvy. Skládá se z několika jamek, které tvoří donorové a akceptorové mikrotitrační desky. Celá sestava se běžně označuje jako sendvič. Na začátku testu je látka přidána do donorové části. Do níž se vloží akceptorová destička s fosfolipidovou membránou na dně. Během inkubace dochází k transportu RNA pomocí transportérů RNA do akceptorové části. Po ukončení inkubace je proměřena koncentrace RNA v akceptorové i donorové destičce. Čímž se kvantifikuje množství transportované RNA.

Sendvičová struktura byla tvořena 96-jamkovou mikrotitrační destičkou a 96-jamkovou filtrační destičkou (IPVH, 125 μm tlustý filtr 0,45 μm pórů). Zásobní roztoky nosiče vzorků byly připraveny při 50 °C, následně byly smíchány s methanolem a uloženy při teplotě 0 °C. Nejprve byl zásobní roztok zředěn pufrem, aby se dosáhlo konečné koncentrace vzorků 10^{22} 50 μM a snížení koncentrace methanolu pod 5 % (objem / objem) a poté byl roztok pipetován do jamek. Donorová destička byla naplněna 300 μl zředěného nosiče o třech koncentracích ($C_{\text{carrier}} = 0,1/1/10 \text{ mmol/l}$) + RNA (RNA, $C = 0,05 \text{ mmol/l}$). Přičemž koncentrace RNA byla vztažena na monomerní jednotku. Akceptorové jamky byly naplněny 200 μl roztoku pufru. Donorová destička byla vložena do akceptorové destičky ve spodní části. Takto propojené destičky s fosfolipidovou membránou byly inkubovány při teplotě 25 °C v uzavřené nádobě po dobu 5 h bez míchání. Po uplynutí doby se sendvičové desky oddělily. Množství koncentrací RNA v

jamkách donorových a akceptorových destiček byly měřeny na základě porovnání experimentálního spektra s UV spektrem (220 ± 400 nm) získaným z referenčních standardů.

Příklad 8

Test účinnosti transportéru cholyl ethylamidu substituovaného na C-26 guanidinem, připraveného dle příkladu 6 pro DNA

Sendvičová struktura byla tvořena 96-jamkovou mikrotitrační destičkou a 96-jamkovou filtrační destičkou (IPVH, 125 μ m tlustý filtr 0,45 μ m pórů). Zásobní roztoky nosiče vzorků byly připraveny při 50 °C, následně byly smíchány s methanolem a uloženy při teplotě 0 °C. Nejprve byl zásobní roztok zředěn pufrům, aby se dosáhlo konečné koncentrace vzorků 10 ± 50 μ M a snížení koncentrace methanolu pod 5 % (objem / objem) a poté byl roztok pipetován do jamek.

Donorová destička byla naplněna 300 μ l zředěného nosiče o třech koncentracích ($C_{\text{carrier}} = 0,1/1/10$ mmol/l) + DNA (DNA, $C = 0,05$ mmol/l). Přičemž koncentrace DNA byla vztažena na monomerní jednotku. Akceptorové jamky byly naplněny 200 μ l roztoku pufru. Donorová destička byla vložena do akceptorové destičky ve spodní části. Takto propojené destičky fofolipidovou membránou byly inkubovány při teplotě 25 °C v uzavřené nádobě po dobu 5,5 hodiny bez míchání. Poté se sendvičové desky oddělily. Množství DNA v jamkách donorových a akceptorových destiček bylo měřeno pomocí UV (220 ± 400 nm) spektrofotometrie, koncentrace byla odečítána z naměřené absorbance.

Příklad 9

Test účinnosti transportéru lithocholyl ethylamidu substituovaného na C-26 guanidinem, připraveného dle příkladu 4 pro siRNA

Sendvičová struktura byla tvořena 96-jamkovou mikrotitrační destičkou a 96-jamkovou filtrační destičkou (IPVH, 125 μ m tlustý filtr 0,45 μ m pórů). Zásobní roztoky vzorků nosiče byly

připraveny při 50 °C, následně byly smíchány s methanolem a uloženy při teplotě 0 °C. Nejprve byl zásobní roztok zředěn pufrům, aby se dosáhlo konečné koncentrace vzorků $10 \times 50 \mu\text{M}$ a snížení koncentrace methanolu pod 5 % (objem / objem) a poté byl roztok pipetován do jamek. Donorová destička byla naplněna 300 μl zředěného transportéru o třech koncentracích ($C_{\text{transportér}} = 0,1/1/10 \text{ mmol/l}$) + siRNA (siRNA, $C = 0,05 \text{ mmol/l}$). Byla použita siRNA o 21 nukleotidech, přičemž koncentrace siRNA byla vztažena na monomerní jednotku. Akceptorové jamky byly naplněny 200 μl roztoku pufru. Donorová destička byla vložena do akceptorové destičky ve spodní části. Takto propojené destičky fodofofolipidovou membránou byly inkubovány při teplotě 25 °C v uzavřené nádobě po dobu 5,5 hodiny bez míchání. Po¹ té se sendvičové desky oddělily. Množství siRNA v jamkách donorových a akceptorových destiček bylo měřeno pomocí UV ($220 \times 400 \text{ nm}$) spektrofotometrie, koncentrace byla odečítána z naměřené absorbance.

Průmyslová využitelnost

Ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče RNA a DNA a jejich fragmentů.

~~136~~

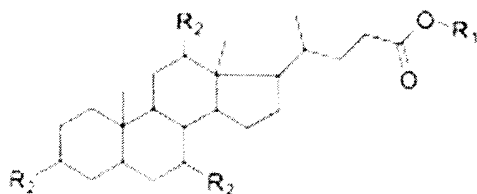
~~23.08.18~~

-19-

PATENTOVÉ NÁROKY

~~X~~

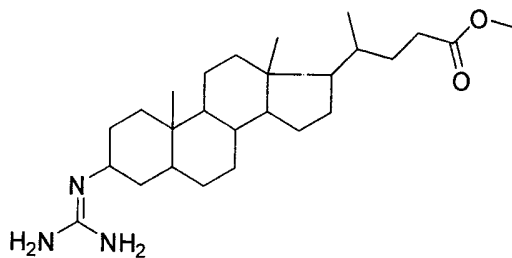
1. Transportér nukleotidových struktur o obecném vzorci ~~složení~~



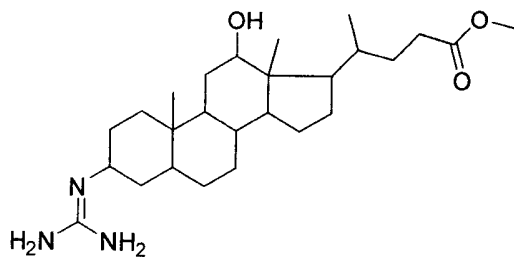
~~X~~

kde R_1 je ze skupiny H, CH_3 , $\text{NH}(\text{CH}_2)_2$, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$ a
 R_2 je ze skupiny H, OH, NH_2 , $\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$.

2. Transportér nukleotidových struktur podle nároku 1 o struktuře:

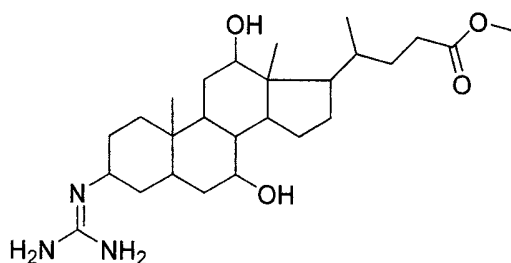


3. Transportér nukleotidových struktur podle nároku 1 o struktuře:

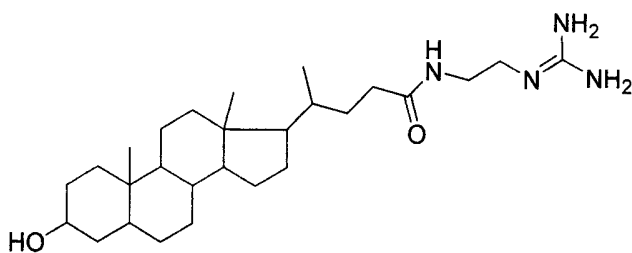


~~19~~

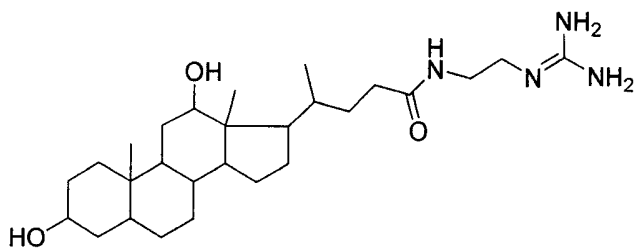
4. Transportér nukleotidových struktur podle nároku 1 o struktuře:



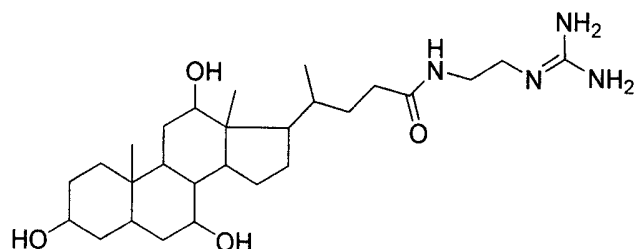
5. Transportér nukleotidových struktur podle nároku 1 o struktuře:



6. Transportér nukleotidových struktur podle nároku 1 o struktuře:



7. Transportér nukleotidových struktur podle nároku 1 o struktuře:

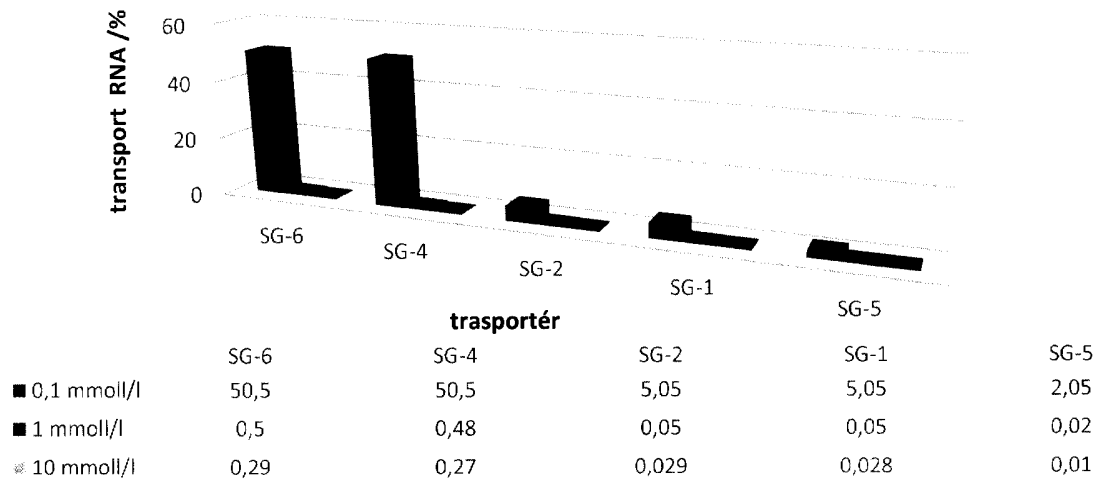


8. Použití transportéru nukleotidů podle nároku 1 jako nosičů řetězců či fragmentů RNA a DNA přes syntetické či biologické membrány.

6	SG-6	0,1	0,05	256	251
4	SG-4	0,1	0,05	256	50
2	SG-2	0,1	0,05	256	316
1	SG-1	0,1	0,05	256	1584
5	SG-5	0,1	0,05	256	3311

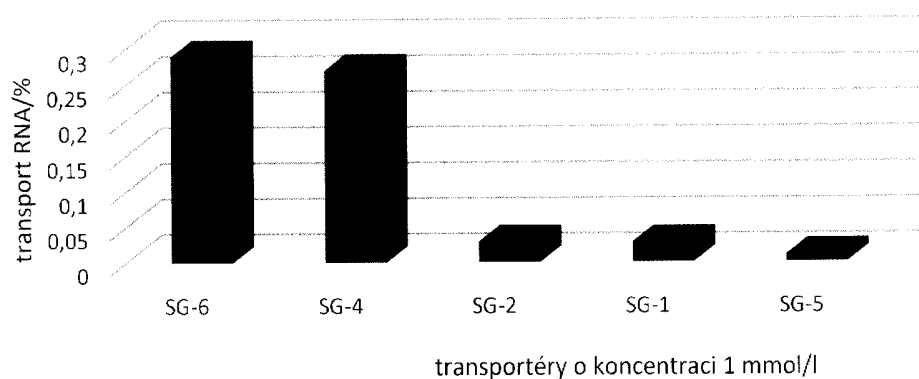
Obr. 1

Efektivnost transportérů při transportu RNA



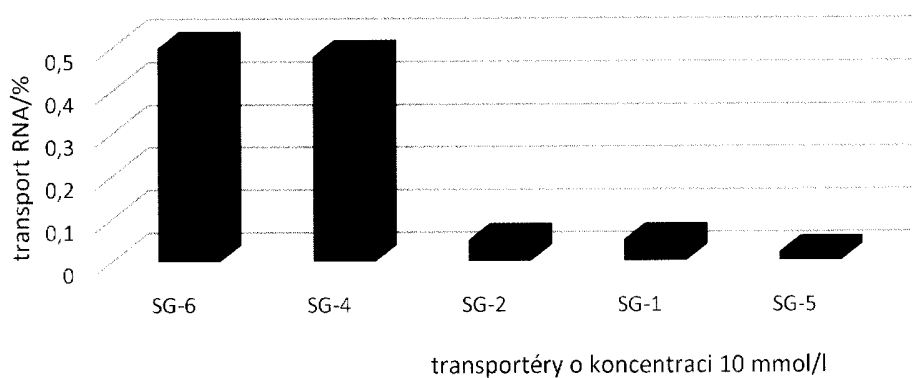
Obr. 2

Efektivita transportérů při transportu RNA



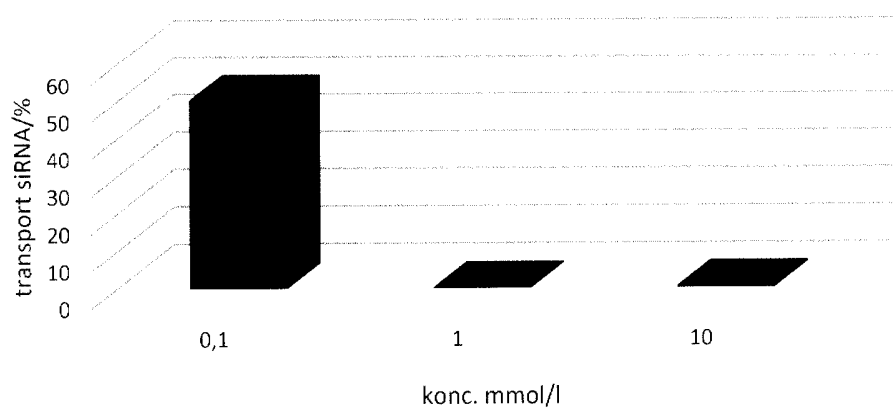
Obr. 3

Efektivita transportérů při transportu RNA



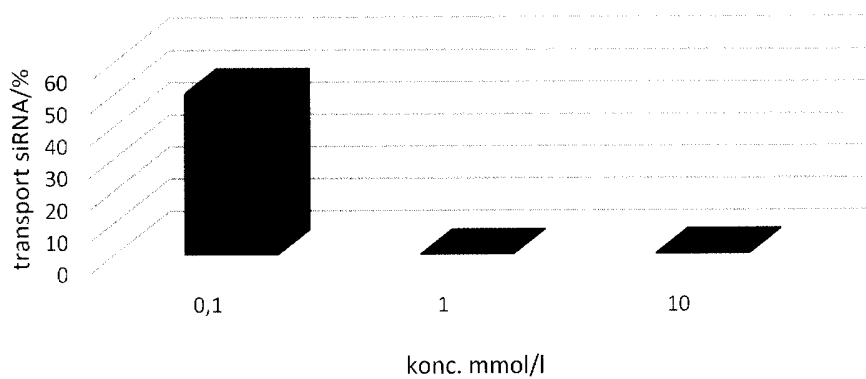
Obr. 4

Efektivita SG-6 v závislosti na koncentraci



Obr. 5

Efektivita SG-4 v závislosti na koncentraci

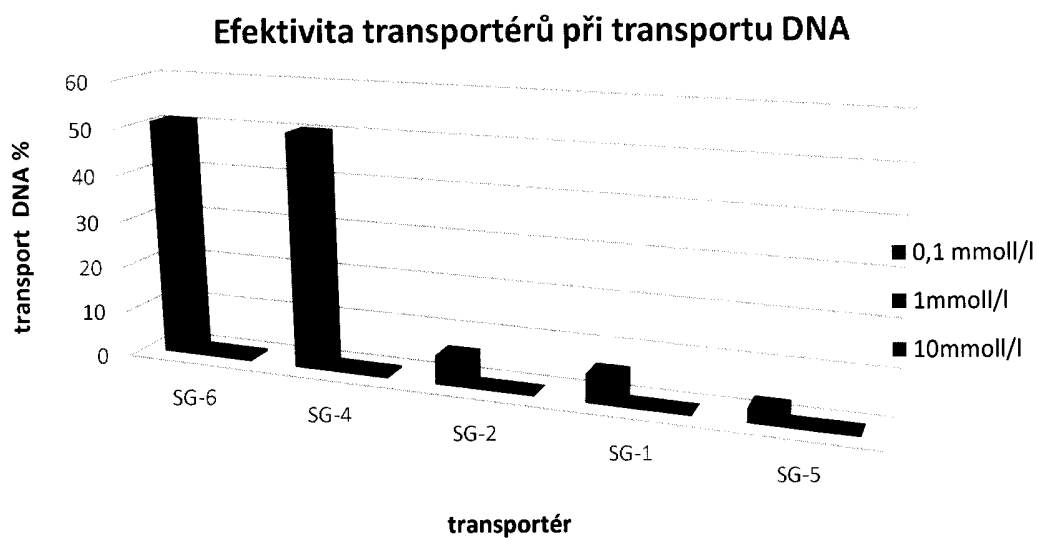


Obr. 6

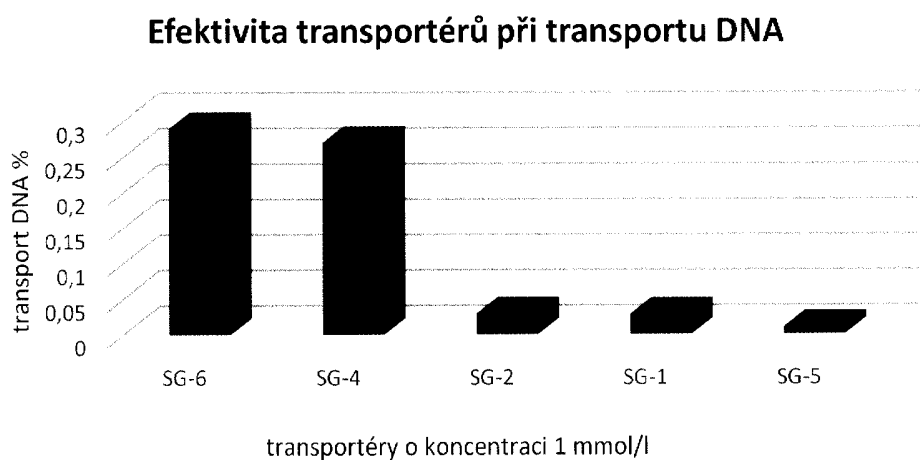
6	SG-6	0,1	0,05	256	254
4	SG-4	0,1	0,05	256	58
2	SG-2	0,1	0,05	256	325
1	SG-1	0,1	0,05	256	1526
5	SG-5	0,1	0,05	256	3459

Obr. 7

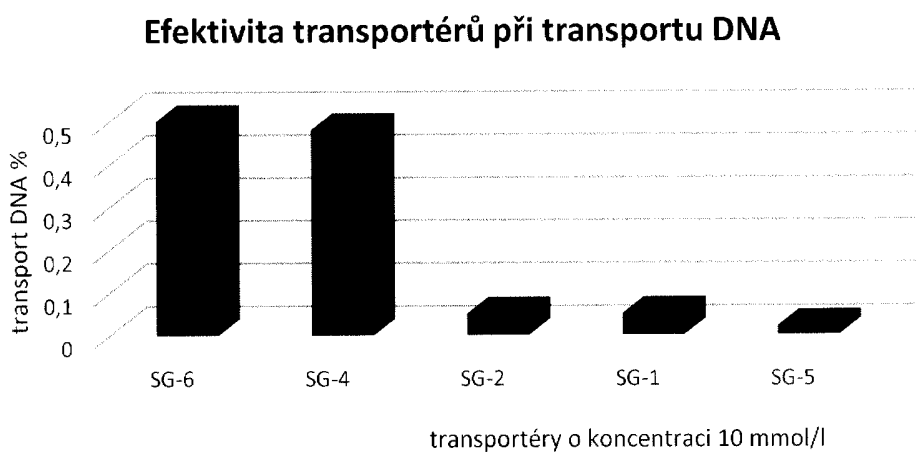
PV 585-2015
30.08.15



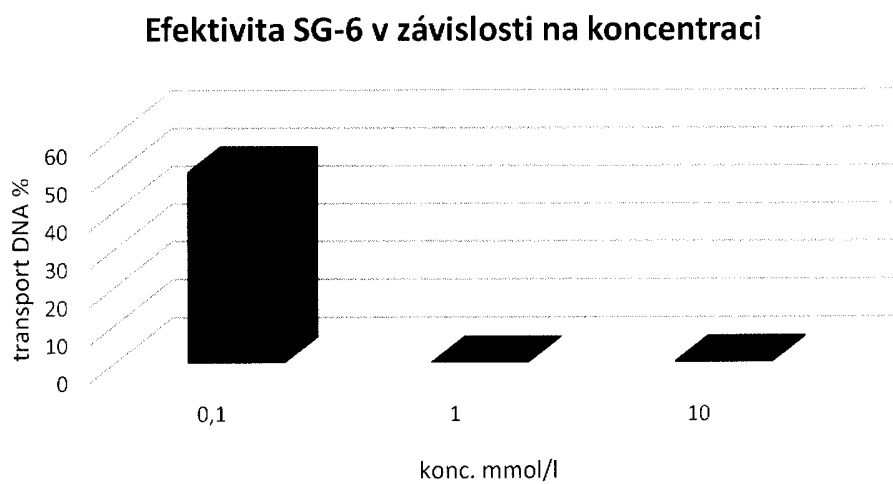
Obr. 8



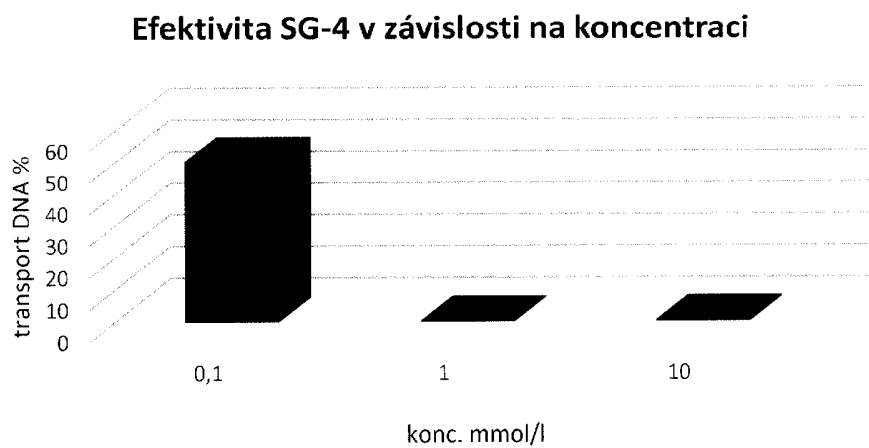
Obr. 9



Obr. 10

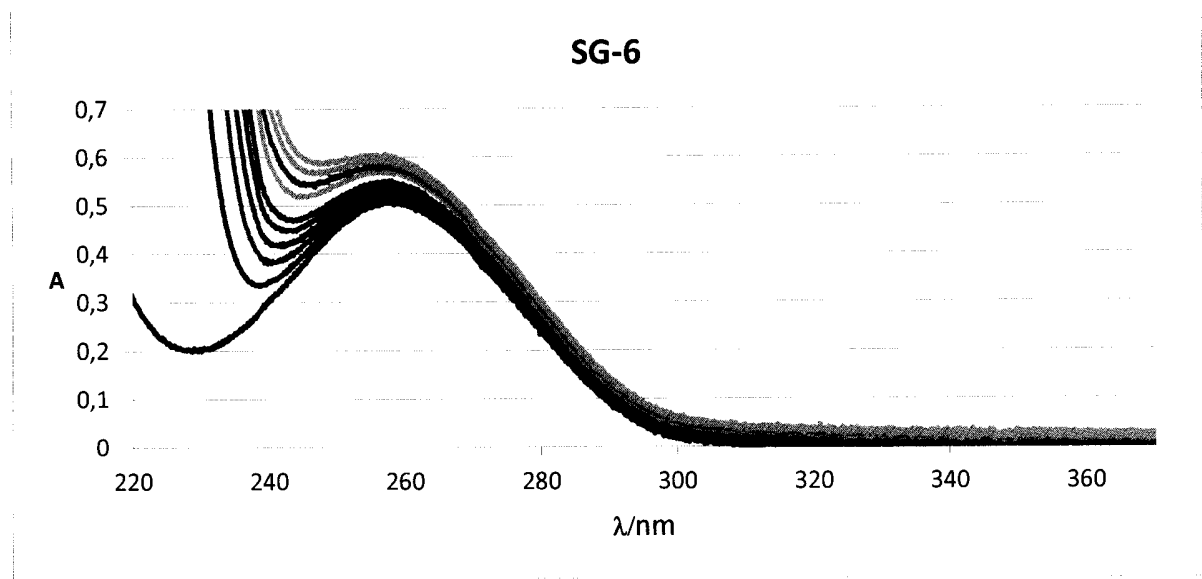


Obr. 11

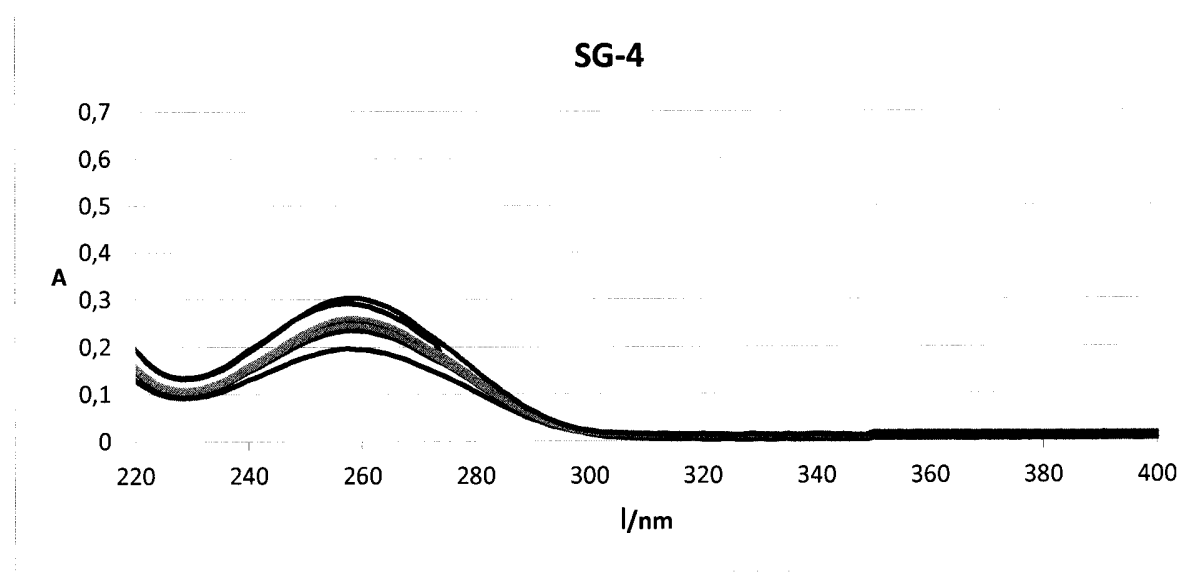


Obr. 12

PV 585-2015
30.08.15



Obr. 13



Obr. 14