

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

304 948

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 277/64 (2006.01)
C07D 277/84 (2006.01)
C07D 417/06 (2006.01)
C07F 15/06 (2006.01)
A61K 31/428 (2006.01)
A61K 31/724 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-5**
 (22) Přihlášeno: **02.01.2013**
 (40) Zveřejněno: **09.07.2014**
(Věstník č. 28/2014)
 (47) Uděleno: **29.12.2014**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **04.02.2015**
(Věstník č. 5/2015)

(56) Relevantní dokumenty:
 Bříza T. et al.: Chemical Communications 2008, 16, str. 1901-1903.
 EP 0 800 831; WO 02/32285; CZ 299 996; CZ 2001-3562.

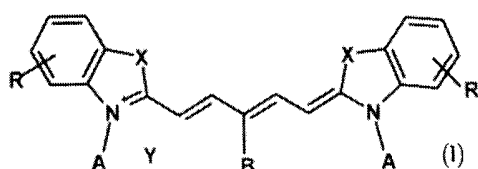
(73) Majitel patentu:
 Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
 Praha 6, CZ
 Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR,
 Praha 4, CZ
 1. LF Univerzity Karlovy, Praha 2, CZ

(72) Původce:
 prof. RNDr. Vladimír Král, DSc., Praha 2, CZ
 RNDr. Jarmila Králová, CSc., Praha 2, CZ
 prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Praha 4, CZ
 Ing. Tomáš Bříza, Ph.D., Praha 4, CZ
 Ing. Zdeněk Kejík, Ph.D., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:
 oddělení pro vědu a výzkum VŠCHT Praha, Ing.
 Iveta Pospíšilová, Technická 5, 166 36 Praha 6

(54) Název vynálezu:
**Využití polymethiniových solí jako senzorů
 pro nádorové markery**

(57) Anotace:
 Řešení se týká využití polymethiniových solí obecného
 vzorce I pro přípravu optických senzorů pro stanovení
 nádorových markerů, dále pro stanovení a rozpoznávání
 sulfátovaných analytů, pro stanovení fosfátů a sacharidů,
 pro diagnostiku onkologických onemocnění a pro
 přípravu léčiva pro léčení onkologických onemocnění.



CZ 304948 B6

Využití polymethiniových solí jako senzorů pro nádorové markery

Oblast techniky

Vynález se týká použití optických senzorových systémů založených na polymethiniových solích. Tyto systémy mohou být využity pro stanovení tumorových markerů s jejich využitím v rozpoznávání, diagnostice a terapii nádorových onemocnění.

Tyto systémy jsou založeny na použití strukturního motivu polymethiniových solí připravených z příslušných malondialdehydů. Tyto látky jsou vhodně substituovány skupinami zvyšující jejich rozpustnost a selektivitu pro cílový analyt.

Dosavadní stav techniky

Navzdory významnému pokroku, dosaženého během usilovného výzkumu diagnózy a léčby rakoviny, je její mortalita zatím stále příliš vysoká. Pro úspěšnou léčbu rakoviny je včasná diagnóza klíčovým faktorem. Pro řešení tohoto úkolu je nutno rozpoznávat rakovinu na buněčné úrovni. Její efektivní rozpoznávání může být založeno na specifických interakcích analytického činidla a vhodného molekulárního partnera, např. rakovinového (nádorového) markeru. Markery, kterými mohou být například proteiny, sacharidy, metabolity nebo nukleové kyseliny, jsou důležité molekulární znaky buněčného fenotypu a mohou být použity pro rozpoznávání určitého buněčného typu. Tyto buněčné znaky se mění během rakovinového vývoje. Detekce těchto změn může být použita i pro diagnózu rakoviny v časně fázi. Tyto optické sensory mohou být použity v diagnostice nádorových onemocnění, v cílené protinádorové terapii jako rozpoznávací část systému pro transport léčiv anebo pokud jsou tyto nádorové markery funkční součástí nádorových receptorů, tak pro jejich přímou inhibici.

Optické sensory pro nádorové markery byly již několikrát popsány. Jedná se o konjugáty monoklonálních protilátek a fluorescenčních molekul (Jelínek, R., Kolusheva, S. (2004): Carbohydrate biosensors. *Chem. Rev.* **104**, 5987–6015). Ty sice dosahují vysoké účinnosti, nicméně jejich praktické využití silně limituje jejich vysoká cena. V oblasti optických chemosensorů je známých řešení pouze několik (Kejík, Z., Bříza, T., Králová, J., Martásek, P., Vladimír, K. (2010): Selective recognition of saccharide type tumor marker with natural and synthetic ligands: New trend in cancer diagnosis. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 1865–1870). Jedná se například o porfyrinové systémy na bázi metaloporfyrinů, které lze využít jako sensory pro oligosaccharidové markery (Sugakasaki, A., Sugiyasu, K., Ikeda, M., Takeuchi, M., Shinkai, S. (2001): First successful molecular design of an artificial lewis oligosaccharide binding system utilizing positive homotropic allostereism. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10239–10244), dále o konjugáty porfyrinů se žlučovými kyselinami využitelnými pro záporně nabitě polysaccharidové markery (Králová, J., Koivukorpi, J., Kejík, Z., Poučková, P., Sievanen, E., Kolehmainen, E., Král, V. (2008): Porphyrin–bile acid conjugates: from saccharide recognition in the solution to the selective cancer cell fluorescence detection. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 1548–1552), metalokomplexy pro lysofosfátovou kyselinu a gangliosidy (Alpturk, O., Rusin, O., Fakayode, S., O., Wang, W., Escobedo, J., O., Warner, I., M., Crowe, V., E., Král, V. Pruet, J., M., Strongin, R., M. (2006): Lanthanide complexes as fluorescent indicators for neutral sugars and cancer biomarkers, *PNAS* **103**, 9756–9760) a dále systémy na bázi borových kyselin pro stanovení sialové kyseliny a sialových Lewisových antigenů (Yang, Y., Lewis, P., T., Escobedo, J., O., Luce, N., N., Treleaven, W., D., Cook, R., L., Strongin, R., M. (2004): Mild colorimetric detection of sialic acid. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **69**, 1282–1291).

Právě polymethiniové soli mají řadu vlastností, které je předurčují pro použití v optických senzorech, jako například vysoká hodnota optického koeficientu, poloha absorpčních maxim ve viditelné oblasti, vysokou fluorescenci a vysoké spektrální změny při vazbě na analyt. (Gomes–Hens, A., Aguilar–Caballeros, M., P. (2004): Long–wavelength fluorophores new trends in their analytical use. *Trends in Analytical Chemistry* **23**, 127–136.), (Ajayaghosh, A. (2005): Chemistry of

squaraine-derived materials: Near-IR dyes, low band gap systems, and cation sensors. *Accounts of Chemical Research* **38**, 449–459), (Král, V., Vašek, P., Cígler, P., Králová, J., Poučková, P. (2004): Preparation of porphyrin derivatives with polymethine substitution for photodynamic therapy. Czech Rep. 13 pp. CODEN: CZXXED CZ 293672 B6 20040616 CAN 142:219085 AN 2004:942137 CAPLUS)

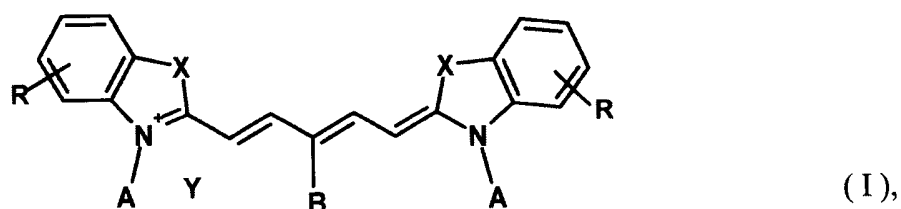
Optické systémy na bázi polymethiniových solí pro rozpoznávání byly již popsány. Nicméně toto stanovení bylo provedeno jen v případě pentamethiniových solí substituovaných v poloze γ para-nitrofenyl skupinou, a to pouze pro heparin, DNA a sulfátový anion (Bříza, T., Kejík, Z., Císařová, I., Králová, J., Martásek, P., Král, V. (2008): Optical sensing of sulfate by polymethinium salt receptors: colorimetric sensor for heparin. *Chem. Comm.* **16**, 1901–1903.). Použití γ -para-nitrofenyl substituovaných pentamethiniových solí a stanovení těchto analytů není předmětem tohoto patentu. Navíc aplikace výše zmíněných solí vyžadovala použití poměrně velkého přídavku organických rozpouštědel do pufru během měření, což značně snižovalo využitelnost tohoto stanovení. Dalším problémem tohoto strukturního motivu, je substituce nitro skupinou. V naší předchozí práci (Bříza, T., Kejík, Z., Císařová, I., Králová, J., Martásek, P., Král, V. (2008): Optical sensing of sulfate by polymethinium salt receptors: colorimetric sensor for heparin. *Chem. Comm.* **16**, 1901–1903.) byla tato skupina využita neboť usnadňovala krystalizaci těchto látek a následné určení jejich 3D struktury. Nicméně nevýhoda nitrovaných látek je jejich značně nižší fluorescenční výtěžek, což znevýhodňuje jejich použití jako optických sensorů. Z tohoto důvodu je výrazně lepší připravit pro účely optických sensorů, polymethiniové soli s odlišnou γ -aryl substitucí. Dosud však nebyl publikován optický systém pro stanovení nádorových markerů, na základě γ -aryl substituovaných polymethiniových solí bez nitrofenylové skupiny. Proto byl naším cílem připravit takové optické systémy, které by toto stanovení umožňovaly. Ty by bylo možno následně použít pro rozpoznávání nádorových markerů a kombinovat je pak s antinádorovou terapií založenou na rozpoznávání, cíleném transportu, inhibici a destrukci těchto receptorů.

Příprava těchto systémů, jejich využití pro detekci a rozpoznávání nádorových markerů s cílem uplatnění těchto systémů v diagnostice nádoru a antinádorové terapii jsou předmětem tohoto patentu.

Podstata vynálezu

Uvedené nevýhody odstraňuje použití polymethiniových solí s γ -aryl substitucí, které vykazují vysokou absorpci, emisi v optimální oblasti (600 až 800 nm) pro práci s biologickým materiálem, vysoké spektrální změny při interakci s analyty a jsou dostatečně stabilní za daných podmínek.

Předmětem vynálezu jsou polymethiniové soli obecného vzorce I,



kde obě koncové heteroaromatické skupiny methiniového řetězce jsou totožné a tvoří je heteroaromatické cykly odvozené od benzenu, jejichž konkrétní struktura je charakterizována skupinou A, B, X, Y a jednou nebo více skupinami R na obou koncích methiniové soli, kde skupina A jsou alkyl substituenty s délkou řetězce C1 až C12;

kde skupina B je 4-pyridyl;

kde v případě dvojnásobně nabitých solí, skupinu B tvoří 4-pyridyl kvarternizovaný na svém atomu dusíku skupinou A, cyklodextrinovým kruhem velikostí α nebo β nebo γ , nebo kobalt-bis(dikarbollidem), který je připojen k atomu dusíku pomocí řetězce $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-$;

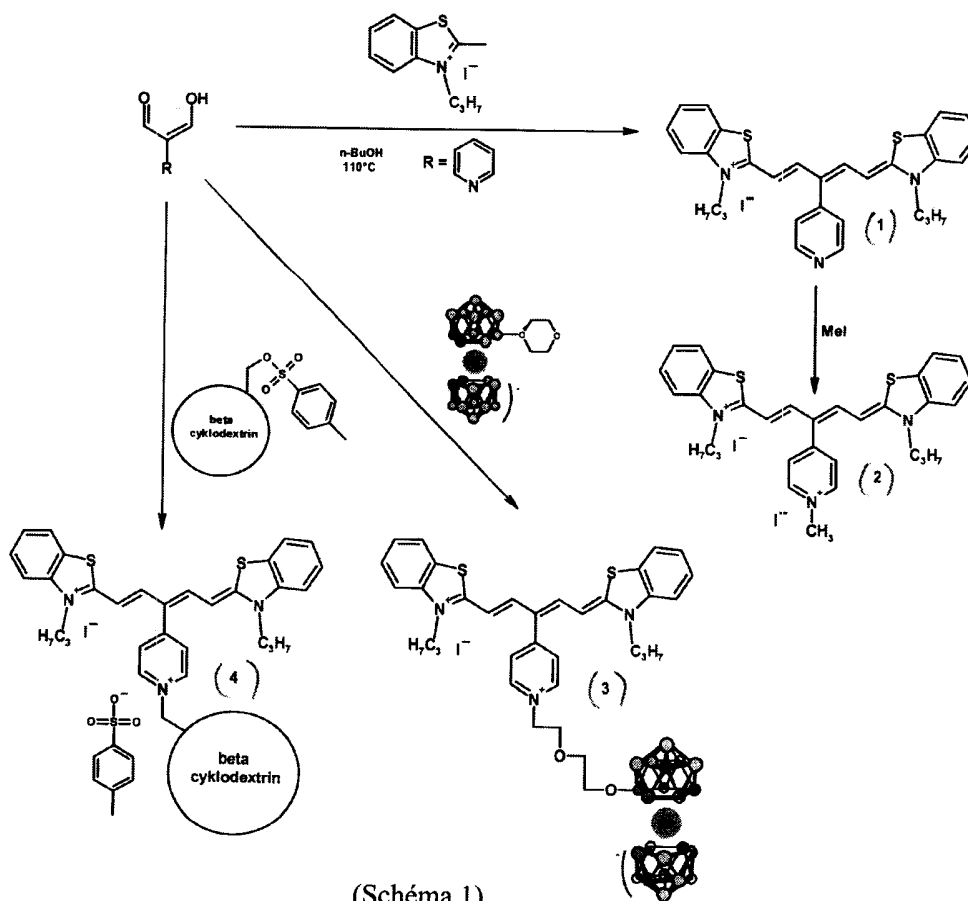
kde skupina R je vodík, fluor, chlor, brom, jod, amino, hydroxy, nitril, thiol;

kde X je kyslík, síra, selen nebo dimethylmethylenová skupina;

kde Y je chlorid, bromid, jodid, toluensulfonát, tetrafluorborát, chlorstan, acetat.

Předmětem vynálezu jsou polymethiniové soli obecného vzorce I, pro přípravu optických senzorových systémů pro diagnostiku a terapii. Zjistili jsme, že tyto soli vykazují vysokou absorpci a emisi a jejich maxima se nachází v oblasti ideální pro biologické materiály (600 až 800 nm). Dále tyto soli vykazují silné spektrální změny při interakci s cílovými analyty a zároveň vykazují vysokou selektivitu pro daný cílový motiv.

Polymethiniové soli, které jsou předmětem tohoto vynálezu, jsou založeny na kondenzaci vhodného aromatického malondialdehydu se solí příslušného heteroaromátu (Schéma 1) tak, jak je příprava popsána pro podobné systémy s nitroskupinou na aromátu v γ -poloze pentamethiniového řetězce. (Bříza, T., Kejík, Z., Císařová, I., Králová, J., Martásek, P., Král, V. (2008): Optical sensing of sulfate by polymethinium salt receptors: colorimetric sensor for heparin. *Chem. Comm.* 16, 1901–1902.) Nesymetrické polymethiniové soli lze připravit dle námi již dříve popsaných postupů týkajících se podobných struktur s nitroskupinou na aromátu v γ -poloze pentamethiniového řetězce. (Bříza T., Kejík Z., Králová J., Martásek P., Král V. (2009): Synthesis of unsymmetric cyanine dye via merocyanine and their interaction with DNA. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 74, 1081–1090) s tím rozdílem, že je pro jejich syntézu využito neutrálního merocyaninového barviva, které je finálně kondenzováno se solí příslušného heteroaromátu (Schéma 1).



Dosud popsané polymethiniové soli s nitrofenylovou substitucí v γ -poloze mají značně omezenou použitelnost jako optické senzory díky potlačení jejich fluorescence elektronegativní nitroskupinou. Na druhé straně jejich spektrální vlastnosti naznačují jejich využitelnost pro tyto aplikace. Proto jsme se zaměřili na studium jejich selektivity a afinity pro tumorové markery.

5

Naším cílem bylo nalezeno vhodného strukturního motivu na bázi polymethiniových solí bez nitrofenylové substituce v γ -poloze pentamethiniového řetězce a zároveň, aby tyto látky vykazovaly selektivitu nebo specifickou odpověď pro daný analyt. Překvapivě jsme zjistili, že tyto látky vykazují nejen výraznou preferenci polysulfátových polysacharidů oproti stejně nabytým polysacharidům s karboxylovou substitucí, ale že i vhodná změna jejich struktury nebo podmínek stanovení může značně rozšířit oblast jejich použitelnosti jako optických senzorů. Naše výsledky ukazují, že selektivita těchto solí pro cílový analyt může být vhodným designem výrazně zvýšena. Následuje výčet jednotlivých oblastí, kde lze naše látky využít:

15 Optické sensory pro stanovení nádorových markerů

Pozorovali jsme vysokou afinitu a výrazné spektrální změny pro tumorové markery polymethiniových solí v závislosti na struktuře těchto solí a podmínkách stanovení. Obdržená data prokázala, že vhodně navržené polymethiniové soli mohou být použity pro specifické stanovení různých skupin nádorových markerů, jako jsou např. sacharidové markery a metabolické markery. Například selektivita pro cholesterolsulfát může být dosažena substitucí soli cyklodextrinovou jednotkou. Pentamethiniová sůl 4 s touto jednotkou vykazuje selektivitu pro cholesterolsulfát. Pozorovali jsme, že selektivita pro cholesterolsulfát může být dosažena i bez cyklodextrinové jednotky, ale za specifických podmínek, a tím je přítomnost kardiopolipinu. Vysoce překvapivé výsledky jsme pozorovali pro pentamethiniovou sůl 2 s dvěma kladnými náboji. Tato sůl vykazuje vysokou afinitu pro tři různé tumorové markery – polysulfátové sacharidy, cholesterolsulfát a kardiopolipin, nicméně pokaždé s jinou odezvou. Pro polysulfátové sacharidy jsme pozorovali pokles intenzity spektrálního pásu a posun ke kratším vlnovým délkám, pro cholesterolsulfát jsme pozorovali pokles intenzity spektrálního pásu a posun k delším vlnovým délkám a pro kardiopolipin nárůst intenzity spektrálního pásu a posun k větším vlnovým délkám. Selektivitu našich polymethiniových solí pro tumorové markery jsme prokázali pomocí UV-Vis spektroskopie a je doložena následujícími tabulkami (tabulka 1 a 2), dále grafy (1 až 3, 6 až 8).

35 Tabulka 1

Interakce soli 2 se studovanými analyty

Polysacharid	Náboj	Počet sulfátových skupin	Komplex polysacharid:sůl	Log Ks
Chondroitinsulfát	-2	1	1:1	5,60
			1:2	12,0
Heparansulfát	-2	1	1:1	5,80
			1:2	12,3
Heparin	-4	3	1:2	11,2
			1:3	17,3
Dextransulfát	-4	4	1:4	34,0

Tabulka 2

Interakce solí 2 a 4 se studovanými analyty

Analyt	stechiometrie komplexu	Ks – konstanta stability	
		2	4
Cholesterol- suflát	1:1	2×10^6	2×10^7
	2:1	1×10^{11}	2×10^{12}
Heparin	1:1	2×10^5	2×10^4
	2:1	6×10^{11}	3×10^6
Cholesterol	interakce nepozorována		

5

Optické sensory pro stanovení a rozpoznávání sulfátovaných analytů

Selektivitu našich polymethiniových solí pro sulfátované analyty jsme prokázali pomocí UV–Vis spektroskopie (předcházející tabulky 1 a 2, dále grafy (1 až 6)).

10

Provedená studie ukazuje silnou korelaci spektrální odpovědi látky 2 s rostoucím počtem sulfátových skupin v molekule. Provedli jsme kontrolní experiment pro dextransulfát a jeho porovnání s heparinem. Pozorovali jsme výrazně odlišnou odpověď pro stejně nabitě sloučeniny s různým počtem sulfátových skupin. Náboj a počet sacharidových skupin je vztažen na disacharidovou jednotku. Hyaluronová kyselina byla použita jako kontrolní experiment pro odezvu nesulfátovaného proteoglykanu. Studie byla provedena ve fosfátovém pufru ($c=1$ mM) při pH 7,34.

15

V této části studie jsme pozorovali, že vhodně substituované polymethiniové soli např. sůl 4 vykazují selektivitu i pro mono–sulfátované analyty. Vzhledem k nízké rozpustnosti cholesterolových derivátů proběhla tato část studie v MeOH 30% v/v.

20

Optické sensory pro stanovení fosfátů

V našich vazebných studiích zaměřených na interakci některých polymethiniových solí s anionty jsme pozorovali jejich silnou spektrální odezvu v přítomnosti některých analytů na bázi fosfátů, jako jsou např. kardiolipin a lysofosfátová kyselina. Při interakci polymethiniových solí s kardiolipinem jsme pozorovali výrazný spektrální posun jejího spektrálního pásu k vyšším vlnovým délkám a podstatnému nárůstu intensity daného pásu. Na druhé straně, při interakci těchto solí s lysofosfátovou kyselinou dochází k odlišným spektrálním změnám, tedy ke značnému poklesu intensity spektrálního pásu a jeho posunu k vyšším vlnovým délkám. Tyto výsledky ukazují, že vhodně zvolené polymethiniové soli mohou být použity i pro rozlišení mezi těmito analyty. Vzhledem k tomu, že tyto studie proběhly za přítomnosti řádového přebytku fosfátových iontů je zcela vyloučena možnost pouhé aniontové výměny a získaná data plně potvrzují selektivní interakci polymethiniových solí se zvoleným analytem. Selektivitu našich polymethiniových solí pro fosfáty jsme prokázali pomocí UV–Vis spektroskopie a je doložena následujícími grafy (7 a 8).

30

35

Optické senzory pro stanovení sacharidů

V našich studiích zaměřených na interakce polymethiniových solí se sacharidy jsme pozorovali, že tyto soli poskytují významnou odezvu zejména pro sacharidy se záporným nábojem. Vhodně substituované polymethiniové soli, optimálně elektron donorovou skupinou např. pyridinem, vykazují významnou spektrální odezvu i v přítomnosti neutrálních sacharidů. Také jsme pozorovali

40

vali výraznou afinitu polymethiniových solí k lektinové kavitě (graf 10). Je známo, že lektiny mají výraznou selektivitu pro svůj cílový sacharidový motiv. Na tomto principu je možno navrhnout naše látky jako vytěšňovací senzor pro sacharidové rozpoznávání, kde v přítomnost sacharidu s afinitou k lektinu bude detekována změnou spektra vytěšněné polymethiniové soli. (Rusin, O., Král, V., Escobedo, J., O., Strongin, R., M. (2004): A supramolecular approach to protein labeling. A novel fluorescent bioassay for concanavalin A activity. *Org. Lett.* **6**, 1373–1376). Selektivitu našich solí pro sacharidy jsme prokázali pomocí UV–Vis spektroskopie a je doložena grafy (1 až 5, 9).

10 Senzory pro diagnostiku nádorů

Rozpoznávání nádoru za pomoci nádorových markerů je velmi efektivní metoda pro detekci nádorových buněk a jejich diagnostiku. Je známo, že řada tumorových markerů jsou sacharidy nebo záporně nabitě molekuly jako např. lysofosfátová kyselina, kardiopilin nebo cholesterol sulfát. Jejich zvýšená hladina silně koreluje s pravděpodobností výskytu rakoviny u pacienta. Vzhledem k tomu, že lze použít naše látky pro stanovení těchto významných analytů, mohou být tyto látky použity jako specifické činidlo pro diagnostiku rakoviny. Dalším důležitým nádorovým znakem jsou změněné aktivity enzymů, které se podílejí na jejich syntéze a hydrolýze. Metoda stanovení enzymové aktivity je založena na měření koncentrace produktu, nebo výchozí látky v čase. Vzhledem k tomu, že naše látky jsou použitelné pro stanovení v závislosti na použitém enzymu nebo jeho produktu nebo výchozí látky, a mohou být použity také pro získání informací o jejich aktivitě. (Kiguchi, K., Kagehara, M., Higo, R., Iwamori, M., DiGiovanni, J. (1998): Alterations in cholesterol sulfate and its biosynthetic enzyme during multistage carcinogenesis in mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 973–981.), (Dennis J., W., Granovsky, M., Warren C., E. (1999): Glycoprotein glycosylation and cancer progression *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 21–34), (Kameda, K., Shimada, H., Ishikawa, T., Takimoto, A., Momiyama, N., Hasegawa, S., Misutaa, K., Nakano, A., Nagashima, Y., Ichikawa Y. (1999). Expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer neural invasive lesion *Cancer Lett.* **137**, 201–207), (Rajpura, B., Patel, P., S., Chawda, J., G., Shah R., M. (2005): Clinical significance of total and lipid bound sialic acid levels in oral pre-cancerous conditions and oral cancer. *J. Ora. Pathol. Med.* **34**, 263–267), (Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata K. (2004): Sialidase and malignancy: A minireview *Glycoconjugate Journal*, **20**, 189–198).

Cílený transport léčiv a terapie

Je známo, že některé sulfátované látky mají antinádorové účinky a že nádorové buňky mají zvýšenou expresi polymerických záporně nabitých systémů. Naše látky mají vysokou afinitu pro sulfátované molekuly a výrazně nižší pro polymerické polyaniontové systémy, nicméně, afinitu stále dostatečnou i pro tyto účely (tabulka 2). Pozorovali jsme, že interakce mezi sulfátovaným léčivem a našim systémem je dostatečně silná a specifická, aby se léčivo neuvolnilo předčasně v krvi. Jakmile celý systém dorazí k tumoru tak vzhledem k vysokému počtu nádorových receptorů dojde k uvolnění léčiva. Je známo, že zapojením dalšího z modu do terapie, dojde k významnému nárůstu léčebného efektu. Také jsme pozorovali, že naše látky mají afinitu pro karboránové systémy (graf 11) a na základě toho lze připravit terapeutický systém založený na kombinaci neutronové terapie karboránu, fotodynamické terapie a chemoterapie samotné soli. Tohoto efektu lze taky dosáhnout použitím polymethiniové soli s karboranovou substitucí.

Pozorovali jsme, že některé naše látky vykazují výraznou inhibici růstu nádoru po dobu jednoho měsíce (graf 12). Lze je tedy využít pro přípravu terapeutického systému obsahujícího pouze danou látku nebo jako multimodálního systému obsahujícího danou látku ve formě konjugátu s příslušným léčivem se synergickým efektem.

Dalším vhodným systémem pro cílený transport našich látek představují transportní systémy s lipofilní částí, která umožní monomerizaci přepravované polymethiniové soli a tím zvýšení její

fotodynamické účinnosti. Je známo, že tyto transportní systémy na bázi lyosomů, lipoproteinů mohou značně zvýšit efektivitu terapie.

- (Chida, K., Murakami, A., Tagawa, T., Ikuta, T., Kuroki, T. (1995): Cholesterol sulfate, a second messenger for the η isoform of protein kinase C, inhibits promotional phase in mouse skin carcinogenesis. *Canc. Res.* 55, 4865–4869.), (Tsutsumi, R., Hiroi, H., Momoeda, M., Hosokawa Y., Nakatzawa F., Koizumi M., Yano T., Tsutsumi O., Taketani Y. (2008): Inhibitory effects of cholesterol sulfate on progesterone production in human granulosa-like tumor cell line, KGN. *Endocrine Journal*, 55(3), 575–581.), (Králová, J., Kejík, Z., Bříza, T., Poučková, P., Král, A., Martásek, P., Král V. (2010): Porphyrin–Cyclodextrin Conjugates as a Nanosystem for Versatile Drug Delivery and Multimodal Cancer Therapy *J. Med. Chem.* 53, 128–138), (Král, V., Králová, J., Kaplánek, R., Bříza, T. and Martásek, P. (2006): Quo vadis porphyrin chemistry? *Phys. Res.* 55, 3–26.)

- 15 Diagnostika rakoviny, cílený transport a multimodální kombinovaná terapie za přítomnosti lektinů.

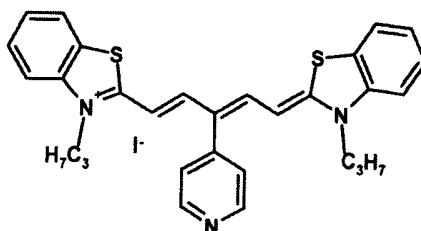
- Pozorovali jsme, že naše látky mají vysokou afinitu vůči lektinům (graf 11). Proto je lze použít pro rozpoznání nádorových buněk na základě rozpoznání jejich interakce s lektiny např. gelektiny, které mají zvýšenou expresi nádorovými buňkami. Dále je možné tyto látky použít jako komplex s lektinem se selektivitou vůči sacharidovým nádorovým receptorům. To umožňuje diagnostikovat rakovinu na základě rozpoznání těchto receptorů a také zvýšit selektivní transport našich látek do nádorových buněk a zvýšit selektivitu a účinnost protinádorové terapie. Výhodou je rovněž to, že takovéto provedení umožní zahrnout do terapeutického mixu ještě protinádorový účinek samotného lektinu. Z literatury je známo že tyto postupy vedou k vysoce efektivním metodám. (Gabor, F., Bogner, F., Weissenboeck, A., Wirth M. (2004): Lectin–Mediated Drug Targeting: Selection of Valency, Sugar Type fu (Gal/Lac), and Spacer Length Cluster Glycosides as Parameters to Distinguish Ligand Binding to C–Type Asialoglycoprotein Receptors and Galectins *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 459–480), (Liu, B., Brian, B., H., Bao J., K. (2010): Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic *Canc. Lett.* 287, 1–12)

Vlastnosti a způsob přípravy nově připravených látek jsou doloženy následujícími příklady, aniž by jimi byly jakkoliv omezeny.

Příklady uskutečnění vynálezu

35 Příklad 1

- Příprava látky 1. Směs 2–(4–pyridyl)malondialdehydu (150 mg), 2–methyl–3–propylbenzothiazolu (640 mg) a suchého n–butanolu (10 ml) byla za míchání zahřívána na 110 °C po dobu 18 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti byla směs přefiltrována, pevný podíl promyt methanolem (3 ml) a sušen ve vakuu. Produkt byl získán ve formě zeleného kovově lesklého prášku. Vý-
těžek 498 mg, 79 %.



(Struktura látky 1)

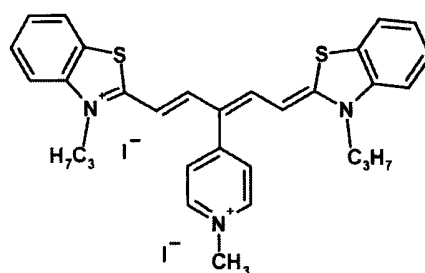
Charakterizace: $^1\text{H-NMR}$: 8,94 (2H, d); 8,14 – 7,80 (8H, m); 7,58 (2H, t); 7,45 (2H, t); 6,20 (2H, d); 4,28 (4H, bs); 1,71 (4H, m); 0,85 (6H, t). $^{13}\text{C-NMR}$: 156,9; 148,2; 143,6; 141,3; 128,2; 127,1; 125,5; 123,2; 114,0; 98,3; 47,5; 20,9; 10,8. ES-MS vypočteno: 496,7 nalezeno: 496,3
Elementární analýza: vypočteno: C 57,78 %; H 4,85 %; nalezeno: C 57,86 %; H 4,93 %.

5

Příklad 2

Příprava látky 2. Polymethiniová sůl (55 mg) byla rozpuštěna v DMF (5 ml) a přidán nadbytek methyljodidu (2M roztok v *t*-BuOMe, 0,5 ml). Směs byla uzavřena v tlakové ampuli a zahřívána přes noc 60 °C. Druhý den byla reakční směs probublávána dusíkem, aby se odstranil přebytečný methyljodid a poté byla směs odpařena dosucha. Pevný podíl byl promyt diethyletherem a sušen ve vakuu. Produkt byl získán ve formě kovově lesklého prášku. Výtěžek 63 mg, 94 %.

10



(Struktura látky 2)

15

Charakterizace: $^1\text{H-NMR}$: 8,96 (2H, d); 7,98 – 8,16 (6H, m); 7,60 (2H, t); 7,48 (2H, t); 6,32 (2H, d); 4,35 (7H, bs); 1,72 (4H, sextet); 0,85 (6H, t). $^{13}\text{C-NMR}$: 166,4; 153,4; 147,9; 145,3; 141,4; 128,3; 127,8; 125,7; 125,6; 123,3; 114,2; 98,6; 47,7; 47,1; 34,4; 21,1; 10,9. ES-MS vypočteno: 225,8 nalezeno: 255,6 ($\text{M}_2^{+}/2$).
Elementární analýza: vypočteno: C 48,64 %; H 4,34 %; nalezeno: C 48,93 %; H 4,56 %.

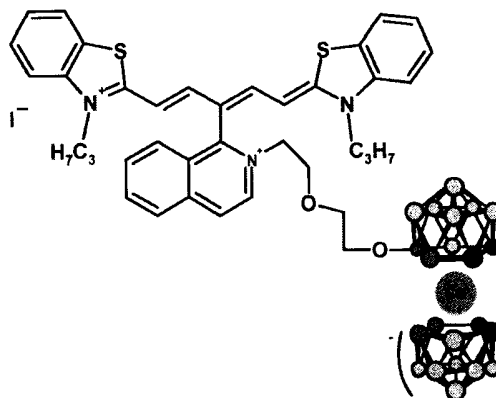
20

Příklad 3

25

Příprava látky 3. Směs polymethiniové soli (20 mg), nadbytku dioxanátu kobalt bis(1,2-dikarbolidu) (20 ml) a glymu (5 ml) byla zahřívána přes noc na 70 °C. Druhý den byla reakční směs zakotvena na silikagelu a produkt byl separován pomocí kolonové chromatografie (silikagel–sloupec 2,5x30 cm, eluent chloroform/acetonitril 4:1). Produkt byl získán ve formě kovově fialového prášku. Výtěžek 27 mg, 83 %.

30



(Struktura látky 3)

Charakterizace: $^1\text{H-NMR}$: 8,48 (1H, d, $J = 8,5$ Hz); 8,05 (6H, m); 7,83 (1H, t, $J = 8,2$ Hz); 7,78 (2H, d, $J = 8,4$ Hz); 7,68 (2H, m); 7,57 (2H, t, $J = 8,2$ Hz); 7,44 (2H, t, $J = 7,8$ Hz); 6,57 (2H, d, $J = 13,9$ Hz); 4,18 (4H, t, $J = 7,1$ Hz); 4,13 (2H, bs); 4,02 (2H, bs); 3,66 (2H, m); 3,56 – 3,47 (4H, m); 3,28 (2H, m); 1,72 (4H, sextet, $J = 7,3$ Hz); 0,85 (6H, t, $J = 7,4$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$: 165,6; 141,3; 130,9; 128,8; 128,4; 128,1; 127,3; 125,9; 123,0; 112,9; 98,4; 71,8; 68,7; 54,9; 48,4; 46,9; 21,2; 11,3.

Elementární analýza: vypočteno: C 46,51 %; H 5,67 %; nalezeno: C 46,83 %; H 5,90 %.

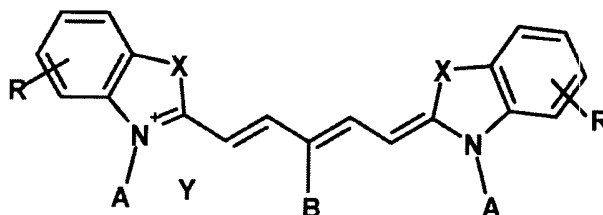
Následující příklady ukazují přínos a potenciál využití našich cyaninových barviv.

Průmyslová využitelnost

Polymethiniové soli jsou využitelné ve farmaceutickém průmyslu k přípravě optických systémů využitelných v diagnostice a terapii nádorových onemocnění.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití polymethiniových solí obecného vzorce I,



kde skupina A jsou alkyl substituenty s délkou řetězce C1 až C12;

kde skupina B je 4-pyridyl;

kde v případě dvojnásobně nabitých solí, skupinu B tvoří 4-pyridyl kvarternizovaný na svém atomu dusíku skupinou A, cyklodextrinovým kruhem velikosti α nebo β nebo γ , nebo kobalt-bis(dikarbollidem), který je připojen k atomu dusíku pomocí řetězce $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-$;

kde skupina R je vodík, fluor, chlor, brom, jod, amino, hydroxy, nitril, thiol;

kde X je kyslík, síra, selen nebo dimethylmethylenová skupina;

kde Y je chlorid, bromid, jodid, toluensulfonát, tetrafluorborát, chloristan, acétát;

pro přípravu optických senzorů využitelných pro stanovení nádorových markerů.

2. Použití polymethiniových solí obecného vzorce I podle nároku 1 pro přípravu optických senzorů pro stanovení a rozpoznávání sulfátovaných analytů.

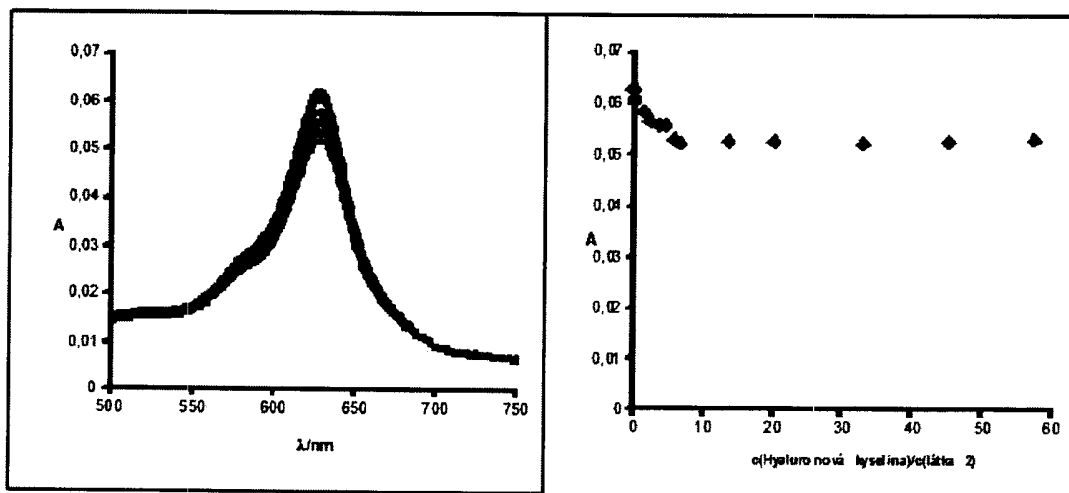
3. Použití polymethiniových solí obecného vzorce I podle nároku 1 pro přípravu optických senzorů pro stanovení fosfátů.

4. Použití polymethiniových solí obecného vzorce I podle nároku 1 pro přípravu optických senzorů pro stanovení sacharidů.
- 5 5. Použití polymethiniových solí obecného vzorce I podle nároku 1 pro diagnostiku onkologických onemocnění.
6. Použití polymethiniových solí obecného vzorce I podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro léčbu onkologických onemocnění.

10

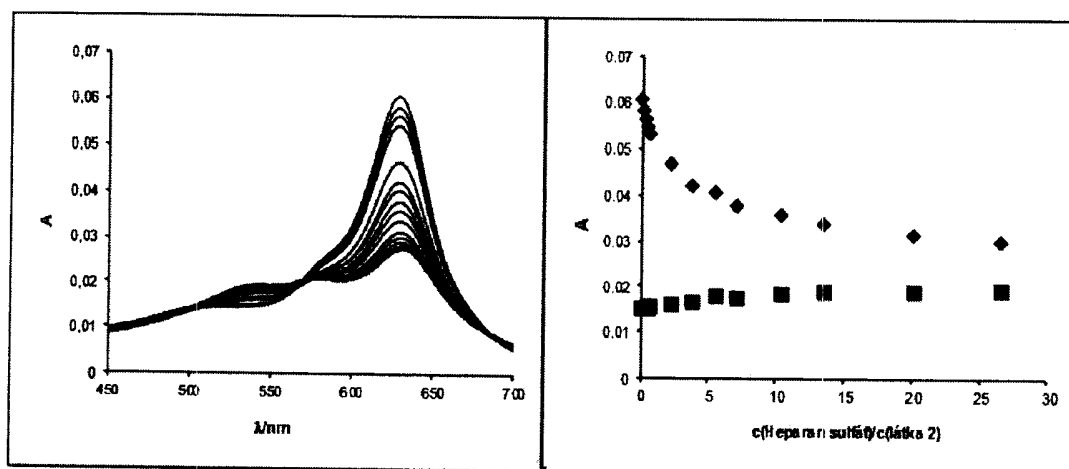
6 výkresů

Graf 1



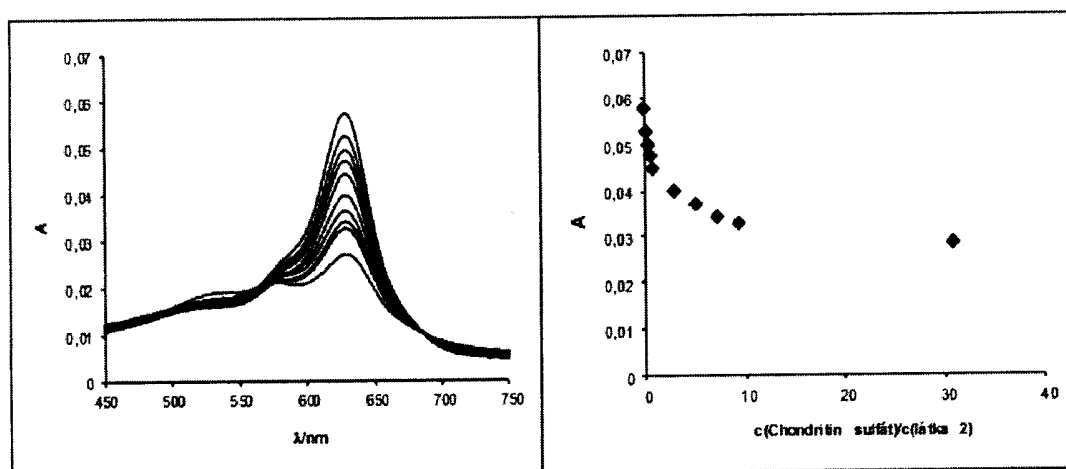
Titrace a titrační křivka látky 2 (1,8 μmol/l) s Hyaluronovou kyselinou v 1 mM fosfátovém pufru, pH 7,34

Graf 2



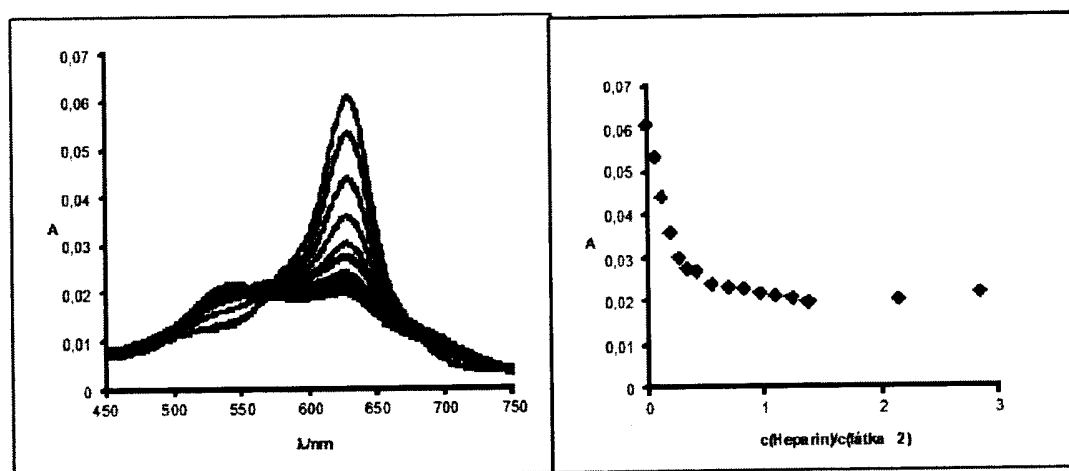
Titrace a titrační křivka látky 2 (1,8 μmol/l) s Heparan sulfátem v 1 mM fosfátovém pufru, pH 7,34

Graf 3



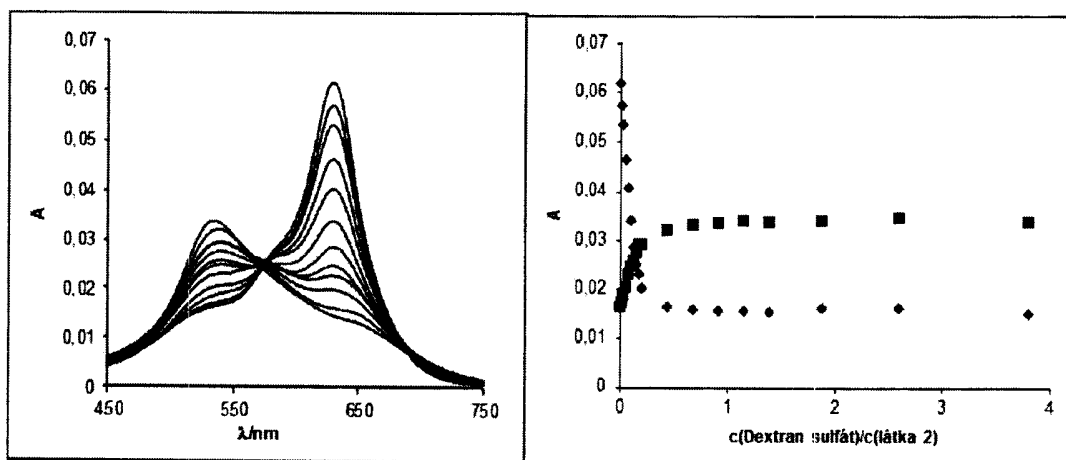
Titrace a titrační křivka látky 2 ($1,8 \mu\text{mol/l}$) s Chondritin sulfátem v 1 mM fosfátovém pufru, pH 7,34

Graf 4



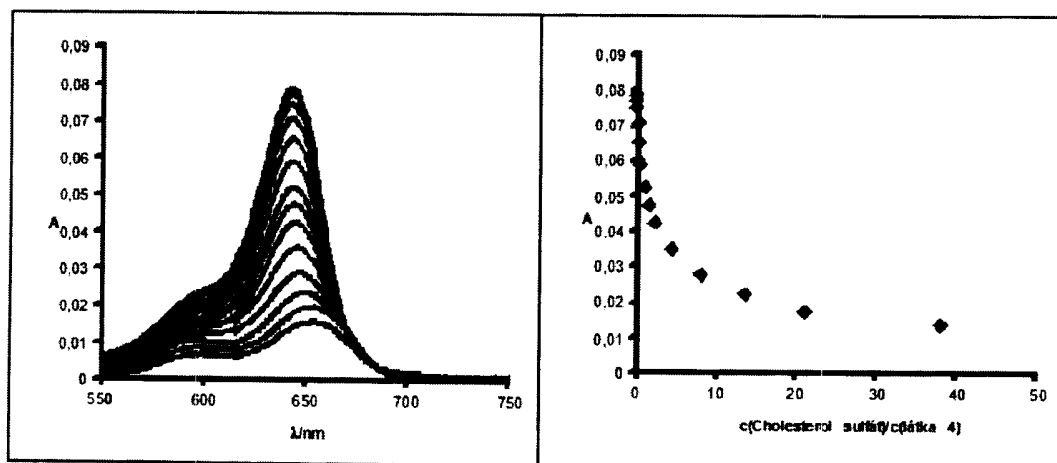
Titrace a titrační křivka látky 2 ($1,8 \mu\text{mol/l}$) s Heparinem v 1 mM fosfátovém pufru, pH 7,34

Graf 5



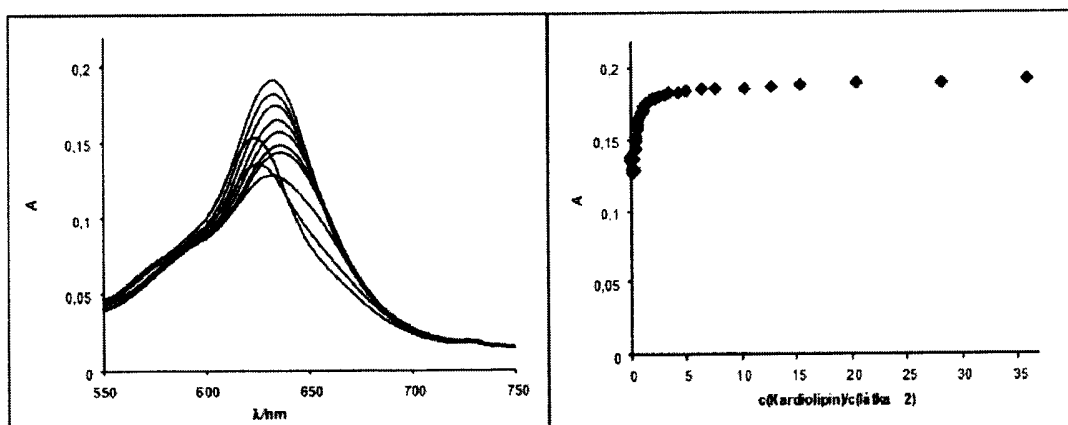
Titrace a titrační křivka látky 2 (1.8 $\mu\text{mol/l}$) s Dextran sulfátem v 1 mM fosfátovém pufru, pH 7,34

Graf 6



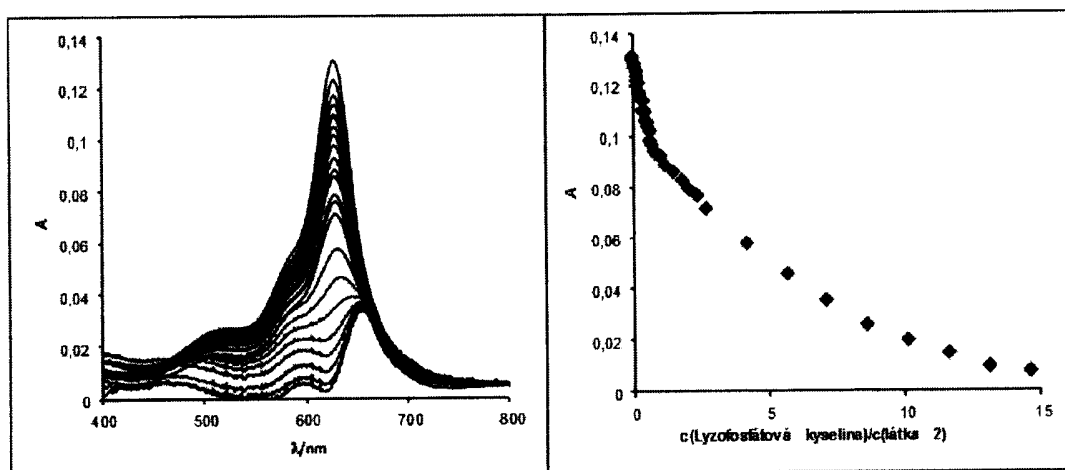
Titrace a titrační křivka polymethiniové soli 4 (1,8 $\mu\text{mol/l}$) s Cholesterol sulfátem v 1 mM fosfátovém pufru, pH 7,34.

Graf 7



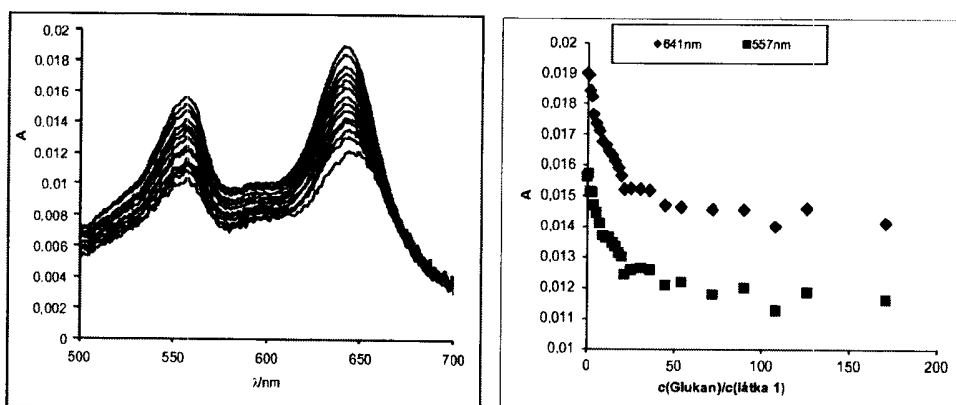
Titrace a titrační křivka látky **2** ($4,7 \mu\text{mol/l}$) Kardioliipinem v 1 mM fosfátovém pufru, pH 7,34

Graf 8



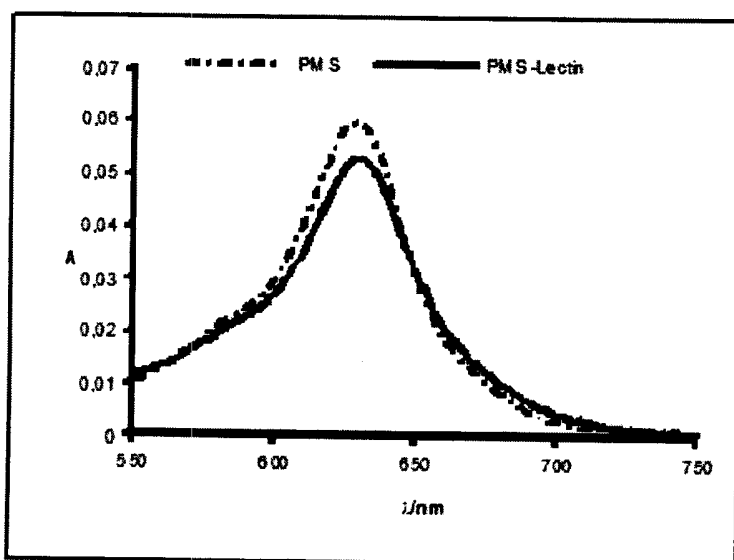
Titrace a titrační křivka látky **2** ($4,7 \mu\text{mol/l}$) Lyzofosfatovou kyselinou v 1 mM fosfátovém pufru, pH 7,34

Graf 9



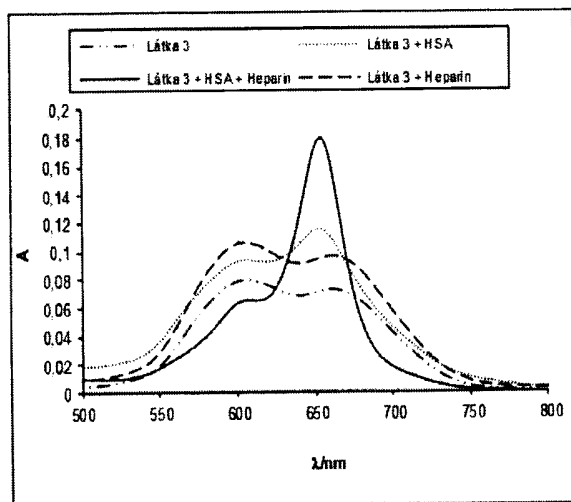
Titrace a titrační křivka látky 1 ($4,7 \mu\text{mol/l}$) Glukanem v 1 mM fosfátovém pufru, pH 7,34

Graf 10



Absorpční spektra polymethiniové látky 2 bez a v přítomnosti lektinu

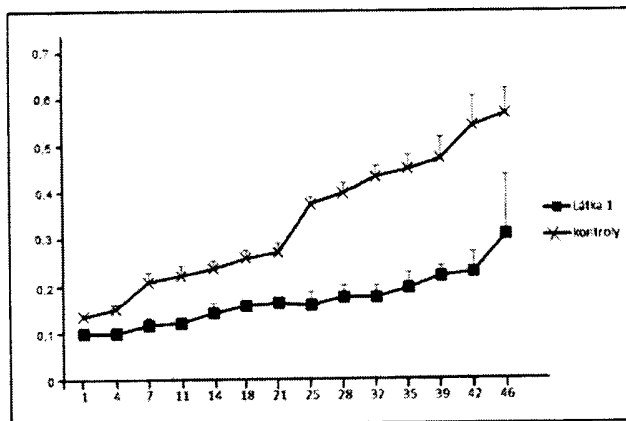
Graf 11



Interakce látky 3 s heparinem a lidským sérovým albuminem.

Naše látka 3 je substituována karboranovou skupinou a UV-VIS spektra ukazují její agregaci způsobenou vazbou karboranové skupiny na polymethiniovou sůl a její monomerizaci v přítomnosti sérového albuminu a heparinu, což indikuje její interakci s heparinem.

Graf 12



Vliv intravenózní aplikace 2,5 mg/kg látky 1-na růst lidského karcinomu prsní žlázy MDA MB 231 v podkoží nu/nu myši.

Svislá osa znázorňuje objem nádoru v cm^3 , vodorovná osa počet dní kdy byl sledován vliv látek na růst nádoru. Je evidentní, že naše látky potlačují růst nádoru.

Konec dokumentu
